

Tesis de Posgrado

El perro como hospedador del *Trypanosoma cruzi* : Comparación de los perfiles de infección y enfermedad entre el modelo experimental de la enfermedad de Chagas y el reservorio canino de áreas endémicas argentinas

Lauricella, Marta Alicia

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lauricella, Marta Alicia. (1991). El perro como hospedador del *Trypanosoma cruzi* : Comparación de los perfiles de infección y enfermedad entre el modelo experimental de la enfermedad de Chagas y el reservorio canino de áreas endémicas argentinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2395_Lauricella.pdf

Cita tipo Chicago:

Lauricella, Marta Alicia. "El perro como hospedador del *Trypanosoma cruzi* : Comparación de los perfiles de infección y enfermedad entre el modelo experimental de la enfermedad de Chagas y el reservorio canino de áreas endémicas argentinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2395_Lauricella.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"EL PERRO COMO HOSPEDADOR DEL Trypanosoma cruzi:
COMPARACION DE LOS PERFILES DE INFECCION Y ENFERMEDAD
ENTRE EL MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE
CHAGAS Y EL RESERVORIO CANINO DE AREAS ENDEMICAS
ARGENTINAS".

Licenciada MARTA A. LAURICELLA.

INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO E INVESTIGACION
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS " Dr. MARIO FATALA CHABEN"

Av. Paseo Colón 568. Buenos Aires. ARGENTINA.

Directora: DRA. ELSA LEONOR SEGURA.

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas.

1991

Tesis
2395
4. 2.

Dedico esta tesis a quienes contribuyeron a mi superación personal y profesional, especialmente a Nelly, mi madre, por su constante preocupación, al recuerdo de Alfredo, mi padre, por su incentivo, y a Ana, a Mabel, a Graciela y a Guillermo por el apoyo y la confianza.

AGRADECIMIENTO

Agradezco muy especialmente a mi directora, la Dra Elsa Leonor Segura el haberme iniciado en la Investigación Científica, por sus enseñanzas y su caudal académico.

A mi consejero de estudios, el Dr Julio Azcurra por su confianza y su empuje.

A la Licenciada Silvia I.Fontanetto por su apoyo incondicional y a Cristián Paz por su colaboración en la edición del texto.

A mis compañeros de trabajo, la Dra Adelina R.Riarte, por su colaboración académica y los estudios anatomopatológicos y al Dr Angel J.Sinagra por su colaboración en área endémica y en el control veterinario de los animales de este estudio, a ambos mi agradecimiento por su apuntalamiento profesional y personal.

A mis compañeros del Dto de Investigación del INDIECH, Dres Irene Paulone, Juan Carlos Lansetti, Rita Cardoni, Sergio Sosa, Mirta Carlomagno y Mirta Moreno y al Dr. Carlos Del Prado por la realización de las fotografías.

A mis compañeros de la cátedra de Ecología de Parásitos de la Facultad de Ciencias Exáctas, Dres Cristina Wisnivesky-Colli, Ricardo Gurtler y Rosario Petersen, por su influencia en el conocimiento epidemiológico.

A los Dres Julio Lázzari por la interpretación de los ECG, y A. Costa por la investigación anatomopatológica. Al Dr Amadeo Barousse por su enseñanza clínica y al Dr M.Barón por su apoyo académico.

A la memoria del Dr. Alfredo Lanari.

Al personal técnico del bioterio del INDIECH y a todo el personal del Instituto que con su trabajo posibilitan la infraestructura adecuada para la labor sistemática de Investigación.

A la Dra. Fanny Ibarra y al Dr Luis Ledesma Medina del Hospital Regional de Termas de Río Hondo.

Al Servicio Nacional de Chagas de la Provincia de Córdoba.

Al Ministerio de Salud y Acción Social de la Provincia de Santiago del Estero.

A la comunidad rural de Santiago del Estero.

A las Instituciones Nacionales e Internacionales que con su financiamiento posibilitaron la realización de estas investigaciones: Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación. Subsecretaría de Salud. Secretaría de Ciencia y Tecnología. Organización Mundial de la Salud. Programa Nacional de Investigación en Enfermedades Endémicas. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Programa Especial de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR/WHO/WB/UNDP), RSG/ Long Term Research Grant María Project.

I N D I C E

INTRODUCCION

1.1:	Epidemiología de la Enfermedad de Chagas.	I
1.2:	Agente etiológico de la Enfermedad de Chagas.	3
1.3:	Ciclo de vida del parásito.	5
1.4:	Curso de la infección y patología de la Enfermedad de Chagas.	7
1.4.1:	Enfermedad aguda.	8
1.4.2:	Forma latente o indeterminada	10
1.4.3:	Enfermedad crónica	11
1.5:	Modelos experimentales de la Enfermedad de Chagas.	13
1.5.1:	Modelo mono.	14
1.5.2:	Modelo rató .	16
1.5.3:	Modelo conejo.	18
1.5.4:	Modelo perro.	20
1.6:	Dinámica de la transmisión del <u>T.cruzi</u> .	22
1.6.1:	Transmisión por vía entomológica.	23
1.6.2:	Transmisión por vía transfusional.	24
1.6.3:	Transmisión congénita.	25
1.6.4:	Transmisión contaminativa o por vía digestiva.	
1.6.5:	Transmisión por otros insectos hematófagos.	28
1.6.6:	Otras vías de transmisión.	28
1.7:	Dinámica de la Transmisión Vectorial. El Domicilio y el Peridomicilio.	31
1.8:	Infección por <u>T.cruzi</u> en el hombre y en los animales domésticos.	35
1.9:	Reservorios silvestres y domésticos.	35
1.10:	Animales domésticos y del peridomicilio.	37
1.11:	Estudios realizados en poblaciones caninas rurales.	39
1.12:	Interacción entre los principales hospedadores del ciclo doméstico.	41
1.13:	Transmisión de <u>T.cruzi</u> en niños menores de 10 años y en perros.	42

1.14:	Interpretación de la relación hospedador canino-parásito desde el punto de vista epidemiológico e inmunopatológico como modelo experimental de infección y enfermedad.	43
2.0:	OBJETIVO	44
3.0:	MATERIALES Y METODOS	
3.1:	APROXIMACION AL CONOCIMIENTO DEL MODELO CANINO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS. UNA EVALUACION DE SUS VENTAJAS Y LIMITACIONES.	45
3.1.1:	Animales empleados.	45
3.1.1.1:	Perros.	45
3.1.1.2:	Katones.	45
3.1.2:	Infección de los perros.	46
3.1.2.1:	Estudios Previos.	46
3.1.2.2:	Cepas y dosis para la infección de canes por <i>T. cruzi</i> .	47
3.1.2.2.1:	Cepa Argentina I (CA-I).	48
3.1.2.2.2:	Cepa Tulahuén (Tul).	49
3.1.3:	Esquema experimental	51
3.1.4:	Períodos clínicos de la infección experimental en canes.	51
3.1.5:	Estudios en los lotes controles y evaluación del perfil de infección de los inoculados.	53
3.1.5.1:	Estudios serológicos.	53
3.1.5.1.1:	Fijación de complemento.	53
3.1.5.1.2:	Inmunofluorescencia indirecta.	54
3.1.5.1.3:	Hemaglutinación indirecta.	54
3.1.5.1.4:	Aglutinación directa.	55
3.1.5.1.5:	Reacción inmunoenzimática de ELISA.	55
3.1.5.1.6:	Sueros controles de reactividad.	56
3.1.5.1.7:	Sueros controles de no reactividad.	56
3.1.5.2:	Estudios parasitológicos.	57
3.1.5.3:	Estudios clínicos.	57
3.1.5.4:	Estudios anátomo-patológicos.	58
3.2:	ADAPTACION DE LAS REACCIONES SEROLOGICAS AL ESTUDIO DE SUEROS CANINOS.	60
3.2.1:	Sueros empleados.	60
3.2.2:	Lotes de animales y estudios realizados.	60
3.2.3:	Evaluación de una solución conservadora de sueros caninos.	62

3.3:	METODOLOGIA APLICADA AL CONOCIMIENTO DE LOS PARAMETROS BASICOS POBLACIONALES DE CANES DE AREAS ENDEMICAS PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	64
3.3.1:	Características del área epidemiológica empleada.	64
3.3.1.1:	Ubicación geográfica y perfil socio- cultural.	64
3.3.1.2:	Cobertura médico-sanitaria de los habitantes de la zona.	67
3.3.1.3:	Tipificación de las viviendas del área.	68
3.3.1.4:	Evaluación entomológica de las viviendas.	69
3.3.1.5:	División de la zona en estudio de acuerdo a la distancia a la ciudad de Termas	69
3.3.1.6:	Selección de las viviendas y topografía del área.	74
3.3.2:	Encuesta epidemiológica realizada a los dueños de los perros incorporados a este estudio.	74
3.3.2.1:	Codificación.	75
3.3.2.2:	Descripción.	75
3.3.2.3:	Cuestionario.	75
3.3.2.4:	Características físicas.	75
3.3.3:	Metodología de evaluación del perfil de infección de los animales estudiados.	76
3.3.3.1:	Número de perros estudiados.	76
3.3.3.2:	Estudios efectuados en terreno.	76
3.3.3.2.1:	Estudios serológicos.	77
3.3.3.2.2:	Estudios parasitológicos.	77
3.3.3.2.3:	Estudios clínicos.	79
3.3.3.3:	Estudios realizados en el laboratorio.	79
3.3.3.3.1:	Estudios serológicos.	79
3.3.3.3.2:	Estudios parasitológicos.	79
3.3.3.3.3:	Estudios clínicos.	80
3.4:	EVOLUCION DE LA INFECCION POR <i>T.cruzi</i> EN PERROS.	81
3.4.1:	Comparación entre los perfiles de infecc de perros experimental y naturalmente infectados con <i>T.cruzi</i> .	81
3.4.2:	Parámetros de infección.	81
3.4.2.1:	Comparación de los perfiles parasitológi- cos y serológicos entre la infección natural y experimental.	81

3.4.2.2: Comparación de los resultados de morbilidad entre canes natural y experimentalmente infectados con <u>T.cruzi</u> .	82
3.4.3: Limitaciones metodológicas y operativas de la comparación entre canes natural y experimentalmente infectados.	82
3.5: Estudios estadísticos.	83
4.0: RESULTADOS	84
CAPITULO I: MODELO CANINO DE LA INFECCION Y ENFERMEDAD PRODUCIDA POR <u>T.cruzi</u> .	84
4.1: Estudios previos a la inoculación con <u>T.cruzi</u>	84
4.2: Estudios posteriores a la infección provocada con cepas de <u>T.cruzi</u> .	84
4.2.1: Supervivencia de los animales.	84
4.2.2: Estudios parasitológicos de perros experimentalmente infectados con <u>T.cruzi</u> .	84
4.2.2.1: Estudios parasitológicos por xenodiagnóstico de perros inoculados con una cepa de baja virulencia (CA-I).	85
4.2.2.2: Estudios parasitológicos por xenodiagnóstico de perros inoculados con una cepa virulenta (Cepa Tul) de <u>T.cruzi</u> .	86
4.2.3: Estudios serológicos de perros infectados en el laboratorio con cepas CA-I y Tul de <u>T.cruzi</u> .	91
4.2.3.1: Reactividad serológica.	91
4.2.3.2: Estudio de los títulos máximos en la evolución de la infección canina por la cepa CA-I.	92
4.2.4: Estudios electrocardiográficos realizados en lotes de perros infectados experimentalmente con <u>T.cruzi</u> .	93
4.2.4.1: Estudio de los canes inoculados con la cepa CA-I.	93
4.2.4.2: Estudios electrocardiográficos en perros infectados experimentalmente con la cepa Tul.	98
4.2.5: Sintomatología clínica en perros experimentalmente infectados con <u>T.cruzi</u> . Animales de L IV.	100
4.2.6: Estudios anátomo-patológicos en perros experimentalmente infectados con <u>T.cruzi</u> .	101

4.2.6.1: Animales inoculados con la cepa CA-I (Lotes I y II).

4.2.6.2.- Animales inoculados con la cepa Tul.

4.3: Estudios en lotes de animales controles.

4.4: DISCUSION DEL CAPITULO I.

CAPITULO II: ADAPTACION DE LAS REACCIONES SEROLOGICAS ANTI T.cruzi A SUEROS CANINOS.

5.1: Reacciones serológicas adaptadas a sueros caninos: Estudio del titulominimo diagnóstico.

5.1.1: Reacción de hemaglutinación indirecta.

5.1.2: Reacción de inmunofluorescencia indirecta.

5.2: Sensibilidad de las reacciones serológicas normatizadas.

5.3: Estudio de la discordancia entre dos reacciones serológicas.

5.3.1: Sueros de canes parasitémicos.

5.3.2: Sueros de canes no parasitémicos.

5.4: Correlación entre resultados parasitológicos y serológicos.

5.5: Empleo de la reacción inmunoenzimática de ELISA para el estudio de la discordancia entre IFI y HAI de sueros de perros no parasitémicos.

5.6: Empleo de la reacción de fijación de complemento para el seguimiento de perros experimentalmente infectados con T.cruzi.

5.7: Conservación de sueros caninos. Normatización de métodos de conservación de sueros y evaluación de los títulos serológicos de 100 sueros caninos con y sin el empleo de conservador.

5.7.1: Diferencia de títulos entre muestras puras y glicerizadas sin discordancia serológica.

5.7.2: Diferencias de títulos sobre muestras puras y glicerizadas con discordancia serológica.

5.8: DISCUSION DEL CAPITULO II.

CAPITULO III: ANALISIS DE LOS PARAMETROS POBLACIONALES Y SU RELACION CON LA INFECCION POR <u>T.cruzi</u> EN CANES DE UN AREA ENDEMICA DE ARGENTINA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	127
6.1: Características estructurales de las viviendas incorporadas al estudio.	127
6.1.1: Distribución de viviendas e infestación por triatominos.	127
6.1.2: Grado de infestación por triatominos de las viviendas seleccionadas.	127
6.2: Características de la población canina sujeta a estudio.	130
6.2.1: Densidad poblacional canina por vivienda.	130
6.2.2: Edad, sexo y función de los animales en la vivienda rural.	132
6.2.2.1: Edad.	132
6.2.2.2: Sexo	133
6.2.2.3: Características ocupacionales de los animales censados según diferenciación por área.	135
6.2.2.4: Hábitos alimentarios y de caza de los canes de estudio.	135
6.3: Dinámica de la infección por <u>T.cruzi</u> en canes de área endémica.	136
6.3.1: Perfil parasitológico de infección.	136
6.3.2: Perfil serológico de la infección en machos y hembras de área endémica.	136
6.3.3: Evaluación y comparación del perfil de infección para las distintas subáreas.	137
6.3.4: Asociación entre los niveles de infestación y dinámica de infección.	140
6.3.4.1: Animales que se desarrollaron en un ambiente post-rociado.	140
6.3.4.2: Animales que se desarrollaron en un ambiente no controlado para el desarrollo de triatominos.	140
6.3.5: Comparación entre perfiles de infección de perros mayores de un año clasificados según su rol.	140
6.3.6: Comparación entre perfiles de infección de perros clasificados según su estado general.	141

6.3.7: Morbilidad en perros de área endémica evaluada por estudios clínicos de electrocardiografía.	142
6.3.8: Migración.	143
6.3.9: Aproximación a un estudio de riesgo.	146
6.3.9.1: Número de viviendas habitadas por lo menos por un perro parasitémico.	146
6.3.9.2: Influencia de los materiales de construcción en el perfil de infección de los canes.	146
6.4: DISCUSION DEL CAPITULO III.	150
CAPITULO IV: EVOLUCION DE LA INFECCION NATURAL Y EXPERIMENTAL POR <u>T.cruzi</u> EN CANES.	158
7.1: Comparación entre los perfiles parasitológicos de canes infectados en condiciones naturales y experimentales.	158
7.1.1: Etapa aguda de la infección.	158
7.1.1.1: Infección experimental.	158
7.1.1.2: Infección natural. Comparación con el perfil parasitológico de la infección experimental.	159
7.1.2: Curso de la parasitemia en la etapa crónica de la infección.	159
7.1.2.1: Infección experimental.	159
7.1.2.2: Infección natural. Comparación con los resultados de la infección experimental.	159
7.2: Comparación entre los perfiles serológicos de canes infectados en condiciones naturales y experimentales.	160
7.2.1: Infección experimental.	160
7.2.2: Infección natural.	160
7.3: Comparación entre prevalencias de morbilidad de canes infectados en el laboratorio y en terreno. Estudio de la Proporción Atribuible (PA) a la infección por <u>T.cruzi</u> en las alteraciones ECG.	161
7.4: DISCUSION DEL CAPITULO IV Y DISCUSION FINAL.	166
8.0: CONCLUSIONES.	168
9.0: RESUMEN	170
10.0: BIBLIOGRAFIA	
11.0: APENDICE	

ABREVIATURAS

AD	=	aglutinación directa
api	=	años post infección
Bl.S.A	=	bloqueo sino-auricular de 2º grado
BS	=	bradicardia sinusal
C	=	perros cazadores
ca	=	perros cabreros
CA-I	=	cepa Argentina I
conj	=	conjuntival
d	=	desviación standart
dpi	=	días post infección
dpr	=	días post reinoculación
EA	=	extrasístoles auriculares
ECG	=	electrocardiogramas
ELISA	=	reacción inmunoenzimática de ELISA
EV	=	extrasístoles ventriculares
FC	=	fijación de complemento
g	=	perros guardianes
HAI	=	hemaglutinación indirecta
HBAI	=	hemibloqueo anterior izquierdo
HT	=	homogenato total de <u>T.cruzi</u>
I	=	área intermedia
I*	=	inoculación
IO	=	alteración ECG en los no expuestos
I1	=	alteración ECG en los expuestos
IFI	=	inmunofluorescencia indirecta
ip	=	intraperitoneal
L I	=	lote I ..
L D	=	lote D .
L C	=	lote C .
L B	=	lote B . (lotes del Cap. de Serología) .
L A	=	lote A .
L IV	=	lote IV ..
L III	=	lote III..
L II	=	lote II.,. (lotes del Cap. de Infección)..
l/m	=	latidos/minuto
M	=	mediana
M†	=	muerte
MA	=	media armónica
mpi	=	meses post infección
N	=	negativo
P	=	positivo
p/v	=	peso/volumen
PA	=	proporción atribuible
Pe	=	área periurbana
Pi	=	prevalencia de infección por serología
PM	=	perros migrantes
PNM	=	perros no migrantes
PNP-AE	=	perros no parasitémicos de área endémica
PNP-BA	=	perros no parasitémicos de Buenos Aires
PP-AE	=	perros parasitémicos de área endémica
Px	=	prevalencia de infección por xenodiagnóstico
R 2	=	segunda reinoculación
R 1	=	primera reinoculación
R	=	área rural
R*	=	reinoculación
RT	=	razón de tasas
Rt	=	relación de machos por hembra

S = sacrificio
spr = semanas post reinoculación
TR = tripomastigotes de ratón
tri = tripomastigotes
Tul = Tulahuén
V = parásitos procedentes de materia fecal de vinchucas
V1-6 = derivaciones precordiales (punto 1-punto 6)
VPM = viviendas de pobladores migrantes
VPS = viviendas de pobladores sedentarios
x+ = xenodiagnóstico +
x- = xenodiagnóstico -
X² = prueba estadística de x²
Xeno = xenodiagnóstico

INTRODUCCION

1.1.- EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

La Enfermedad de Chagas es una entidad mórbida que afecta a gran número de pobladores rurales y urbanos de Meso, Centro y Sud América. Esta afección es provocada por un zooflagelado, el Trypanosoma cruzi y transmitida por vía contaminativa entre otras, por un insecto del orden Hemiptera, familia Reduviidae, que en nuestro país es el Triatoma infestans. Debido a la envergadura de su distribución, esta parasitosis representa un acuciante problema médico-social.

La Organización Mundial de la Salud (WHO) reconoce un total de 90 millones de personas en riesgo de infección y de 16 a 18 millones de infectados (1) en un área que se extiende desde el Sur de EE.UU hasta el paralelo 42 de latitud sur (2).

Evaluaciones realizadas en nuestro país en los últimos años dieron cuenta de una disminución del porcentaje de infectados como consecuencia de sucesivas campañas de control del vector (3). Es bien conocido que para implementar medidas de control de la enfermedad de Chagas se requiere primero conocer los mecanismos que favorecen la trasmisión de T.cruzi. En el área rural se recomienda el uso de programas sanitarios con apoyo comunitario y en poblaciones urbanas el control de los bancos de sangre. Si bien la epidemiología pone de manifiesto los mecanismos de interacción entre los ciclos doméstico y silvestre, es necesario el estudio de su dinámica para interpretar de qué manera cada elemento modifica la transmisión.

La interrelación entre vectores y reservorios, sean domésticos o silvestres, es ejemplo de este proceso dinámico donde el hombre es uno de los hospedadores. El T.cruzi aún continúa en su forma zoonótica original, y su transmisión de biotopos naturales a artificiales puede haberse efectuado por diversos mecanismos. La invasión ocasional de biotopos artificiales por insectos triatominos selváticos, la infestación inicial de biotopos artificiales, la adaptación domiciliaria de triatominos silvestres y la invasión de ecotopos por mamíferos silvestres pueden ser algunos de ellos (4). Diversas especies de vectores se han adaptado al ambiente doméstico. T.infestans es el más importante vector de Argentina, Brasil y Chile y es domiciliario obligado, excepto en el valle de Cochabamba en Bolivia donde existen focos selváticos residuales (5). El norte de Chile estuvo habitado por tribus de indios Wantara, que 500 años antes de Cristo se establecieron en esa zona procedentes de Bolivia. Se cree que estas tribus fueron las primeras que abandonando hábitos cazadores, se hicieron sedentarias y construyeron en esa región viviendas de adobe o piedra y techo de enramada, similares a las viviendas rurales latinoamericanas actuales. Los hallazgos de evidencias arqueológicas de infección chagásica en momias podrían ser interpretados como la primer colonización por triatominos de viviendas paleoindias, de manera tal que los vectores pueden haber sido transportados por estas tribus tomando a Bolivia como centro de dispersión. Esta hipótesis tendría por soporte la observación que en Chile los pacientes presentan síntomas clínicos de mayor benignidad que en Brasil, donde la asociación entre vectores domésticos y T.cruzi es más reciente (5).

La Enfermedad de Chagas desplegada a través de América Latina durante los últimos 250 años es resultado de intensivos cambios sociales y de la continua intervención humana en el medio ambiente. Esta endemia es un fenómeno bio-ecológico y social muy particular que afecta las áreas rurales y más pobres del continente (6). La precariedad de las viviendas, la falta de higiene, el uso de ciertos materiales autóctonos que favorecen la cría de reduvidos y la desinformación dificultan la implementación de programas de prevención y control, que aunque rudimentarios, tienen por fin paliar la grave situación sanitaria de la mayoría de los países latinoamericanos.

1.2.- AGENTE ETIOLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

El agente causal fue descrito por Carlos Chagas en 1909 en el intestino medio de Pastronqilus meqistus, un hemiptero hematófago que infestaba chozas del estado de Minas Gerais en Brasil (7). Chagas lo denominó Trypanosoma cruzi, y logró posteriormente transmitirlo a un mono Callithrix sp. por picadura del vector, y por subinoculación a dos cobayos de laboratorio. Posteriormente lo encontró en la sangre de una niña de dos años y lo subinoculó a otros dos cobayos (7).

Aunque Chagas consideró en 1911 que la infección mediada por el vector era inoculativa (7), fue en 1923 cuando sugirió que se trataría de una infección contaminativa, a partir del contacto de las heces del insecto con la piel erosionada por la picadura (8).

Según estudios de Hoare (9), la ubicación taxonómica del parásito es la siguiente:

Filum: PROTOZOA
Subfilum: SARCOMASTIGOPHORA
Superclase: MASTIGOPHORA
Clase: ZOOMASTIGOPHORA
Orden: KINETOPLASTIDA
Suborden: TRYPANOBOMATINA
Familia: TRYPANOBOMATIDAE
Género: TRYPANOBOMA
Subgénero: SCHIZOTRYPANOBOMA
Especie: CRUZI

Es un parásito unicelular, eucarionte, que utiliza un flagelo como medio de locomoción; este flagelo está formado por un axonema central y por una vaina externa que es continuación de la membrana celular. El axonema está formado por 9 pares de microtúbulos periféricos y dos centrales, rodeados por una vaina interna. El flagelo puede introducirse en el citoplasma celular, y formar la membrana ondulante. Como en otros tripanosomátidos, tiene una estructura filamentosa y en forma de látigo, la estructura paraaxial caña paraflagelar. Esta aparece en la transformación entre los estadios epi y tripomastigote, aunque no en la forma esferomastigote de T. cruzi. Esta estructura mantiene una posición fija respecto de los microtúbulos del axonema y se ubica en una región próxima a los dobletes 4 y 7 (10).

En el citoplasma hay una estructura denominada cuerpo basal, blefaroplasto o cinetosoma, de donde parte el axonema. Cerca del cinetosoma se encuentra el cinetoplasto, una estructura esférica ó en forma de disco constituida por una doble membrana que encierra material fibrilar identificado como ADN, y que es parte de la mitocondria del parásito. A veces ambas estructuras están tan próximas que al microscopio óptico se ven como un solo cuerpo. Rodeando al cuerpo celular, debajo de la membrana existe un sistema de microtúbulos que le confiere resistencia al parásito. El retículo endoplasmático rugoso está bien

desarrollado y el aparato de Golgi está ubicado entre el núcleo y el cinetosoma.

Marcadores para el estudio de incorporación de partículas confirmaron que la ingestión se produce por un proceso de pinocitosis a través del citostoma. Esta estructura está presente en los epimastigotes pero no en los tripomastigotes, en los que la pinocitosis ocurre a través de la región del bolsillo flagelar (11).

1.3.- CICLO DE VIDA DEL PARASITO:

El T.cruzi evoluciona en insectos hematófagos reducidos que al ser ingerido cumple un ciclo biológico caracterizado por ciertas alteraciones morfológicas que ocurren a largo del tubo digestivo de esos vectores.

El T.cruzi es diploide pero su reproducción es básicamente clonal, y presenta recombinación genética escasa o nula (12). Es un protozoo parásito digenético. En su ciclo de vida es endoparásito obligado, y es huésped de insectos y mamíferos.

Días en 1934 (13) realizó una descripción sistematizada del ciclo de T.cruzi en su vector. Según su descripción, los tripomastigotes sanguíneos (tri) sufren transformaciones poco acentuadas en el mesenterón de los triatomíneos, pasan al intestino medio, y allí se diferencian en epimastigotes que se multiplican intensamente. Llegan al recto donde se transforman en tri metacíclicos infectantes, los cuales son eliminados con las heces durante ó después de su alimentación sanguínea. Brack en 1968 (14) estudió el ciclo evolutivo en Rhodnius prolixus y observó que las formas de sangre se transforman en "esferomastigotes" en el mesenterón del vector, formas

redondeadas provistas de un pequeño flagelo. Parte de los esferomastigotes se transforman en epimastigotes cortos y largos. Estos últimos alcanzan precozmente la porción terminal del tubo digestivo y no se transforman en tri metacíclicos; los cortos se transforman en epimastigotes y renuevan el ciclo. Los restantes esferomastigotes serían competentes para diferenciarse en tri metacíclicos (15). Los vectores reducidos defecan durante e inmediatamente después de la alimentación, por este motivo los tri son excretados en el entorno del área picada por el insecto; este hecho y la respuesta refleja de rascarse después de la picadura favorecen la invasión al huésped mamífero.

Se describieron dos formas de tri "slender" o fina y "stout" o "broad" gordos responsables de diferencias en la duración del período prepatente, en la infectividad y en la mortalidad de animales inoculados (15), aunque no se establecieron diferencias en el metabolismo respiratorio entre ambas formas (16). El diferente comportamiento estaría asociado a una distinta habilidad de penetrar los tejidos y a resistir los mecanismos inmunes del hospedador vertebrado. Sin embargo, actualmente estas diferencias morfológicas estarían asociadas al concepto de clon (17).

En el hospedador vertebrado, las formas infectantes, luego de su inoculación penetran en células de distintos tejidos y después de tres ó cuatro días se transforman en amastigotes, se reproducen por fisión binaria, se rompe la célula parasitada y se liberan los parásitos que invaden nuevas células para rehacer el ciclo.

Los parásitos de distintas cepas se clasificaron en mio, neuro o reticulotrópicos (16), pero la base de este tropismo es

desconocida y no siempre hay acuerdo entre los resultados in vivo e in vitro (17). En un estudio realizado sobre el parasitismo tisular de la cepa Y de T.cruzi, habitualmente miotrópica en ratones Swiss, se confirmó que el macrófago-tropismo puede ser artificialmente inducido como resultado del mantenimiento de la cepa en ratón por más largo tiempo ó del uso de animales jóvenes (19).

Las distintas formas del parásito son cultivables in vitro en medios axénicos: desde hace muchos años para los epimastigotes (20), y más recientemente, para tri y amastigotes.

Es posible obtener amastigotes vía tri mediante el empleo del medio F-69 libre de células y mantener los cultivos seriados a 37°C . Estudios de ultraestructura confirmaron la presencia de formas transicionales entre epi y tri y entre tri y amastigotes diferenciados a partir de la estructura del kinetoplasto y de la membrana celular (20).

La incubación in vitro de epimastigotes vivos de T.cruzi con suero que contenía anticuerpos específicos anti T.cruzi en presencia de inmunoglobulinas específicas de especie marcadas con isotiocianato de fluoresceína no indujo agregación de antígenos de superficie, pero cuando fueron incubados tri con suero inmune y con inmunoglobulinas de especies anti-homólogas hubo agregación con formación del fenómeno de capping. Se observó que las distintas cepas de T.cruzi reaccionan de manera similar (21).

1.4.- CURSO DE LA INFECCION Y PATOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

Se describen tres formas de presentación de la Enfermedad de Chagas: la enfermedad aguda, una forma latente o indeterminada,

y la crónica, en el humano y en los modelos experimentales de esta enfermedad. En el Comité de expertos para el control de la enfermedad de Chagas de la OMS, Lazzari en 1989 (22) diferenció dos estadios, uno agudo de corta duración y otro crónico que comienza cuando el cuadro clínico de la fase aguda ha cedido y la parasitemia está por debajo del límite de detección por observación directa. El período subclínico de la fase crónica comienza a las 8-10 semanas de terminado el agudo, independientemente de la presencia de manifestaciones clínicas. Se estima que el 40-50% de los pacientes pueden evolucionar hacia la etapa crónica con compromiso clínico, caracterizada por sintomatología cardíaca, digestiva y la que involucra al sistema nervioso (22). Estas formas pueden considerarse diferentes fases de la enfermedad, aunque no todas se presentan en los infectados.

1.4.1.- Enfermedad aguda:

Es una enfermedad febril que tiene lugar preferentemente en la infancia y con mortalidad relativamente baja. En nuestro país, la forma aguda suele ser más severa en los niños, y es mayor el índice de mortalidad en la primera infancia. Se ha descrito un 9% de casos fatales caracterizados por miocarditis intensa con insuficiencia cardíaca y/o meningoencefalitis (23).

Cuando el sitio de entrada es la conjuntiva se produce un edema bipalpebral y unilateral llamado signo de Romaña. La presencia sobreagregada de reacción ganglionar satélite produce el "complejo oftalmo-ganglionar". Se observan en general "dacrioadenitis" o inflamación de la glándula lacrimal y

dacriocistitis o inflamación del saco lacrimal. Cuando la puerta de entrada es cutánea se produce un chagoma o chancro de inoculación. El signo de Romaña y el chagoma de inoculación son indoloros o levemente dolorosos y son más duraderos que las lesiones por otras infecciones, y pueden involucionar al cabo de uno o dos meses (23). También puede presentarse el "complejo cutáneo-ganglionar" con adenopatía satélite. Las lesiones histopatológicas se caracterizan por un infiltrado de células inflamatorias, predominantemente mononucleares y parasitismo intracelular de los macrófagos tisulares (23).

El hemograma muestra una anemia discreta, leucocitosis, aumento de linfocitos y monocitos. En el aparato circulatorio, taquicardia con ó sin hipotensión, cardiomegalia con aumento de ambos ventrículos sobre todo del izquierdo, soplos cardíacos y derrame pericárdico. En S.N. se presenta meningoencefalitis en niños pequeños, cefaléas, postración o excitación cerebral, delirio, somnolencia o insomnio (23).

Estudios asociados al seguimiento electrocardiográfico de la etapa aguda, metodología auxiliar de laboratorio y de diagnóstico diferencial son abundantes en la bibliografía (23,24,25).

El cuadro histopatológico de la miocarditis chagásica aguda tiene tres elementos básicos: la inflamación de las células mononucleares en el espacio intersticial, los procesos degenerativos variables en las fibras miocárdicas y el desarrollo de quistes de amastigotes. Los infiltrados inflamatorios varían en intensidad y extensión, dependen de la reacción inmunoalérgica del individuo, en lugar del número total de parásitos presentes. La inflamación puede ser leve y localizarse en cualquier área de la masa muscular del corazón, o en otros

casos puede ser extensa y densa, y afectar a todo el miocardio. La morfología del corazón depende de la extensión y densidad del infiltrado inflamatorio. Si es leve en áreas reducidas no muestra alteraciones morfológicas, las paredes ventriculares son normales y tienen tono. Si por el contrario es denso y extenso, se modifica la forma cardíaca, desaparece el septo interventricular y las paredes de los ventrículos se tornan flácidas (26,23). En estos casos en la Anatomía Patológica se observan corazones de tamaño normal, pero los estudios radiológicos muestran corazones de mayor tamaño y con agrandamiento de diversas cavidades. En ratones chagásicos agudos infectados con la cepa Brazil de T.cruzi sometidos a perfusión con siliconas para llenar arteriolas, capilares y vénulas del corazón se observaron numerosas áreas de constricción vascular focal, formación de microaneurismas, dilatación y proliferación de capilares, referencia de una microcirculación miocárdica anormal provocada por la infección (27).

La neuropatía asociada a la enfermedad experimental aguda en ratones infectados con la cepa CL consistió en la observación en el sistema nervioso periférico de leves infiltrados de linfocitos y macrófagos asociados a parásitos intracelulares, con daño leve o escaso en este estadio de la enfermedad (28).

1.4.2.- Forma latente o indeterminada:

En esta fase no se encuentran manifestaciones clínicas de la enfermedad. Puede haber parasitemia, detectada por métodos de enriquecimiento ó indirectos, pero en humanos es muy poco probable la observación directa de parásitos. En pacientes y en animales experimentalmente infectados se observó en esta etapa la

persistencia indefinida de parasitemia. Hasta ahora no se observó la certera eliminación de parásitos en este período.

1.4.3.- Enfermedad crónica:

La forma crónica de la enfermedad se inicia con la aparición de síntomas y signos clínicos en pacientes infectados parasitémicos o no.

Las miocarditis se exteriorizan por perturbaciones del ritmo desde extrasistolias hasta bloqueos de todo tipo y localización. En forma progresiva se puede llegar a la insuficiencia cardíaca o al síncope con muerte súbita. Algunos enfermos presentan ahogos, palpitaciones, dolores precordiales o crisis anginosas (23).

Manifestaciones dependientes de la inmunidad mediada por células contra los tejidos del hospedador fueron comprobadas en conejos y ratones infectados con T.cruzi. Este fenómeno se puede asociar a la presencia de lesiones tisulares, que no fué comprobado hasta ahora en humanos. La transferencia de linfocitos T de ratones infectados con T.cruzi a ratones normales generó en éstos miocarditis y miositis (29). En la etapa crónica, los individuos poseen anormalidades electrocardiográficas compatibles con lesiones cardíacas de muy variada intensidad. La Tabla I resume prevalencias de alteraciones electrocardiográficas en pacientes serorreactivos de Argentina y Brasil.

TABLA I

Alteraciones electrocardiográficas en pacientes con serología reactiva anti T.cruzi.

ALTERACIONES	ARGENTINA Rosebaum* 1955	ARGENTINA Capris* 1957	ARGENTINA Bonet & 1981	BRASIL Laranja * 1956
Anormalidades de la onda P	26 (23%)	17 (15%)	S.I.	73 (10%)
Bloqueo AV (I-II)	8 (7%)	27 (24%)	10 (0.3%)	192 (28%)
Bloqueo AV total	5 (4%)	16 (14%)	S.I.	56 (8%)
Bloqueo IV incompl.(rama der)	S.I.	7 (6%)	43 (1.5%)	22 (3%)
Bloqueo completo (rama der)	63 (56%)	60 (54%)	85 (30%)	330 (48%)
Bloqueo compl. (rama izq)	3 (2%)	10 (10%)	S.I.	15 (2%)
Bloqueo incompl (rama izq.)	S.I.	4 (4%)	S.I.	S.I.
Extrasístoles ventric.	61 (54%)	73 (66%)	17 (0.7%)	291 (43%)
Taquicardia parox. auric.	S.I.	3 (3%)	1 (0.9%)	2 (0.3%)
Taquicardia parox.ventric.	S.I.	2 (2%)	7 (6.4%)	14 (2%)
Aleteo auricular	S.I.	3 (2%)	5 (4%)	S.I.
Fibrilación auricular	S.I.	24 (22%)	14 (13%)	45 (7%)
Daño miocárdico	S.I.	56 (51%)	65 (57%)	308 (45%)

AV = aurículo-ventricular
IV = intraventricular
auric = auricular

bloq.= bloqueo
parox.= paroxística
ventric = ventricular

(*) Recopilados por Cecilio Romaña en 1963 (30).

(&) Prevalencias de alteraciones ECG en los ciudadanos 1947 de Santiago del Estero (31).

En la forma digestiva crónica existe un aumento del diámetro de algunas partes del tubo digestivo, principalmente del esófago y colon, y hay alteraciones de la motilidad. Concomitantemente con la cardiopatía chagásica pueden observarse megaesófagos o megacolon. El megaesófago chagásico se encuentra más frecuentemente en la zona central de Brasil, y se observa un neto predominio de sexo masculino sobre todo entre los pacientes de 20 a 49 años. El megacolon también es más frecuente en Brasil que en otras zonas endémicas, como las de nuestro país. Los

megaórganos suelen provocar disfagia, odinofagia, regurgitación, constipación intestinal, sialosis e hipertrofia de glándulas salivares y desnutrición (32).

La respuesta inmune defiende al huésped contra los efectos nocivos de la invasión parasitaria, desde la etapa aguda de la infección por medio del control de la parasitemia y en el equilibrio huésped-parásito para llevar la infección a cronicidad. A pesar del papel defensivo de la respuesta (inmunidad concomitante), esta actividad no logra eliminar totalmente al parásito del huésped y posiblemente sea por responder de manera insuficiente en la eliminación del parásito, y/o por la presencia de diversos mecanismos de escape que el parásito ha desarrollado a lo largo de su evolución. Los mecanismos de evasión asociados al T. cruzi son la reclusión anatómica, fenómenos de capping y mecanismos de inhibición de la fagocitosis, mediante la lisis parcial de la membrana del fagosoma. Sin embargo, los intentos de detección de antígenos del hospedador vertebrado en los tripomastigotes sanguíneos de T. cruzi fueron hasta ahora infructuosos (33).

En la relación huésped-parásito existen componentes genéticas del huésped y del parásito, factores ambientales y de regulación, que modulan la actividad del sistema inmune (34,35).

Aún hoy la enfermedad crónica plantea interrogantes, sobre todo en relación a la inmunopatogenia de esta enfermedad. Por esta causa, reproducir la infección en animales para investigar esta evolución ha sido meta de numerosos investigadores.

1.5.- MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

Un modelo animal debe reproducir las características típicas descritas en los pacientes infectados naturalmente con T.cruzi con el objeto de ser empleados en estudios de inmunopatología, inmunoprofilaxia y evaluación de efectos quimioterápicos de drogas, entre otros.

Ratones y perros son altamente susceptibles a T.cruzi (17,36) Monos y conejos suelen ser más resistentes (37,38).

En julio de 1982 en el 5º Encuentro de Investigadores de la Enfermedad de Chagas realizado en Ginebra, OMS favoreció la redacción de un protocolo para el desarrollo de los modelos animales para la Enfermedad de Chagas basado en "Los Requerimientos para un modelo cró establecido en el 2º Encuentro realizado en abril de 1979 (39).

En esa oportunidad la propuesta incluyó una pormenorizada lista de requisitos:

Necesidad de proveer evidencias de la presencia de T.cruzi en el hospedador durante el período de observación por medio de hemocultivo (40), xenodiagnóstico (41), subinoculaciones ó histopatología. Tener serología positiva continua, por lo menos para dos reacciones serológicas normatizadas (Inmunofluorescencia, Hemaglutinación, Fijación de complemento (42). Evidenciar lesiones histopatológicas y alteraciones electrocardiográficas (ECG) semejantes a las encontradas en los humanos infectados. Asegurar certeza por medio del análisis estadístico y cuantificación de las alteraciones en los lotes de infectados y de controles. Con el propósito de normatizar métodos y criterios para el diagnóstico de la enfermedad crónica se recomendó enviar muestras de órganos y trazados ECG a los

especialistas propuestos por el Comité de Iniciativas creado para tal fin e intercambiar animales endocriados y cepas definidas de T.cruzi y protocolos empleados en los experimentos, detallando información de los métodos utilizados al comité.

Por su proximidad filogenética con el hombre, los primates no humanos han sido blanco de investigaciones para lograr un modelo experimental de esta enfermedad. Iniciamos con ellos esta recopilación, detallando a posteriori los logros alcanzados con el modelo ratón, conejo y por último con el perro.

Se relatan a continuación los objetivos, ventajas y limitaciones asociadas a algunos de los modelos experimentales ensayados, a partir de su utilización por Carlos Chagas (7).

1.5.1.- Modelo mono:

Los primates han sido inoculados experimentalmente desde 1909 con diversas cepas de T.cruzi (43,44).

Torres y col. en 1958 inocularon Cebus sp en mucosa, por vía conjuntival y subcutánea con parásitos provenientes de sangre y de deyecciones de insectos, y observó al año de la infección una miocarditis difusa intersticial con muy escasos amastigotas (44).

Marsden y col. en 1976 describieron la fase crónica temprana en monos Rhesus sp con especial énfasis en el seguimiento parasitológico (45).

Seah y col. en 1977 inocularon al Macaco mullatta, un mono del Viejo Mundo con la cepa Peruana de T.cruzi previa inmunización de material de cultivo liofilizado con Adyuvante completo de Freundt (46). En monos vacunados desafiados en el tejido subcutáneo del párpado con formas provenientes de vinchuca se provocó celulitis en la zona. No se observaron mayores

diferencias en el curso de la infección entre vacunados y controles de infección: todos mostraron parasitemia patente hasta los 50 días y posteriormente por subinoculación a animales de laboratorio. Los inmunizados y los controles evidenciaron una reacción de tipo tuberculina. Las autopsias revelaron muy escasos nidos de amastigotes en músculo cardíaco y abundantes en el sitio de la inoculación. La muerte anticipada de los infectados sugirió cierta protección inducida por el inmunógeno (46).

Bolomo y col. en 1980 (47) inocularon dos monos prepúberes con T.cruzi (cepa Argentina-I (CA-I)). A los 30-45 días post-inoculación (dpi), el xenodiagnóstico fue positivo y se detectaron anticuerpos EVI. A los 9 meses post-inoculación (mpi) se estableció en uno de ellos un hemibloqueo posterior izquierdo, onda T invertida, y bradicardia extrema que lo llevó a la muerte. En el otro mono, un hemibloqueo posterior izquierdo, bradicardia y contracciones ventriculares prematuras inducidas por la inyección de Ajmalina, un fármaco amplificador de las alteraciones electrocardiográficas (ECG). Un significativo megacolon se observó en ambos y en uno de ellos lesiones fibróticas en ventrículo izquierdo y en tejido de conducción (47).

La inoculación de Cebus apella jóvenes y adultos con las cepas CA-1, Tulahuén (Tul) y Colombiana mediante sucesivas reinoculaciones en dosis variables, provocó una etapa aguda sin parasitemia patente, y detección de T.cruzi por xenodiagnóstico hasta las 54 semanas en algunos animales. En 4/18 infectados se observó bloqueo completo de rama derecha, en particular los infectados con CA-1, y solo se registraron alteraciones histológicas secuelares de las sucesivas reinoculaciones o infiltrados focales. En dos animales inoculados con CA-1 se observó un megacolon (48).

La inoculación de machos adultos jóvenes Cebus apella con las cepas CA-1 y Tul indujo parasitemia patente en 1/20 y por xenodiagnóstico en todos durante el primer mes de infección. Reinoculaciones a los 500 dpi provocaron parasitemia por xenodiagnóstico en ambos lotes. Cuando se los reinoculó con altas dosis de CA-1 todos mostraron parasitemia patente y por xenodiagnóstico durante 7 meses. Los reinoculados con Tulahuen mostraron los más altos títulos de anticuerpos. Se hallaron lesiones focales ó multifocales de infiltrados y/o fibrosis secuelar aislada en 8/20, mientras que 4/16 y 4/4 reinoculados con CA-1 y Tul respectivamente, evidenciaron lesiones tisulares (37).

1.5.2.- Modelo ratón:

De todos los modelos animales de la enfermedad de Chagas el modelo ratón ha sido el más estudiado, por lo cual se tiene más información y es el universalmente empleado para estudios inmunológicos, farmacológicos, de inmunoprotección y bioquímicos entre otros.

La susceptibilidad del ratón a la infección aguda y crónica está relacionada con la base genética de este hospedador. La evolución de la infección aguda y crónica depende de la cepa de ratón utilizada. Infecciones provocadas por parásitos de la cepa Tul de T.cruzi en ratones Swiss, C3H y Balb/C provocaron respectivamente lesiones miocárdicas en el 46%, 74% y 22% (49), y se demostró además la susceptibilidad de la cepa Balb/C y la resistencia de la Swiss por estudios de mortalidad y del curso de anticuerpos fluorescentes y citotóxicos (50). Otro aspecto asociado al desarrollo del modelo murino es la heterogeneidad de información genética que existe en aislados o cepas de T.cruzi

provenientes del continente. Aislamientos para la obtención de clones de T.cruzi permiten desarrollar sistemas experimentales in vivo con poca variación genética (17). La evolución de la infección está modificada por la edad y el sexo de los ratones y por el número y origen de los parásitos (51,52).

Laguens y col. en 1980 utilizaron ratones machos de la cepa Swiss para someterlos a una infección con 20-25 tripanosomas de la cepa Tul inoculados por vía ip. Este protocolo permitió la supervivencia del 56% de los ratones a los 30 dpi. Los animales fueron sacrificados a los 3, 4 y 7 mpi. Estudios anatomopatológicos (AP) mostraron nidos intracelulares de amastigotes en músculo esquelético, cardíaco y en células musculares lisas del intestino grueso y de la vejiga urinaria. En la musculatura esquelética se observaron infiltrados inflamatorios intersticiales de células mononucleares, fibras con hialinización miocitolisis, y áreas con fibras musculares ausentes y reemplazadas por tejido adiposo. Las zonas focales más intensas se observaron en las aurículas y no hubo localización preferencial en el sistema de conducción (53). En ratones inoculados con la cepa Y, CL y Colombiana se comprobaron cambios hematológicos: anemia, leucocitopenia y trombocitopenia marcada en todos ellos, provocando un estadio crónico con la Colombiana y más severo con la Y (54).

Estudios ECG sistemáticos realizados al 1º, 3º, 6º y 12º mpi y previo sacrificio de algunos animales demostraron extrasístoles auriculares y ventriculares, bloqueo aurículo-ventricular de primero y segundo grado e incremento de la duración del complejo QRS en el 50% de los animales. Los infiltrados se ubicaron inicialmente en las aurículas, posteriormente en ambos ventrículos, y al año los focos

fibróticos se distribuyeron al azar con ausencia de infiltrados mononucleares (55). Veinte tri sanguineos y posteriores reinoculaciones provocaron bloqueo intraventricular, bloqueo de rama derecha y fibrilación auricular tal que el 95% de los animales con lesiones anatómicas evidenció alteraciones electrocardiográficas (56). Se logró transferir enfermedad cardíaca a ratones hembras Balb-C por inoculación de células inmunocompetentes esplénicas mononucleares no-adherentes, de otros ratones Balb-C infectados con T.cruzi. En los receptores, parasitemia y mortalidad fueron nulas (57).

Fracciones subcelulares de epimastigotes de T.cruzi se obtuvieron por presión-descompresión y fraccionamiento por centrifugación y ultracentrifugación en gradiente de sacarosa: flagelar (F) pellet de 5000 g; microsomal (Mi) pellet de 105.000 g. y fracción citoplasmática soluble (Cs) sobrenadante de 105.000 g. Se utilizaron ratones inmunizados y desafiados con T.cruzi según el modelo de infección de Laguens (53). De las tres subfracciones, F fue la que produjo menor parasitemia y protegió de la miocarditis chagásica en un alto porcentaje de animales. La fracción rica en flagelos y membranas sería un candidato antigénico apropiado para estudios de inmunoprotección (58). Alteraciones ECG similares a las observadas en humanos, miocarditis e intensa miositis en el 10% de los ratones inoculados se indujo con Mc y miocarditis con alteraciones electrocardiográficas en el 50% de los casos mediante el empleo de Cs (59).

1.5.3.- Modelo conejo:

Los conejos son resistentes a T.cruzi, las parasitemias desarrolladas son controladas y duran pocos meses (60).

Se ha estudiado el curso de la enfermedad en conejos blancos exocriados de Nueva Zelandia, que mostraron en la etapa aguda parasitemia patente y chagomas típicos. A veces esta fase es subclínica y se torna irreconocible. La fase indeterminada muestra parasitemia subpatente y ausencia de alteraciones electrocardiográficas, persistencia de pruebas serológicas y reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada contra antígenos del parásito como evidencia de la infección en curso. En la etapa crónica, alteraciones electrocardiográficas con agrandamiento y sobrecarga de las cámaras cardíacas, arritmias, ondas ectópicas, cambios S-T y bloqueo AV de diferente grado son encontrados frecuentemente. Hay correlación con las alteraciones descritas en humanos por ECG y AP que revelaron fallas cardíacas congestivas y tromboembolia pulmonar relacionada con la miocarditis chagásica, que son frecuentes causas de muerte.

En conejos experimentalmente infectados se registraron fallas cardíacas asociadas a la enfermedad de Chagas con mortalidad en el 53% y megacolon en el 2.9% de los casos, donde el megacolon fue la causa de muerte. Se obtuvieron fuertes reacciones de hipersensibilidad retardada con antígenos de T.cruzi de la cepa Ernestina y con escasa concentración de proteína. Estos antígenos provocaron lesiones caracterizadas por infiltrados mononucleares que persistieron 24 hs o más. Teixeira en 1984 enfatizó la aparición de manifestaciones clínicas, parasitológicas, inmunológicas y patológicas de la Enfermedad de Chagas similares a lo observado en humanos, en los conejos de endocria (60).

Sin embargo otros autores tuvieron evidentes dificultades para reproducir en el conejo el perfil de la infección humana. Chagas Lima y Silva en 1977 (61) inyectaron conejos con tejido cardíaco y adyuvante completo de Freundt para estudiar la inmunidad

humoral y celular. Demostraron el desarrollo de reacciones cruzadas entre sueros y corazón de las distintas especies empleadas. Reactividad por inmunoelectroforesis y hemaglutinación se relacionaron con la inmunización con extractos solubles y la reacción de inmunofluorescencia con los insolubles. La presencia de anticuerpos anticorazón y antimúsculo esquelético se demostró por hemaglutinación (61). Chiari en 1980 infectó conejos machos de Nueva Zelandia con tri de las cepas Y, CL Y MR por vía intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. En ningún caso se observaron alteraciones anatomopatológicas asociadas a la enfermedad de Chagas crónica. Los animales se estudiaron entre los 35 y los 180 dpi (62).

Ramirez y Brener en 1984 inocularon machos exocriados con las cepas Y, CL y Hermane. El 92.6% de los animales mostraron en la etapa aguda parasitemia patente y posteriormente, el 40% se detectó por xenodiagnóstico. Se registraron anticuerpos séricos de valor diagnóstico, anticuerpos líticos y lesiones cardíacas, tal que el 8% presentó lesiones severas crónicas que remedan la etapa crónica sintomática humana (63).

1.5.4.- Modelo perro:

En 1909 Carlos Chagas dió referencia de la susceptibilidad del perro a la infección por T.cruzi (44). En 1924 Villela (64) reprodujo experimentalmente un cuadro de parálisis en canes. En 1928 Souza Campos (65) describió la transmisión intrauterina experimental en perros. En 1937 Johnson inoculó perros con distintas cepas de T.cruzi y los estudió por anátomo-patología (66).

La Tabla II muestra la secuencia en el conocimiento del modelo canino.

TABLA II

Infección experimental en canes.

A.M. = adulto mestizo
C.M. = cachorro mestizo
C.B. = cachorro Beagle
ip = intraperitoneal
sc = subcutáneo
i.v. = intravenoso
P = parásitos
VD = ventrículo derecho

H.A. = humano agudo
H.A.F. = humano agudo (caso fatal)
H.A.S. = humano agudo sintomático
H.C.Cr. = humano cardíaco crónico
conj = conjuntival
S.i. = sin información
↑ aumento
↓ disminución

	"B" Brasil
	"W" Hausch
8x10 8	S.I.
5x10 4/kg	ip

La bibliografía es amplia respecto del empleo de inóculos masivos de T.cruzi (75,36) y de cepas altamente virulentas para provocar la etapa crónica sintomática (77).

En nuestro trabajo se ensayaron protocolos de infección con cepas de distinto grado de virulencia, e inóculos en dosis variadas para conocer la susceptibilidad de este modelo y comparar el curso de la infección experimental con la evolución de la infección en las poblaciones caninas de áreas endémicas de nuestro país.

El estudio de la dinámica de la transmisión de T.cruzi en terreno nos conduce a evaluar el rol del perro como modelo y reservorio de la infección natural.

1.6.- DINAMICA DE LA TRANSMISION DE T.cruzi:

Factores entomológicos y antropológicos entran en juego en relación a la infestación por triatominos en las viviendas (81), la disponibilidad de la fuente de alimentación humana o animal (82,83), los caracteres estructurales de las viviendas (84), el empleo de productos químicos para el control de los insectos (85), el reconocimiento de los reservorios domésticos (86), la participación comunitaria en el control de la transmisión (87), y las vías alternativas no entomológicas de transmisión (88), ya que todos estos factores inciden en el perfil de esta parasitosis.

El fin último del conocimiento de la dinámica de la transmisión vectorial de T.cruzi en el ámbito rural es determinar el número máximo de vinchucas que una vivienda pueda albergar sin favorecer la transmisión al hombre y a potenciales reservorios; y en el caso de las restantes vías, bloquear la transmisión mediante medidas apropiadas específicas para cada caso.

1.6.1.- Transmisión por vía entomológica:

La transmisión entomológica es una vía indirecta asociada al vector invertebrado triatomino. La distribución mundial de esta endemia coincide con las áreas de distribución de las especies vectoras que muestran capacidad de domiciliación. Se han confeccionado mapas con las isolíneas de infestación triatomina para la República Argentina; en 1968 isolíneas del 100% de infestación comprendieron zonas del sur de Santiago del Estero, nordeste de Córdoba y noroeste de Santa Fe. Las del 75% involucraron al resto de Córdoba y Santiago del Estero, Chaco, y parte de Formosa, mientras que áreas de Tucumán y provincias cuyanas, La Pampa y Santa Fé fueron asociadas a la isolínea de 30% de infestación triatomina domiciliaria. Las restantes provincias, excluidas las patagónicas estuvieron involucradas en niveles de infestación del 10%. Las áreas de mayores niveles de infestación coincidieron con las zonas de temperaturas máximas absolutas superiores a los 40-45°C y humedad relativa anual inferior al 70% (89).

El control intensivo de los triatominos en el área rural modifica la transmisión de la enfermedad humana, ya que el efecto de la vigilancia entomológica continua es causa del control de la transmisión del T.cruzi. Desde 1974 en la provincia de Jujuy (Argentina) se viene realizando una campaña sostenida de desinsectación complementada a partir de 1984 con acciones de vigilancia epidemiológica con Atención Primaria de la Salud (APS) y el resultado a diez años es una infestación muy baja en muy escaso número de viviendas con baja prevalencia de infección en niños (90). Además se han confirmado los alcances de las acciones conjuntas de desinsectación, denuncia de nuevos focos y

vigilancia (91) en un área de Santiago del Estero al descender del 20% al 4% las prevalencias de infección en humanos; en áreas de alta endemicidad del estado de San Pablo y en algunas regiones de Minas Gerais (Brasil) se ha logrado interrumpir la transmisión de la enfermedad humana mediante programas de control (92).

1.6.2.- Transmisión por vía transfusional:

Las áreas en las que se observa transmisión por transfusión sanguínea son endémicas y no endémicas para la transmisión vectorial, pero con población migrante que durante sus primeros años de vida residió en zonas endémicas.

La hipótesis de la transmisión por vía transfusional se debe en Argentina a Mazza (1936)(93) y Bacigalupo (1948)(94), en Brasil a Dias (1945)(95) y en Uruguay a Tállice (1947)(96), quienes enfatizaron la importancia de la exclusión de sangre proveniente de dadores infectados. El escaso interés de algunos hemoterapeutas para identificar y comunicar casos relacionados con esta vía, la dificultad de asociación entre la Enfermedad de Chagas y transfusiones sanguíneas previas, el elevado número de casos asintomáticos u oligosintomáticos que dificultan su diagnóstico y las trabas efectivas para publicar trabajos científicos en algunos países donde esta enfermedad es endémica, podría explicar este fenómeno (97), sin embargo en otras regiones del continente se han organizado redes que permiten controlar la casi totalidad de la sangre a transfundir (98,99).

Se estima que en la República Argentina la prevalencia de dadores de sangre con serología positiva para Chagas es en promedio del 5% para todo el país (100). El control de la sangre a transfundir en los bancos de sangre, actualmente en ejecución,

disminuye los riesgos de contaminación por esta vía.

Por tratarse de una infección subclínica, en la mayoría de los portadores de T.cruzi, altos porcentajes de infectados pueden transmitirlo si no se controla la sangre donada mediante reacciones serológicas de detección de anticuerpos específicos para identificarlos.

En Argentina, el 50% de los laboratorios estatales y privados utilizan dos reacciones serológicas de detección de anticuerpos específicos y el resto una. La hemaglutinación indirecta en una dilución 8 del suero, es la reacción recomendada como método de descarte de sangre infectada. Estudios realizados en la red de laboratorios centrales provinciales y nacionales (100) así lo confirmaron.

En Estados Unidos hay riesgo de transmisión por vía sanguínea por las elevadas proporciones de inmigrantes infectados con T.cruzi. En Argentina y Brasil el riesgo es del 20% y en Bolivia del 50%. En la República Argentina se realiza medio millón de transfusiones sanguíneas anuales, solo en la Ciudad de Buenos Aires, su periferia y el sur de Santa Fe, donde la prevalencia de infección es del 3.7%. De esta manera, 15.000 dadores pueden transmitir el parásito aunque se trate de una región libre de transmisión vectorial. Por lo tanto, se esperan anualmente 3.000 nuevos casos entre los mono-transfundidos y mayor entre los politransfundidos por esta vía de infección (101).

1.6.3. Transmisión congénita:

En agosto de 1911 Carlos Chagas empleó el término "transmisión hereditaria" para describir dos casos, el de un niño de 20 días de edad con hipertrofia de la glándula tiroidea desde su nacimiento y con los restantes signos de Enfermedad de

Chagas, y descartó la posibilidad que fuera adquirida. El segundo caso correspondió a la verificación de lesiones anatomopatológicas y el hallazgo del parásito en dos recién nacidos que mostraban fenómenos convulsivos y que fallecieron a los 6 y 8 días de vida (7). En 1948 Dao detectó parásitos en la gota gruesa de un recién nacido de dos días de edad, hijo de una madre con xenodiagnóstico positivo (102).

En 1921 Nathan-Larrier infectó cobayos por inoculación intraperitoneal y subcutánea y verificó la transmisión al líquido amniótico (103). En 1928 Souza Campos reprodujo en el laboratorio la transmisión hereditaria de la infección en perros (69).

Rocha Lima en 1923 encontró parásitos en placenta (104) y en ese mismo año Villela (67) observó perras preñadas infectadas con T.cruzi cuyos fetos mostraban signos de maceración avanzados.

De un total de 200 sueros de mujeres embarazadas y de sus hijos se obtuvo una prevalencia de infección chagásica del 58.2% y del 5.06% respectivamente. De los sueros maternos el 84% se comportó como proveniente de pacientes crónicos y el resto como de agudos, según estudios de aglutinación directa con y sin 2 mercapto-etanol. En el 24% de los niños se registró un aumento de inmunoglobulinas detectado por inmunodifusión radial (105).

El parásito circulante en la sangre materna, puede infectar el trofoblasto y el estroma de las vellosidades placentarias, desde donde puede infectar a la sangre fetal (107). Por otra parte, se reconoció la influencia de la cepa de T.cruzi involucrada en infecciones placentarias en ratones, y se vió que la incidencia de parasitismo placentario fué del 98% con la cepa Colombiana, 18.4% con la Peruana, 17% con la Y y 13.2 % con la Honorina. Por otra parte, la presencia de parásitos en vasos placentarios fué prominente en la cepa Colombiana y rara en las restantes (107).

Las prevalencias de infección por serología reactiva en mujeres latinoamericanas varían según el área geográfica: en Argentina del 6-20%, en Santa Cruz (Bolivia) del 51% en embarazadas y del 54% en no embarazadas (108). En Argentina la incidencia fué del 0.75-3.50%, en Brasil 3%, y en Chile 0.49%(108).

En Bolivia, en un área con una prevalencia de infección de mujeres gestantes del 51 % se detectó una prevalencia del 7.5 % por el método de enriquecimiento de Strout (109). Se observó un mayor riesgo de transmisión congénita (21%) en niños de bajo peso (1.0-2.5 kg) al nacimiento respecto de los mayores de 2.5 kg (2%) y la edad gestacional osciló entre las 26 y 36 semanas (109). Se ha enfatizado que el riesgo de transmisión congénita puede ser mayor en algunas áreas rurales (109). Las prevalencias del 81% fueron obtenidas por estudios del Proyecto Abapo-Izozog del ZENETROP en Bolivia (109).

1.6.4. Transmisión contaminativa o por vía digestiva:

En 1961 Mayer infectó en el laboratorio ratas, ratones, perros y gatos al someterlos a una alimentación con leche contaminada con heces de tripanosomas. Los ratones mostraron un período prepatente de 11-24 días, los gatos de 22-27 y los perros de 24-29 días (110). Posteriormente, Diaz Ungria inoculó lotes de cobayos, ratas y ratones, cachorros y adultos de perro y advirtió de la posibilidad de contaminación de alimentos con heces de insectos vectores accidentales de T.cruzi , Musca doméstica entre otras. La infección de didélfidos, visitantes nocturnos de locales peridomiciliarios puede introducir cepas nuevas en el ambiente doméstico a partir de la contaminación de alimentos y agua con orina de animales infectados (111).

En dos microepidemias en Brasil se sugirió la transmisión oral

de T.cruzi a humanos pero no se logró comprobarla. En una escuela agrícola de Teutonia (Río Grande do Sul) 17 personas se infectaron y 6 murieron, sugiriéndose una infección por ingestión de alimentos contaminados con orina de oposum infectados (112).

1.6.5. Transmisión por otros insectos hematófagos:

La vía accidental de transmisión parasitaria, en la que agentes biológicos transmisores reemplazan el rol del vector en condiciones particulares existe para el T.cruzi, y por ser baja la probabilidad que ello ocurra carece de valor epidemiológico.

Algunos artrópodos pueden actuar como hospedadores intermediarios accidentales y posibles transmisores de la Enfermedad de Chagas. Su función es la de albergar por breves lapsos al T.cruzi en glándulas salivares o en variados órganos del aparato digestivo. Algunos cimicidos, pulgas, ácaros y culicidos han intervenido en transmisiones experimentales de T.cruzi, especialmente a través de la picadura mediante mecanismos de regurgitación (17).

Alcántara en 1966 inoculó experimentalmente ratones con el contenido intestinal de mosquitos infectados previamente con T.cruzi mediante alimentaciones sanguíneas sobre ratones infectados. Los ratones inoculados por vía cutánea, ocular y bucal mostraron parasitemia patente a partir de los cinco días post-infección. La supervivencia de los tripanosomas en el tubo digestivo se verificó hasta 72 horas después de efectuada la alimentación (113).

1.6.6. Otras vías de transmisión:

Transmisión lactogénica: En 1936 Mazza atribuyó a la lactación la infección de un bebé, al haber encontrado

tripomastigotes en la leche materna de una madre que cursaba la etapa aguda de la infección (93).

Transmisión por trasplantes de órganos: transplantedos renales de dadores crónicos para la enfermedad de Chagas en el Hospital de Clínicas de la Universidad de Sao Paulo desarrollaron una infección aguda. Sin embargo, no se descartó la procedencia transfusional de la infección (114). En nuestro país, se ha documentado la reactivación de una infección chagásica crónica en el receptor de un riñón transplantado, por efecto del tratamiento inmunosupresor (115), y en Brasil se recomienda el uso de drogas tripanomicidas para prevenir la infección en pacientes receptores de riñones infectados con T.cruzi (116).

Contaminación en el laboratorio: los accidentes más comunes se asocian a pinchazos con agujas infectantes, contacto cutáneo (piel erosionada), conjuntival mucoso con materiales contaminados, manipulación de animales de laboratorio infectados con T.cruzi, producción de cantidades masivas de T.cruzi sin emplear medidas apropiadas de seguridad ó el efecto de aerosoles sobre la conjuntiva ó piel no intacta.

Hasta ahora no se conoce el número exacto de infecciones accidentales y sus circunstancias. Se han registrado hasta ahora 45 casos en Europa, EEUU y Latinoamérica, la mitad de ellos corresponden a esta última, algunos de los cuales se registraron en la literatura (117). En algunos casos se reportó fiebre, erupciones cutáneas, alteraciones ECG y síntomas que sugieren una meningo-encefalitis. El período de incubación fué siempre muy corto y el curso de la infección severo, debido posiblemente a la inoculación de un alto número de formas infectantes, y mejorado después de la introducción de terapia con compuestos nitroderivados, Nifurtimox (8-10 mg/kg/día por vía oral) y

Benznidazol (5-6 mg /kg/día vía oral (117)).

Los procedimientos de seguridad recomendados son: evitar el contacto de T.cruzi con tegumentos o mucosas, ya que aún no se comprobó que no atraviesa tegumento intacto. En ratones, tri metaciclícos lo hacen. Por ello, se recomiendan máscaras, guantes, empleo de recipientes con desinfectantes, pipetas automáticas, restricción de acceso a laboratorios, bioterios e insectarios e incineración de animales muertos infectados.

Los porcentajes de individuos infectados por transfusión, pasaje transplacentario accidentes de laboratorio es bajo respecto de los infectados por transmisión vectorial.

Las vías de transmisión no vectoriales contribuyen a la diseminación de esta enfermedad, así como ocurre con la vía entomológica. Sin embargo, el valor epidemiológico que revisten unas y otra no son comparables; las prevalencias de infección en humanos están relacionadas en mayor proporción con esta última.

1.7.- DINAMICA DE LA TRANSMISION VECTORIAL. EL DOMICILIO Y EL PERIDOMICILIO:

Se ha sostenido que los factores económicos y los determinantes ecológicos son las fuentes principales de la dificultad del control de vectores, hospedadoras naturales y reservorios de enfermedades infecciosas y parasitarias. Además, el estudio de áreas modificadas por la ocupación y colonización humana han sugerido que tales factores nos ofrecen condiciones ideales para el establecimiento de enfermedades endémicas de naturaleza zoo ótica. Tales enfermedades son síntoma y resultado de una ecología desbalanceada causada por la actividad humana en el entorno de una comunidad natural. Se ha enfatizado el rol del hombre en la provisión de las condiciones óptimas para la multiplicación de hospedadores y vectores aunque se trate de una infección heredada de mamíferos silvestres (118).

Desde el punto de vista ecológico, el eje de la dinámica de la transmisión entomológica pasa por las siguientes figuras: el hombre, los animales domésticos y los del corral, el o los insectos vectores y el T.cruzi, en el sistema ecológico del ambiente (domicilio y peridomicilio) donde factores estructurales (construcción de viviendas), disponibilidad de alimento de los vectores (de origen humano animal), lucha organizada individual ó comunitaria contra el vector (empleo de insecticidas, denuncias de focos, etc), factores socioculturales y climáticos perfilan esta endemia. Vectores y hospedadores del ciclo silvestre interactúan con el medio doméstico y aportan nuevas cepas de parásitos a este equilibrio (118).

La organización económico-doméstica de la familia rural en Latinoamérica ha generado viviendas con domicilio y peridomicilio. Las viviendas tienen dos más habitaciones utilizadas como dormitorios y comedor, construidas con materiales locales ó manufacturados de construcción, y se considera domicilio a todos los ambientes con techo común al área de reposo (119). Según la zona geográfica, la cocina es local peridomiciliario está incorporada al ambiente del domicilio. En Argentina, en provincias endémicas para la Enfermedad de Chagas, como es Santiago del Estero, las cocinas suelen ser locales peridomiciliarios abiertos constituidos por un fogón rodeado de tres paredes de enramada a media altura entre piso y techo (119). En Brasil, en el municipio de Mambai en el estado de Goias y en la provincia de Catamarca (Argentina) entre otras, esta habitación está incorporada al ambiente de la vivienda (119). Se han diferenciado paredes revocadas y no revocadas según el alisamiento ó no de grietas, fisuras ó huecos. Abundante bibliografía resalta el beneficio de contar con viviendas de paredes revocadas, ya que mayores índices de infestación triatomina se han observado en viviendas de paredes no revocadas (120).

El mejoramiento de viviendas mediante mezclas de adobe y cemento, el empleo de polyesterasas y resinas epoxi, y techos de concreto y materiales corrugados disminuyen la densidad de los vectores en las viviendas (121).

El peridomicilio incluye diferentes locales según el área geográfica, pero en general contiene el depósito, la troja o depósito de granos, la cocina, el gallinero y el corral.

El conocimiento del grado de infestación de la vivienda y del peridomicilio se obtiene por diversos métodos de detección y cuantificación entomológica. El empleo de excitantes químicos de naturaleza piretroide provoca la salida de los vectores de grietas o escondites. El número de insectos capturados por unidad temporal a partir del esfuerzo de uno o más evaluadores determina una medida cuantitativa del grado de infestación. Las cajas de Gomez-Nuñez (122) ó María (123) indican la presencia de los vectores y han sido usadas en programas de vigilancia entomológica con apoyo comunitario (123,91).

La Tabla III muestra los niveles de infestación por I.infestans en la República Argentina, de I.infestans y I.sórdida en Brasil y R.prolixus en Venezuela y las variaciones según los estadios evolutivos.

En Brasil se caracterizó el nivel de infestación por vivienda de acuerdo al porcentaje de casas infestadas en los caseríos rurales estudiados.

Se determinaron alteraciones en la infectividad por I.cruzi de vinchucas domiciliarias rurales de la provincia de Córdoba por efectos estacionales. El número promedio de formas de I.cruzi provenientes de la ampolla rectal fue máximo en diciembre (36.000/ul) y mínimo en octubre (900/ul). Variaciones en la densidad poblacional de los vectores, en la infectividad por

TABLA III

Niveles de infectividad de los vectores triatominos según el estadio de desarrollo ninfal.

AUTOR (país)	Especie	Triatominos capturados	% de viviendas infestadas	% de vectores infectados	Referencia
WISNIYESKY-COLLI (Argentina)	T. infestans	ND	ND	NI-II=0-10% NIII=1-27% NIY=14-71 NY=33-86% A=45.4% $\sigma^2=20/57$ $\rho=35/64$	119
RONDEROS (Argentina)	T. infestans	ND	ND	NI=63.3% NII=28.6% NIII=6.1% NIY=0.4% NY=1.6% $\sigma^2=60.9%$ $\rho=39.1%$	124
BARRET (Brasil)	T. infestans T. sordida	ND	ND	$\sigma^2=11.5%$ $\rho=24.0%$ $\sigma^2=3.7%$ $\rho=17.6%$	85
MARSDEN (Brasil)	T. infestans T. sordida	$n \leq 10 \longrightarrow 70-73%$ $25 \geq n \geq 10 \longrightarrow 15-20%$ $25 < n \longrightarrow 10-12%$		N=12.8 A=35.7% $\sigma^2=32.7%$ $\rho=38.0%$	120
TELFORD (Venezuela)	R. prolixus	ND	ND	NI-IY=2.8%* NY-A=18%* NI-IY=16.7% NY-A=23.1%	125

ND = no determinado.

(*) = estación lluviosa

T.cruzi y en los porcentajes de formas infectivas estuvieron asociados a cambios estacionales (126).

1.8.- INFECCION POR T.cruzi EN EL HOMBRE Y LOS ANIMALES DOMESTICOS:

El conocimiento de las prevalencias de infección por serología se realiza a partir del uso de reacciones diversas, algunas de ellas de fácil operatividad en terreno (41,42,127). Las prevalencias de parasitemia se determinaron a partir del xenodiagnóstico (41) y de métodos de observación directa, empleando técnicas de enriquecimiento, Strout (128), y microhematocrito (129).

Los relevamientos clínicos se efectúan mediante registros ECG (130,131) y la prueba de Ajmalina (132) que utiliza un fármaco amplificador instantáneo y transitorio de trastornos eléctricos en el hombre y en los animales domésticos.

1.9.- RESERVORIOS SILVESTRES Y DOMESTICOS:

Los didélfidos son los reservorios más importantes desde el punto de vista epidemiológico de los marsupiales. Sus nidos, infestados con Triatoma infestans, Panstrongilus meqistus, Triatoma sórdida, etc, se los encuentra en árboles, bromeliáceas, y techos de depósitos y trojas (133). El opossum tropical americano Didelfis marsupialis es un reservorio de T.cruzi que puede anidar en el peridomicilio. En los llanos altos de Venezuela este reservorio se vió densamente parasitado por T.cruzi, con bajos niveles de infección en las crías previo destete (solo el 0.8%) en una población cuyas hembras mostraron prevalencias de infección cercanas al 70%. La capacidad de mantener una parasitemia sostenida y la importante movilidad de

este reservorio (hasta 650 mts. en 24 hs) tal que posibilita su contacto con zonas peridomiciliarias distantes del bosque (134).

Por otra parte, sangre de murciélagos (O.Chirdptera) fue identificada en el sistema digestivo de P.megistus y I.sórdida, y miembros del orden Rodentia infectados con I.cruzi (Rattus rattus frugivorus y Mus musculus) alternan frecuentemente entre el ambiente silvestre y el doméstico (133). De 160 Rattus r. frugivorus se encontró infectado con I.cruzi al 26%

Las más altas tasas de infección en roedores fueron registradas en Panamá (57%) para R.rattus (136) y del 30,6% en Costa Rica (133). Ha sido evaluada la influencia de los animales domésticos en la transmisión de la infección por otras vías alternativas, como la oral por ingestión de vinchucas y animales infectados (137). Por otra parte, el armadillo, un edentado asociado a la vivienda humana, se manifiesta como un reservorio importante por su contacto con P.geniculatus (133). Entre los carnívoros, el cánido silvestre Cerdocyon thous azarae es también un reservorio de I.cruzi. Es cazador de hábitos nocturnos, y habita montes de pequeña densidad, se alimenta de mamíferos, aves y frutas maduras y suele acercarse a las viviendas humanas (138).

Alouatta, Callithrix, Saimiri y Suquinus son habituales hospedadores naturales de I.cruzi, como los cobayos (Cavia sp), que en Bolivia, Perú y norte de Brasil son altamente susceptibles al I.cruzi. Tienen índices reportados del 10,5% al 61%). En Cavia no se conoce bien su mecanismo de infección y se ha sugerido que a veces puede ser no vectorial (133). La cocción insuficiente de su carne y el estrecho contacto con músculo y secreciones de los cobayos pueden favorecer la transmisión al

hombre (133). En el estado de Bahía (Brasil) se encontraron 5 cobayos infectados, de 6 pertenecientes a una vivienda rural infestada con Panstrongylus megistus (133).

1.10.- ANIMALES DOMESTICOS Y DEL PERIDOMICILIO:

Los animales del peridomicilio están representados por cabras, cerdos, caballos y aves de corral, entre otros. Es reconocido de larga data el carácter de refractario a la infección por T.cruzi en las aves (139) por tener un sistema complemento que favorece la lisis de los tripanosomas. Vectores asociados a patos, pollos, pájaros y gansos, en gallineros o en el exterior tienen muy bajas prevalencias de infección por T.cruzi, ya que han sido señalados escasos porcentajes de alimentaciones mixtas, indicadores de la movilidad de los insectos (119). Sin embargo, fué considerado el rol de las aves como fuente importante de sangre para las poblaciones de reduvidos (119). Estudios de preferencia alimentaria a partir de ingestas sanguíneas del promesenterón de los vectores por reacciones de doble difusión mediante el empleo de sueros específicos de especie humana y animal se realizaron en áreas rurales del norte de la provincia de Córdoba donde el 1.8% de las vinchucas capturadas en dormitorios se habían alimentado sobre cávidos silvestres y 0.4% sobre cabras y caballos (140).

En Argentina, desde 1926 y 1934 se reconoció el rol de perros (141) y gatos (142) respectivamente como importantes hospedadores domésticos del T.cruzi. Mazza identificó al T.cruzi en sangre periférica de cachorros habitantes de viviendas rurales de la localidad de Perico (Pcia. de Jujuy. Argentina). El hecho que tres cachorros infectados pertenecieran a la misma parición de una perra parasitémica, lo indujo al aislamiento y

seguimiento del animal y su descendencia. En una segunda parición 7/9 cachorros sobrevivieron, cinco fueron parasitéticos a los 30 días, y cuatro murieron un mes después (142).

En Brasil, en la localidad de Castro Alves, Bahía, en un área infestada con Panstrongylus megistus se realizó la evaluación de las prevalencias de infección en gatos y perros para asociarlos con las prevalencias de infección en humanos. Se detectó parasitemia en el 20% de los perros y gatos de la zona. Se demostró la relación entre los niveles de infestación triatomina y las prevalencias de infección en humanos y animales domésticos de esa comunidad y se observó que el vector estaba más frecuentemente presente en casas con perros y gatos (9/38) que en casas sin ellos (1/19) (143).

En algunas áreas de Argentina las prevalencias de infección para perros y gatos superan las observadas de humanos en esas mismas áreas (140,144,145) y enfatizan la importancia de estos hospedadores como fuente de tripanosomas circulantes.

En Argentina desde 1934 se evaluó el rol del gato como reservorio de T.cruzi (146). Se han reconocido elevadas tasas de infección (147), explicado en parte por la presencia de altas tasas de ratones infectados con T.cruzi y la suposición que los gatos pudieran infectarse por vía oral al capturarlos o comiendo vinchucas domiciliarias y peridomiciliarias infectadas (119). En Brasil, estudios de xenodiagnósticos realizados sobre gatos revelaron prevalencias del 29% (87) y del 18% (143); en la República Argentina, en la provincia de Santiago del Estero del 64%. (146). La escasa información asociada a este reservorio se relaciona con las dificultades de relevamiento, de extracción de sangre, migraciones temporarias al monte, etc.

Por otra parte, es copiosa la información sobre infección

por T.cruzi en poblaciones caninas, desde el Estado de Texas (EEUU) (148) hasta la República Argentina (144,146).

Estudios realizados en perros de comunidades rurales (146,145,149,150,142,143) tuvieron por objeto intentar interpretar esta interacción huésped-parásito en terreno.

El alto valor atribuido al perro por el habitante rural asociado a su utilidad como guardián, cazador o arreador de cabras, entre otras funciones y el estrecho contacto establecido entre perros y niños imposibilita implementar medidas drásticas de control. Sin embargo, sería de inestimable ayuda para interrumpir la transmisión de T.cruzi contar en el futuro con métodos inmunoprolifáticos que limiten la parasitemia en perros.

1.11.- ESTUDIOS REALIZADOS EN POBLACIONES CANINAS RURALES:

Es reconocido el rol del perro como reservorio de T.cruzi en Brasil (143,86), Argentina (144,142,143,149), Venezuela (151) y Bolivia (152), entre otros.

Se han realizado estudios de infección tripanosómica en poblaciones caninas de casi todos los países latinoamericanos desde EEUU hasta la República Argentina. Los métodos de detección de parásitos y de anticuerpos específicos han mostrado muy variada sensibilidad, desde la gota gruesa (153), hemocultivo (154) y estudios de xenodiagnóstico (150,155), hasta reacciones serológicas diversas: Fijación de complemento (156,157,41) test de precipitina (158,77), hemaglutinación indirecta (159,160) y aglutinación directa (161).

Mediante la obtención de datos censales de humanos, animales y triatominos de caseríos rurales de Santiago del Estero (144,145,146,119) y Córdoba (140), las prevalencias de infección

en vectores y hospedadores, el estudio de las poblaciones triatomineas y la preferencia alimentaria de los vectores se trazó un perfil de la dinámica de la transmisión en el ambiente rural. Se diferenciaron viviendas rurales de alta transmisión, donde más del 50% de los niños de 2 -10 años de edad habían tomado contacto con T.cruzi y por otra parte, los de baja transmisión mostraron menos de un 50% de infección por T.cruzi (119,83).

Se determinaron las prevalencias de infección por serología y xenodiagnóstico de humanos, perros y gatos en las localidades de La Invernada y Amamá de Santiago del Estero. Ambas prevalencias fueron significativamente mayores para perros y gatos que para humanos (162,146). En Amamá se observó un porcentaje significativamente mayor de perros infectados con T.cruzi detectados mediante serología (83.7%) respecto de los humanos (47.8%) que habitaban esas mismas viviendas. Asimismo, se observó que una mayoría de perros naturalmente infectados (80-100%) pertenecientes a esas localidades endémicas habitaban viviendas de alta transmisión (146). Estos datos son coincidentes con los obtenidos en Castro Alves, Brasil, donde dos tercios de los niños serorreactivos menores de 10 años residían en viviendas donde había animales domésticos infectados con T.cruzi (143).

En Chile, por medio de encuestas epidemiológicas domiciliarias de localidades urbanas y periurbanas se capturaron ejemplares de T.infestans y T.spinolai. Mediante antisueros específicos contra mamíferos, aves, reptiles y anfibios se determinó la fuente de alimentación más frecuente de T.infestans, los mamíferos (90.2%). Correspondió al hombre el 68.4%, a los gatos el 6,1%, a los perros el 3.2% y a los conejos el 5.9%. La frecuencia de

infección se mantuvo en un orden relativo similar (humanos 12,2%, perros y gatos 1.3% y conejos 2.4%) (86).

En un relevamiento de triatomíneos y reservorios de T.cruzi en el valle de San Francisco (Bahía, Brasil), el 19.5% de T.infestans y el 11,5% de T.sordida estaban infectados con T.cruzi y las prevalencias de infección por xenodiagnóstico en perros y gatos fueron del 19 % y 29% respectivamente (86).

1.12.- Interacción entre los principales hospedadores del ciclo doméstico:

Es abundante la información de prevalencias de infección por serología y/o xenodiagnóstico en habitantes rurales y urbanos de Argentina (163,164), Chile (165,166), y Brasil (120,167).

El 33,7% de los habitantes de Castro Alves (Bahía, Brasil) mostraron anticuerpos específicos anti T.cruzi, y el 19.8% parasitemia detectable por xenodiagnóstico, de manera tal que el reservorio humano en esa zona involucró al 20% de la población humana de la zona; el 96% de los individuos parasitémicos eran serorreactivos, y el 56% de los que mostraron anticuerpos específicos eran parasitémicos. El porcentaje de individuos parasitémicos declinaba con la edad, ya que todos los serorreactivos con edades comprendidas entre 1 - 4 años eran parasitémicos, dos tercios de los pobladores de 5-19 años y un tercio de los adultos eran parasitémicos. La media de edad de los parasitémicos fué significativamente menor de la media de los no parasitémicos (168). Por ser la reactividad del xenodiagnóstico del 50% en pacientes con infecciones crónicas por T.cruzi la disminución de la parasitemia en los humanos a medida que entran en cronicidad condicionan la aparición dos subpoblaciones de

infectados, los parasitémicos y los no parasitémicos, jóvenes y adultos respectivamente. Comparativamente, en Guanaco Muerto y en La Invernada porcentajes de hombres y mujeres serorreactivos fueron del 56.5% y 47.6% respectivamente (119). Asimismo, en La Invernada prevalencias de infección por xenodiagnóstico del 14.6% fueron registradas. En Guanaco Muerto, en menores de 15 años, el número de individuos infectados representó el 50% del total de la población y corroboró el perfil de infección trazado en Castro Alves para humanos (140,168).

1.13.- Transmisión de T.cruzi en niños menores de 10 años y en perros:

Las elevadas prevalencias de infección detectadas por serología y xenodiagnóstico en perros de provincias argentinas endémicas para la enfermedad de Chagas hizo imperativo el estudio de su dinámica y su interacción con las poblaciones de niños menores de 10 años en ecosistemas aislados como es la vivienda rural.

En Amamá se registraron diferencias significativas entre las prevalencias de infección de la población canina (83.7%) y las de los niños menores de 12 años (47.8%). En el estudio de las prevalencias de infección en niños y perros pertenecientes a los mismos intervalos de edad, se registraron mayores prevalencias de infección en los perros que en los niños. En 4/5 viviendas de bajo riesgo el 33-50 % de los perros estaba infectado, mientras que en 14/15 de las de alto riesgo el 80-100% lo estaba (146). Por lo tanto, todo perro menor de 4 años puede ser "sujeto de referencia" de una vivienda, y la información asociada a edad e infección de los perros sirve para estimar el riesgo de infección

que sufren los menores de 10 años habitantes de esa casa (146). La razón entre la prevalencia de infección en los niños respecto de los animales de referencia y la prevalencia de infección de niños habitantes de viviendas donde pernoctan perros no infectados sugieren una medida de riesgo relativo en ambos grupos. Por lo tanto, la probabilidad relativa de que un niño menor de 10 años estuviera infectado en una vivienda habitada por un perro infectado, es 11 veces mayor que para viviendas con perros de referencia no infectados (145).

Mayores probabilidades de transmisión en perros que en niños pueden estar asociadas a un mayor contacto entre el vector y el reservorio, una mayor susceptibilidad del perro al T.cruzi y la mayor probabilidad de transmisión por otras vías (perinatal, contaminativa por ingestión de insectos pequeños animales infectados). Las elevadas tasas de infección por T.cruzi en perros de áreas endémicas argentinas y la importante distribución geográfica de tales áreas justifica ampliamente comparar la dinámica de infección de canes infectados en el laboratorio y en área endémica.

1.14.- INTERPRETACION DE LA RELACION HOSPEDADOR CANINO-PARASITO DESDE EL PUNTO DE VISTA EPIDEMIOLOGICO E INMUNOPATOGENICO COMO MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCION Y ENFERMEDAD:

El conocimiento del perfil de infección de los reservorios caninos en el ambiente rural y su correlación con canes infectados a partir de un protocolo específico en el laboratorio puede contribuir a trazar un perfil de la infección por T.cruzi en este hospedador en condiciones naturales y experimentales de infección.

OBJETIVO

El objetivo general de esta tesis es caracterizar el curso de la infección por T.cruzi en perros a partir de su función como modelo experimental de la Enfermedad de Chagas y como reservorio natural de T.cruzi en áreas endémicas rurales argentinas. Con este propósito:

1.- se inocularán canes con dos cepas de diferente grado de patogenicidad y virulencia.

2.- se realizará un estudio epidemiológico de los canes habitantes de una zona rural de la Provincia de Santiago del Estero, sometida a un programa sanitario de interrupción de la transmisión de la infección por T.cruzi.

3.- se compararán los perfiles de infección y morbilidad de canes natural y experimentalmente infectados con T.cruzi.

Se desarrollarán los siguientes objetivos parciales para caracterizar el curso de esta infección y sus manifestaciones de morbilidad:

a.- Adaptación a los sueros caninos de reacciones serológicas para la detección de anticuerpos específicos anti T.cruzi de humanos, para determinar el perfil serológico de la infección.

b.- Caracterización del curso de la parasitemia en canes experimentalmente infectados, mediante métodos directos e indirectos de detección.

c.- Evaluación de las etapas clínicas de la infección mediante la normatización de métodos electrocardiográficos, clínicos e histopatológicos.

MATERIALES Y METODOS

3.1.- APROXIMACION AL CONOCIMIENTO DEL MODELO CANINO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS. UNA EVALUACION DE SUS VENTAJAS Y LIMITACIONES.

3.1.1.- Animales empleados:

3.1.1.1.-Perros:

Se utilizaron perros mestizos de edades variables de acuerdo a los requerimientos de la investigación, proporcionados por el Centro Antirrábico San Martín, Partido de Tres de Febrero, provincia de Buenos Aires. Se mantuvieron en cautiverio en el bioterio del Servicio de Fisiología del "Instituto de Investigaciones Médicas Dr. Alfredo Lanari". El mantenimiento y cuidados dispensados a los animales fueron efectuados por el personal del Instituto. Los perros fueron alojados en jaulas individuales y recibieron alimentación ad-libitum a base de carne y alimento balanceado Dogui (Cargill S.A. Buenos Aires, Argentina).

3.1.1.2.- Ratones:

Se utilizaron ratones endocriados lactantes NHI con el propósito de realizar subinoculaciones con sangre de perros experimentalmente infectados con T.cruzi (168), en aquellos casos en que se observaban resultados de xenodiagnósticos reiteradamente negativos.

3.1.2.- Infección de los perros:

3.1.2.1.- Estudios previos:

Los perros candidatos a ser incorporados a los estudios del modelo canino se estudiaron desde varios aspectos. Se incluyeron estudios serológicos, parasitológicos y electrocardiográficos para descartar animales infectados con T.cruzi.

La Tabla IV detalla el protocolo seguido para seleccionar candidatos a modelos.

TABLA IV
Requisitos a cumplir por los animales candidatos a
modelo experimental.

Animales:	perros
Edad:	un año aproximadamente.
Sexo:	machos.
Estudios realizados:	
Deben ser negativos:	a.- Métodos de detección de infección por <u>T.cruzi</u> : * Xenodiagnósticos (4 cajas= = 10 <u>T.infestans</u> /caja). ** Serología: 2 reacciones. b.- Métodos de detección de endoparásitos: * Exámen parasitológico de materia fecal (Método de Bethelson). c.- ECG = normal d.- Clínicamente sanos.
Prevención de enfermedades:	* Tratamiento contra ectoparásitos con Tea 327 (Lab. Koning S.A. Avellaneda, pcia. de Buenos Aires, Argentina). ** Vacunación contra moquillo, hepatitis, y parvovirus. *** Alimentación con una fuente adicional de vitaminas (Bionate, Lab. Estrella Merieux, Buenos Aires, Argentina).

3.1.2.2.- Cepas y dosis empleadas para la infección de canes por
T.cruzi:

Se emplearon dos cepas de T.cruzi de diferente patogenicidad,
la Argentina I (169) y la Tulahuén (170). Ambas se mantienen en
nuestro Instituto en cultivos bifásicos y en ratones
endocriados.

3.1.2.2.1.- Cepa Argentina I (CA-I)(169):

Fue aislada en 1974 a partir de un xenodiagnóstico (41) (T.infestans) aplicado a un paciente masculino de 45 años habitante de la provincia de San Luis (169). Estudios clínicos, electrocardiográficos y serológicos confirmaron en el paciente una miocarditis chagásica crónica. El contenido intestinal de los insectos fue suspendido en solución fisiológica (SF) e inoculado en ratones Rockland lactantes de 10-12 días por vía intraperitoneal (ip). Una vez alcanzado el período de patencia, los parásitos se inocularon en ratones normales, de similar edad, y se mantuvo una línea por pasajes sucesivos, según una dosis de $1-5 \times 10^4$ parásitos. A partir del tercer pasaje en ratón se transfirió también la cepa a cultivos bifásicos sucesivos (agar-sangre de conejo/infusión de cerebro-corazón) (169).

Desde el pasaje 34 en ratón se repicaron los parásitos de CA-I en T.infestans. Los insectos se alimentaron sobre ratones infectados. A los 30 días de la aplicación de las cajas se preparó una suspensión de materia fecal en SF. Esta suspensión constituyó el inóculo infectante en los perros del lote I (L I). Los perros del lote II (L II) fueron inoculados con suspensiones de CA-I provenientes de T.infestans alimentados sobre perros.

L I y L II fueron inoculados con suspensiones de contenido intestinal de T. infestans que contenían 5×10^3 T.cruzi.

La suspensión salina, clarificada por decantación contenía penicilina (1×10^3 U/ml) y Streptomycin (100 mg/ml). Con los animales de L I se ensayaron dos vías de inoculación, la ip y la conjuntival (conj). La vía conj consistió en instilar una gota del inóculo sobre la conjuntiva del ojo derecho del animal. Los animales de este lote no fueron reinoculados.

El L II fué inoculado por vía ip. Dos de los animales fueron reinoculados a los 22 mpi con una primera dosis de 1.25×10^4 y otra de 3×10^4 parásitos de la misma procedencia empleando la vía conjuntival.

3.1.2.2.2.- Cepa Tulahuén (Tul):

La cepa original fué aislada en Chile (Localidad de Tulahuén) de una vinchuca capturada en campo infectada con T.cruzi (170). La cepa Tul se mantiene ininterrumpidamente en ratones en nuestro laboratorio desde 1970. Hasta 1985 se emplearon ratones Rockland y desde entonces NHI. El inóculo de Tul estuvo constituido por tri sanguíneos de ratón y sirvió para la infección de los lotes III (L III) y IV (L IV).

El lote III de perros fué inoculado por vía ip, tres animales del L III (L III- a) se inocularon con 5×10^4 T.cruzi, tres (L III- b) recibieron 7.5×10^4 y cinco (L III-c) recibieron 1×10^5 tri sanguíneos de ratón de la cepa Tul y se reinocularon con 1×10^5 T.cruzi por la misma vía.

Diez perros de L IV fueron inoculados por vía ip con 1×10^5 tri sanguíneos de ratón.

El comportamiento parasitológico de la cepa CA-I es muy diferente al de Tul. La inoculación de ratones Rockland adultos con 50 tri sanguíneos produce parasitemias de 10^7 parásitos/ml y provoca la muerte del 50% de los animales alrededor de los 10 dpi. Por el contrario, la cepa CA-I no produce mortalidad en ratones Rockland adultos y es muy baja en lactantes. Puede provocar la muerte del 50% de los ratones entre el 1º y 3º mpi aunque no induce un verdadero pico de parasitemia, y los valores máximos se registran entre los 15 y 45 dpi (Fig.1)(169).

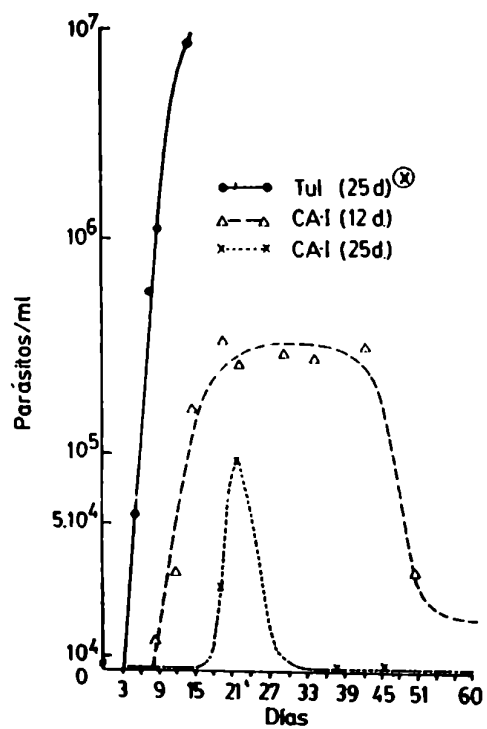


Fig.1.- Perfil parasitológico de la infección con la cepa CA-I (Cepa Argentina I) en ratones Rockland lactantes y adultos.

3.1.3.- Esquema experimental:

La Tabla V reseña las características generales de los animales (número, sexo y edad) y la metodología de infección (cepa, dosis, vía de inoculación y procedencia de los parásitos).

Ocho lotes de animales fueron empleados, cuatro infectados y cuatro lotes controles no infectados, los que se mantuvieron en cautiverio simultáneamente.

El L I, constituido por seis animales inoculados con CA-I, tuvo como propósito evaluar la efectividad de las vías ip y conj.

El L II de 4 perros fué inoculado con CA-I por vía ip y dos de ellos reinoculados con la misma cepa por via conj.

El L III de 11 animales, fue inoculado con dosis altas de Tul por vía ip y reinoculado entre cinco y nueve api con igual cepa y vía. El objeto de este seguimiento fué evaluar el curso de una infección de larga duración y su influencia en la respuesta a la reinoculación.

El L IV de 10 perros recibió dosis bajas de la cepa Tul de T.cruzi para estudiar la influencia de la dosis en la letalidad (Tabla V).

3.1.4. Períodos clínicos de la infección experimental en canes:

El seguimiento parasitológico, serológico y clínico de los lotes de infección permitió evaluar la duración del período agudo y el inicio de la etapa crónica.

TABLA V

Esquema de la inoculación experimental por T.cruzi en canes.

Lote (cepa inoculada)	Identif. del perro	Edad I ₀ -S en años	Inoculación				
			Vía	PP	DOSIS		
					I	R1	R2
I CA-I	1	1-2	ip	Y	103	NO	NO
	2	3-5	conj	Y	103		
	3	1-3	conj	Y	105		
	4	2-3	ip	Y	105		
	5	2-4	conj	Y	105		
	6	3-5	conj	Y	105		
II CA-I	1	1-3	ip	Y	5x10 ³	1.25x10 ⁴ *	3x10 ⁴
	2	1-3	ip	Y	5x10 ³		
	3	1-5	ip	Y	5x10 ³	1.25x10 ⁴ *	4x10 ⁴
	4	1-5	ip	Y	5x10 ³		
III-a TUL	1	1-9	ip	TR	5x10 ⁴	105***	
	2	1-9	ip	TR	5x10 ⁴	105***	
	3	1-10	ip	TR	5x10 ⁴	105***	
III-b TUL	4	1-10	ip	TR	7.5x10 ⁴	105	
	5	1-10	ip	TR	7.5x10 ⁴	105	
	6	1-10	ip	TR	7.5x10 ⁴	105	
III-c TUL	7	1-9	ip	TR	105	105	
	8	1-9	ip	TR	105	105	
	9	1-6	ip	TR	105	105	
	10	1-10	ip	TR	105	105	
	11	1-10	ip	TR	105	105	
IV TUL	1	2-2	IP	TR	103	NO	NO
	2	2-2	IP	TR	103		
	3	1-1	IP	TR	103		
	4	2-2	IP	TR	103		
	5	2-2	IP	TR	103		
	6	2-2	IP	TR	103		
	7	1-1	IP	TR	103		
	8	2-2	IP	TR	103		
	9	2-2	IP	TR	103		
	10	2-2	IP	TR	103		

(*) fueron reinoculados a los 700 dpi.

(.) fueron reinoculados al mes de la primer reinoculación.

(***) fueron reinoculados a los 5-9 años de la primo-infección y dos meses antes de finalizar el estudio. I= inoculación.

V= parásitos procedentes de materia fecal de vinchucas.

T R = tripomastigotes de ratón. R₁= 1ª inoculación. R₂= 2ª inoculación. CA-I = cepa Argentina I. Tul = cepa Tulahuén.

ip = intraperitoneal. conj.= conjuntival. PP= procedencia de parásitos. I₀= edad a la inoculación. S= edad al sacrificio.

3.1.5.- Estudios en los lotes controles y evaluación del perfil de infección de los inoculados:

Se realizaron estudios parasitológicos, serológicos y clínicos para corroborar infección, realizar el seguimiento longitudinal de los canes y evaluar el desarrollo de enfermedad.

Los animales de los lotes controles fueron evaluados mediante estudios parasitológicos, serológicos y electrocardiográficos previos a la inoculación del correspondiente lote de infección, y en dos oportunidades durante el curso de la infección y al sacrificio.

Los animales controles e infectados fueron estudiados por anatomopatología según metodología (Mat. y Mét.3.1.5.4).

3.1.5.1.- Estudios serológicos:

Las muestras de suero se obtuvieron mediante centrifugación de la sangre no heparinizada centrifugada dentro de las dos horas de la extracción. El suero se almacenó a -20°C sin empleo de conservadores.

3.1.5.1.1.- Fijación de complemento (FC) (Reacción de Machado-Guerreiro, 1913) (42,171):

Esta reacción se efectuó en microplaca y se tituló al 100% de hemólisis, con fuente de complemento en exceso y con hemolisina titulada. El antígeno se preparó a partir de cultivos masivos de T.cruzi cultivados en medio bifásico y cosechados a los 12 días. La masa de parásitos fue concentrada por centrifugación a 5.000 g durante 15 minutos, se lavó tres veces con SF y

se resuspendió en agua destilada hasta concentración 1/30 (p/v). Se rompió mediante homogeneizador Sorvall-omnimixer, se volvió isotónico con Cl Na 8.5% ; se empleó azida sódica como conservador (1/10.000), se liofilizó y se lo conservó a 4°C hasta ser utilizado como Homogenato total de T.cruzi (HT) (172).

La reacción de FC se adaptó a sueros caninos. Se proporcionó un aporte adicional de Mg al medio, mediante buffer de Kabat-Mayer pH 7.5 y se evaluó su sensibilidad con lotes de sueros controles de reactividad y de no reactividad para T.cruzi.

3.1.5.1.2.- Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (99,171):

Se emplearon epimastigotes de cultivo de T.cruzi muertos por formol como antígeno. El conjugado estuvo compuesto por suero de conejo anti IgG de perro y marcado con isotiocianato de fluoresceína (Biosys, Compiègne France). Se utilizó un microscopio de epiluminación Carl Zeiss-Jena adaptable a observación con luz ultravioleta y filtros Nº 247 y 510. Se realizaron titulaciones del suero anti IgG y del colorante de contraste (Azul de Evans).

3.1.5.1.3.- Hemaglutinación indirecta (HAI) (99,171):

Se empleó el equipo comercial de la firma Polychaco S.A. Buenos Aires, Argentina y que incluyó el antígeno trypanosomal y glóbulos rojos formolados para soporte inerte de adsorción de antígenos de T.cruzi, que en presencia de anticuerpos específicos favorecen la aglutinación de los glóbulos. Se emplearon, además glóbulos rojos formolados desprovistos de antígeno tripanosomal como control de aglutinación inespecífica.

3.1.5.1.4.- Aglutinación directa (AD):

Para la reacción de aglutinación directa se utilizó un equipo comercial (Polychaco S.A. Buenos Aires. Argentina) para la detección de anticuerpos específicos en humanos y aplicado a sueros caninos. Se utilizaron reactivos y soluciones tamponadas de dilución tal cual se recomiendan en el equipo.

3.1.5.1.5.- Reacción inmunoenzimática de ELISA (173):

Se realizó la adsorción pasiva del antígeno a una placa de poliestireno (fase sólida) de 96 orificios durante 24 hs, y previamente a su empleo las placas fueron bloqueadas con PBS-leche Difco 3% (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) durante 60 minutos.

Se empleó una dilución 1/100 de sueros caninos en buffer PBS-leche Difco 1% y de 1/300 para la anti-inmunoglobulina canina marcada con peroxidasa. Se empleó ortodifenil-diamina Sigma Chemical Co. Saint Louis. Missouri. USA. (OPD) como sustrato. El antígeno fue HT (172) empleado en una dilución 1/200 en solución tamponada de carbonato pH 9.6. Se utilizaron tres soluciones salinas estabilizadoras: de fosfatos pH 7.2, de carbonato pH 9.6 y una estabilizadora del sustrato (ácido cítrico-fosfato disódico) pH5. La reacción colorimétrica se interrumpió con Cl H 2.5N. Y la lectura se efectuó con un espectrofotómetro MR 700 (Dynatech Laboratories Inc. Meditrón S.R.L. Buenos Aires, Argentina) empleando filtro 4 para referencia y filtro 3 para lectura de muestra a una longitud de onda de 490nm.

3.1.5.1.6.- Sueros controles de reactividad:

Se utilizaron sueros de perros experimentalmente infectados con T.cruzi de los L I y LII. Se ensayaron las reacciones de AD y HAI y una vez corroborada su reactividad fueron alicuotados y conservados a -20°C hasta ser utilizados en la adaptación de las restantes reacciones serológicas y como control positivo de todas ellas.

3.1.5.1.7.- Sueros controles de no reactividad:

Los controles negativos procedieron de perros nacidos en la ciudad de Buenos Aires, que no habían tomado contacto previo con áreas endémicas para la enfermedad de Chagas, ni siquiera por breves periodos, y fueron controlados según metodología descripta (Mat. y Mét. 3.1.2.1). Una vez que se aseguró la no reactividad de estos sueros, se los separó en alicuotas y conservó a -20°C para ser empleados en la adaptación de las restantes reacciones serológicas de humanos a sueros de canes.

Por tratarse de reacciones serológicas desarrolladas para el diagnóstico en humanos, se contó siempre con sueros humanos controles de reactividad y de no reactividad que se utilizaron durante el primer año de trabajo. Solamente se los excluyó una vez verificada la adaptabilidad a sueros caninos.

A posteriori de la evaluación de la utilidad de la glicerina bufferada como solución conservadora (174) en cien sueros caninos (Result. Cap. II, 5.7) se empleó este método conservador en sueros controles reactivos, no reactivos y en sueros a estudiar.

3.1.5.2.- Estudios parasitológicos:

Para el empleo del método del xenodiagnóstico (41) los perros fueron sometidos a la picadura de 40 T.infestans de 3º estadio durante 15 minutos según metodología descripta para humanos (41), se usaron 4 cajas de madera que contenían 10 insectos cada una .

La lectura de las heces de los redúvidos se realizó a los 30 y 60 días de la aplicación de las cajas. El xenodiagnóstico fué considerado positivo cuando se detectó T.cruzi por lo menos en una de las suspensiones acuosas obtenidas a partir de la mezcla de materia fecal de los insectos de una caja.

La detección de parasitemia por xenodiagnóstico se realizó en todos los lotes: en L I a los 30 dpi y a los 5, 15, 20 y 24 mpi. En L II se efectuaron dos controles quincenales durante el primer mes de la infección y mensuales hasta los 22 meses, fecha en que se sacrificó a dos animales y se reinocularon los otros dos. Xenodiagnósticos se efectuaron durante el seguimiento de los 60 días post-reinoculación (dpr) hasta el sacrificio. En los perros de L III los estudios parasitológicos se realizaron en tres oportunidades: a los 7 mpi, previamente a la reinoculación y al 1º mpi.

Se utilizaron métodos de observación directa Strout (128) con enriquecimiento previo por centrifugación en muestras de sangre heparinizada y microhematocrito (129) por centrifugación de la sangre de canes de L II.

3.1.5.3.- Estudios clínicos:

Se obtuvieron electrocardiogramas seriados en los lotes de infección y en los controles no infectados. Los animales fueron ubicados en posición decúbito-dorsal, sin la administración de

anestesia. Los electrodos fueron aplicados en tejido subcutáneo de los miembros mediante el uso de agujas de 25/0.8mm. Se obtuvieron las seis derivaciones precordiales clásicas de ECG en humanos. Los puntos de aplicación de los electrodos en el tórax correspondieron al 5º espacio intercostal lado derecho a la altura medio tórax (V1), 5º espacio intercostal lado izquierdo a la altura medio tórax (V2), 6º espacio intercostal uniones costocodrales (V4), punto medio entre V2 y V4 (V3), 6º espacio intercostal lado izquierdo a la altura medio tórax (V6), punto medio entre V4 y V6 (V5).

Se utilizó un electrocardiógrafo marca Fukuda Century (Japan) modelo SCC-1, con un módulo de 1cm/seg., con una velocidad del papel de 2,5 cm/seg. y una amplitud de 10 mm.

Los estudios ECG previos y posteriores a la aplicación de aspartato de ajmalina de los perros de L III, tuvieron por objeto evaluar el estado clínico de los animales y predecir futuros trastornos eléctricos mediante el uso del fármaco.

Se obtuvieron registros ECG previos y a los 3, 6, 9, 12 y 15 minutos de la aplicación endovenosa de ajmalina.

3.1.5.4.- Estudios anátomo-patológicos:

Los estudios anatomopatológicos de L I y L III fueron realizados por el Dr. A. Costa del Instituto "Dr. A. Lanari" y el L II por la Dra. Adelina Riarte, patóloga del INDIECH. L I se sacrificó entre los 14 y 24 mpi, y dos de L II a los 21-22 mpi.

Las autopsias se realizaron en forma completa. Se efectuó la descripción macroscópica de todos los órganos, y los tejidos se fijaron en una solución de formol tamponado al 10%. Posterior a la fijación, la toma de muestras se realizó de la siguiente manera:

25	secciones de corazón
10	" de c6lon
5	" de es6fago
5	" de m6sculos cuadriceps, psoas y diafragma
2	" de h6gado, bazo, cerebro, vejiga, ri6n, adrenal y ganglios linf6ticos.

Las muestras de tejido se incluyeron en parafina, se deshidrataron en alcoholes de graduaci6n creciente, se seccionaron con un espesor de 5µm y se tiñeron con hematoxilina, eosina y Tricr6mico de Masson (175).

3.2.- ADAPTACION DE LAS REACCIONES SEROLOGICAS AL ESTUDIO DE SUEROS CANINOS:

Se presenta la metodología de adaptación de reacciones serológicas de humanos a sueros caninos:

3.2.1.- Sueros empleados:

Para adaptar cinco reacciones serológicas de humanos a sueros de perros, se utilizó el suero de 610 perros mestizos. Con el propósito de conocer la sensibilidad de estas reacciones, contar con sueros controles de reactividad y evaluar las variaciones en el perfil serológico de una infección canina por T.cruzi de larga duración, se utilizaron sueros de perros experimentalmente infectados, controles sanos de infección y sueros de perros infectados en áreas endémicas de nuestro país.

3.2.2.- Lotes de animales y estudios realizados:

Todos los perros utilizados en la adaptación de reacciones serológicas a sueros caninos fueron estudiados parasitológicamente por xenodiagnóstico (41) previamente a la extracción de sangre.

Los animales pertenecieron a cinco categorías: 134 perros eran parasitémicos y provenían de dos localidades de la provincia de Santiago del Estero. De ellos, 67 eran de la localidad de Amamá (Departamento de Moreno) y 67 de Termas (Departamento de Río Hondo). Ellos conformaron el L A.

El L B estuvo constituido por 286 perros no parasitémicos, procedentes de Amamá y Termas en número de 21 y 265 respectivamente.

El L estuvo formado por diez perros parasitémicos experimentalmente infectados con T.cruzi de los lotes I, II y

III (Mat. y Mét. 3.1.3.).

L D incluyó a 28 perros no infectados que habían nacido y vivido siempre en la ciudad de Buenos Aires, un área no endémica para la Enfermedad de Chagas. Todos esos animales pertenecían además, a familias que aseveraron que los animales nunca migraron a áreas endémicas. Cuatro de ellos mostraron patologías no relacionadas con la Enfermedad de Chagas, uno presentó leptospirosis, dos moquillo y uno Enfermedad de Carré.

Por último, L E estuvo constituido por 152 perros parasitéticos de Amamá.

La Tabla VI muestra las características de los animales y los estudios asociados. En las reacciones serológicas de FC (171), IFI (171) y ELISA (173) debieron modificarse los patrones metodológicos de uso en sueros humanos (Mat. y Mét.3.1.5.1).

Se emplearon equipos comerciales de AD y HAI (Polychaco S.A. Buenos Aires, Argentina) que se adaptaron a los sueros caninos sin requerir modificaciones (Mat. y Mét.3.1.5.1.4-5).

Los perros de los L A y B se estudiaron clínica y parasitológicamente durante tres viajes realizados al área endémica en 1982, 1984 y 1986. Ningún perro sangrado durante un viaje fué sangrado durante los años siguientes (Fig. 2).

Una vez verificada la sensibilidad de las reacciones mediante el suero de animales experimentalmente infectados y el de canes parasitéticos de áreas endémicas, éstas fueron utilizadas para descartar animales naturalmente infectados con T.cruzi candidatos a modelos y realizar con ellas evaluaciones epidemiológicas en áreas endémicas.

Sesenta y siete sueros de canes parasitéticos y 21 sueros de no parasitéticos de Amamá, 67 sueros de perros parasitéticos y

265 de canes no parasitéticos de Termas y todos los del lote D se emplearon para conocer la distribución de frecuencias de los títulos serológicos de IFI y HAI.

La sensibilidad de IFI, HAI, FC y AD se determinó por el empleo de los canes de los lotes A y B, y se evaluó la sensibilidad de ELISA mediante los sueros del lote E.

3.2.3. Evaluación de una solución conservadora de sueros caninos:

El suero de 100 perros de la localidad de Termas seleccionados al azar se conservó en dos alícuotas: una muestra de suero puro y otra de suero glicerinado al 50% en una solución de glicerina Merck - solución tamponada de fosfatos pH 7.2 (9 partes de glicerina - 1 parte de solución tamponada) (172).

Ambas muestras de suero fueron conservadas a -20° C hasta su procesamiento a los pocos días de la llegada al INDIECH.

Los resultados obtenidos en ambos casos de IFI y HAI fueron comparados y se efectuó ELISA en los discordantes.

TABLA VI

Lotes de animales utilizados para la metodología de adaptación de reacciones serológicas.

Lote	Nº de animales Total	Procedencia Parcial	Parasit.
A	134	67 Termas 67 Amamá	Xeno P Xeno P
B	286	265 Termas 21 Amamá	Xeno N Xeno N
C	10	10 Buenos Aires	Xeno P
D	28 &	28 Buenos Aires	Xeno N
E	52	52 Amamá	Xeno P

(&) 24 perros eran clínicamente sanos y 4 mostraban alguna patología (leptospirosis (1), moquillo (2), enfermedad de Carré (1).

Xeno P = xenodiagnósticos positivos.

Xeno N = xenodiagnósticos negativos.

3.3.- METODOLOGIA APLICADA AL CONOCIMIENTO DE LOS PARAMETROS BASICOS POBLACIONALES DE CANES DE AREAS ENDEMICAS PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

3.3.1.- Características del área epidemiológica:

3.3.1.1.-Ubicación geográfica y perfil socio-cultural:

Se realizó el estudio en una zona rural periférica a la Ciudad de Termas del Departamento de Río Hondo de la provincia de Santiago del Estero, Argentina. Las figuras 2B, 2C y 3 muestran la ubicación geográfica del Departamento de Río Hondo, el área estudiada en ese departamento y el mapa de la zona de estudio respectivamente. El área fue seleccionada tomando en cuenta los niveles de infestación triatomina de las viviendas, ya que hubo presencia de insectos en casi el 100% de los domicilios. Se la denominará en el futuro la Zona.

Esta área pertenece a la Región Fitogeográfica Chaqueña, que comprende 655.000 km² y tiene un clima semiárido con una media anual pluvial de 550-700 mm. La figura 2A muestra la Provincia de Santiago del Estero en el mapa de la República Argentina. Tiene dos estaciones, una seca (de noviembre a abril) y otra húmeda (de mayo a octubre) con una temperatura media mensual que oscila entre los 13 y 27 °C. La Zona incluye una superficie de 440 km² y es un valle de 1 km de ancho surcado por el Río Dulce y localizado entre 4 y 50 km de la Ciudad de Termas y a 70 km de la capital de la provincia. En esta área hay 611 viviendas habitadas por lo menos durante una parte del año donde viven 2995 habitantes rurales. Muestra la vegetación típica de esta provincia fitogeográfica y la forestación es por quebracho de los

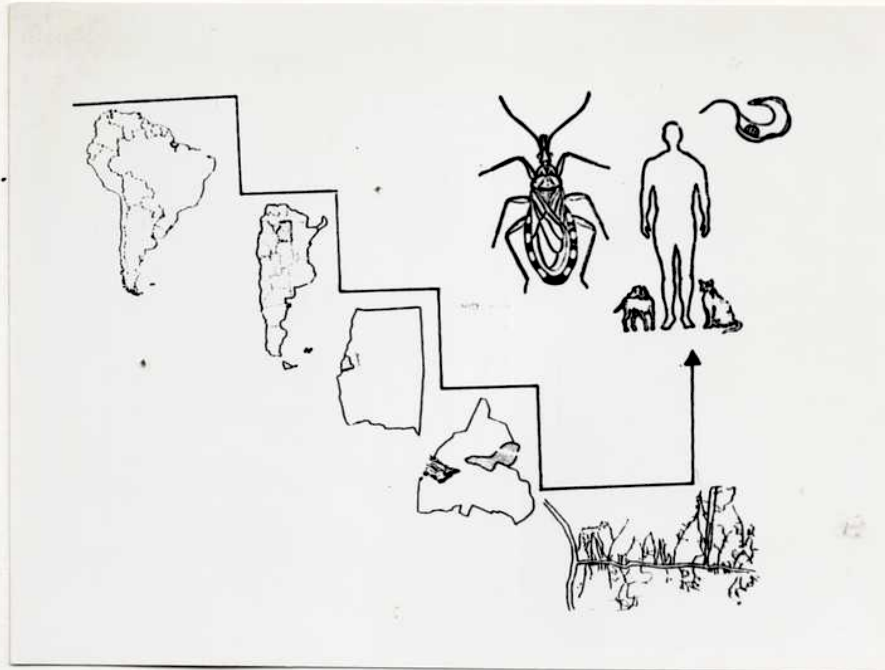


Fig.2.- Mapas de Sud América, de Argentina, de la provincia de Santiago del Estero (2A), del Departamento de Termas de Río Hondo (2B) y del área de estudio (2C).

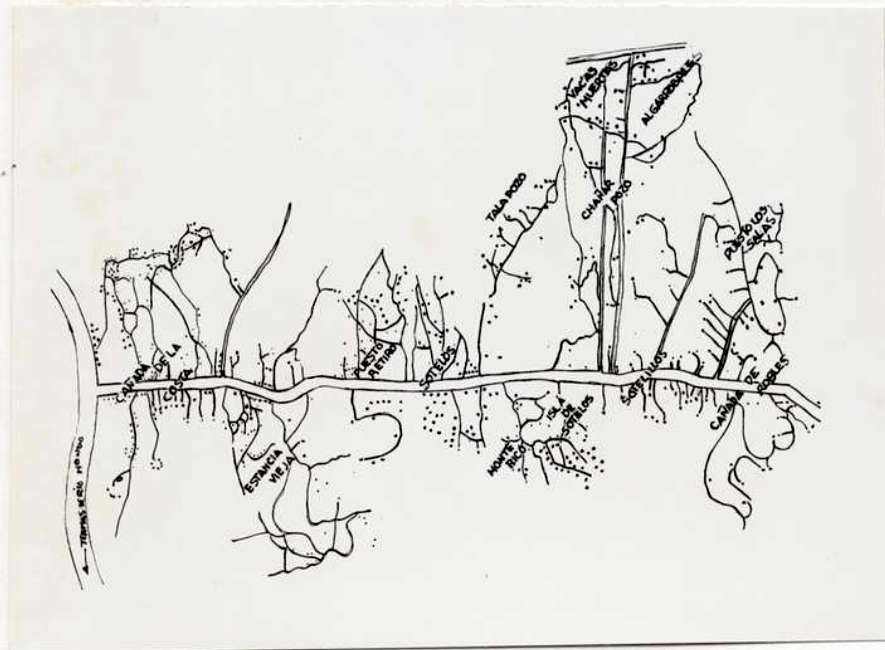


Fig.3.- Mapa general de la zona de estudio. Se ubica la dirección a la ciudad de Termas.

géneros Aspidosperma sp y Schinopsis sp., quebracho blanco y colorado respectivamente. La deforestación parcial a la cual fue sometida la zona desde el siglo pasado ha generado el desarrollo de una formación secundaria de arbustos espinosos xerófilos (Acacia furcatispina (tusca) , Larrea divaricata (jarilla) y Cercidum praecox (brea). Algarrobos blanco y colorado (Prosopis alba) y Prosopis flexuosa , son vistos habitualmente allí.

La Zona tiene fauna muy rica, se incluyen 20 diferentes especies de peces, 18 de anfibios, 36 de reptiles, 300 de pájaros y 52 de mamíferos entre los que se encuentran los siguientes:

Comadreja colorada (Lutreolina crassicaudata)

Comadreja overa (Didelphis albiventris)

Conejo de monte (Pediolaqus salinicola)

Liebre (Dolichotis patagonum centricola)

Vizcacha (Lagostomus maximus inmolis)

Murón (Eira barbara)

Gato montés (Felis geoffroyi paraguayae)

Puma (Felis concolor)

Los recursos naturales se han visto degradados por efecto de una deforestación indiscriminada y con los años la zona se ha empobrecido visiblemente.

Desde comienzos de siglo la población estable en edad de trabajar se dedica a la cría del ganado caprino, a la explotación de leña ó a la venta de artesanías elaboradas por sus habitantes. Tambien es característica en la zona la migración de sus pobladores para ser empleados como mano de obra transitoria en ingenios en la época de la zafra o durante los meses de verano brindando servicios turísticos en todo el país, sobre todo en la

costa atlántica. Así, por diversas actividades las familias se ven obligadas a migrar varios meses del año y las viviendas quedan deshabitadas de humanos, animales domésticos y ganado.

El acceso por caminos al área es dificultoso, y en algunos tramos es inexistente. Para realizar este trabajo el transporte por la zona se efectuó con vehículos del Servicio Nacional de Chagas (SNCh).

3.3.1.2.- Cobertura médico-sanitaria de los habitantes de la zona:

La provincia de Santiago del Estero tiene instrumentado el plan de Atención Primaria de la Salud (APS) para áreas rurales, donde agentes sanitarios locales tienen a cargo visitas periódicas a las viviendas asentadas en un área circunscripta asignada, y su función es, entre otras, vacunar a niños y mujeres embarazadas, prestar información sanitaria y si se requiere derivar pacientes al Hospital Zonal. En la Zona, 6 agentes están a cargo del control sanitario de los habitantes y sus actividades son coordinadas por el personal médico del Hospital Zonal de Termas. Hay cuatro puestos sanitarios en ese área y las viviendas carecen de electricidad, gas natural y desagües cloacales.

En la Zona se ha desarrollado un plan piloto para la interrupción de la transmisión de la infección por T.cruzi en el hombre y los animales domésticos. Este plan fue financiado por el TDR (Programa de Intercambio y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales) de la Organización Mundial de La Salud con sede en Ginebra (Suiza), se inició en 1985 y el desarrollo del proyecto tuvo una duración de 5 años. La infraestructura montada en el área favoreció la obtención de los datos de campo que aquí se presentan. La importancia indiscutida de los reservorios caninos

en el conocimiento de la dinámica de la infección de esa zona justifica ahondar en su rol, sobre todo si se considera el importante papel que juega el perro en la economía y en el contexto social de la familia rural.

3.3.1.3.- Tipificación de las viviendas del área:

Con el propósito de tipificar las características edilicias de las viviendas incluidas en este estudio, se las encuadró en una de tres categorías:

1.- Ranchos (tipo 1): son las viviendas más primitivas construidas exclusivamente con materiales autóctonos. Incluyen techo de paja con barro, paredes de adobe montadas sobre estructuras de parantes sin ladrillos, de barro cocido intercalados y piso de tierra. La Figura 4A muestra el aspecto de un rancho típico vivienda tipo 1. La figura 4B muestra el interior de una vivienda rural. La acumulación de materiales facilita la cría de redúvidos en su interior.

2.- Viviendas mixtas (tipo 2): incluyen estructuras tipo rancho con algunos materiales de construcción urbano (techo de zinc ó de fibrocemento, cobertura interna del techo con láminas de telgopor, piso de cemento, paredes de ladrillo unidos por cemento paredes de bloques de cemento, etc.) La Figura 5 muestra una vivienda mixta del área de estudio.

3.- Viviendas de material (tipo 3): son las más evolucionadas y estan construidas exclusivamente con materiales comerciales de construcción, con total exclusión de materiales autóctonos: Techos de zinc o fibrocemento, paredes de cemento o ladrillo y piso de cemento o mosaico. La Figura 6 muestra el aspecto de una vivienda de material.

3.3.1.4.- Evaluación entomológica de las viviendas:

Con la colaboración del Personal de Evaluación del SNCh se determinó el grado de infestación del domicilio y de los locales peridomiciliarios de todas las viviendas incluidas en el área. La metodología de búsqueda de los vectores fue la recomendada por el SNCh y consistió en el recuento y recolección de todos los triatominos de la vivienda inmediatamente después del rociado con un irritante químico (Neopinamin 0.2%) que en la dosis empleada favorece la salida de los insectos de sus escondites. La tarea se prolongó durante media hora con dos operadores (176). La evaluación entomológica incluyó dos etapas, una realizada previamente a la desinsectación masiva del área para proporcionar información del nivel de infestación basal de las viviendas, y una segunda de evaluación realizada a los diez meses de la desinsectación y simultáneamente con los registros de los parámetros de infección en los canes.

3.3.1.5.- División de la zona de estudio de acuerdo a la distancia a la Ciudad de Termas:

Con el propósito de conocer la influencia de un poblado urbano en las características socio-culturales, arquitectónicas, y ambientales de cada ecosistema rural se dividió la zona en tres subáreas: periurbana (Pe), intermedia (I) y rural (R) de acuerdo a distancias creciente a la ciudad de Termas y a las características estructurales de las viviendas. El área Pe distante entre 4 y 5 kms de la ciudad, incluía mayoría de

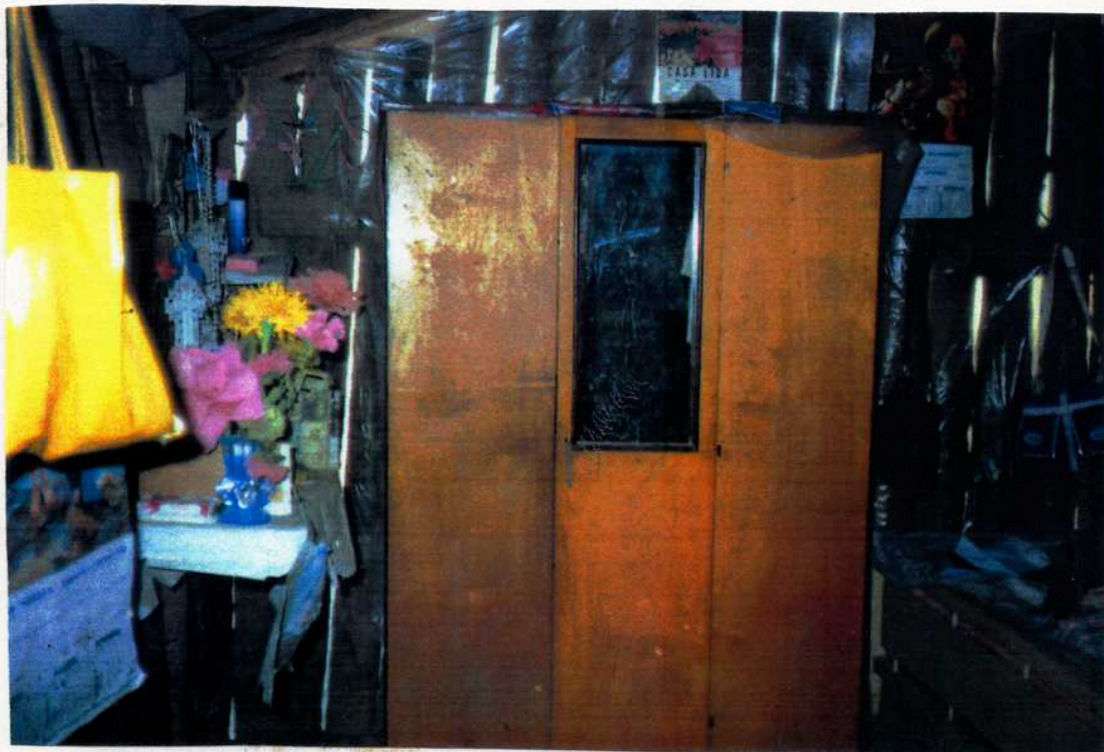
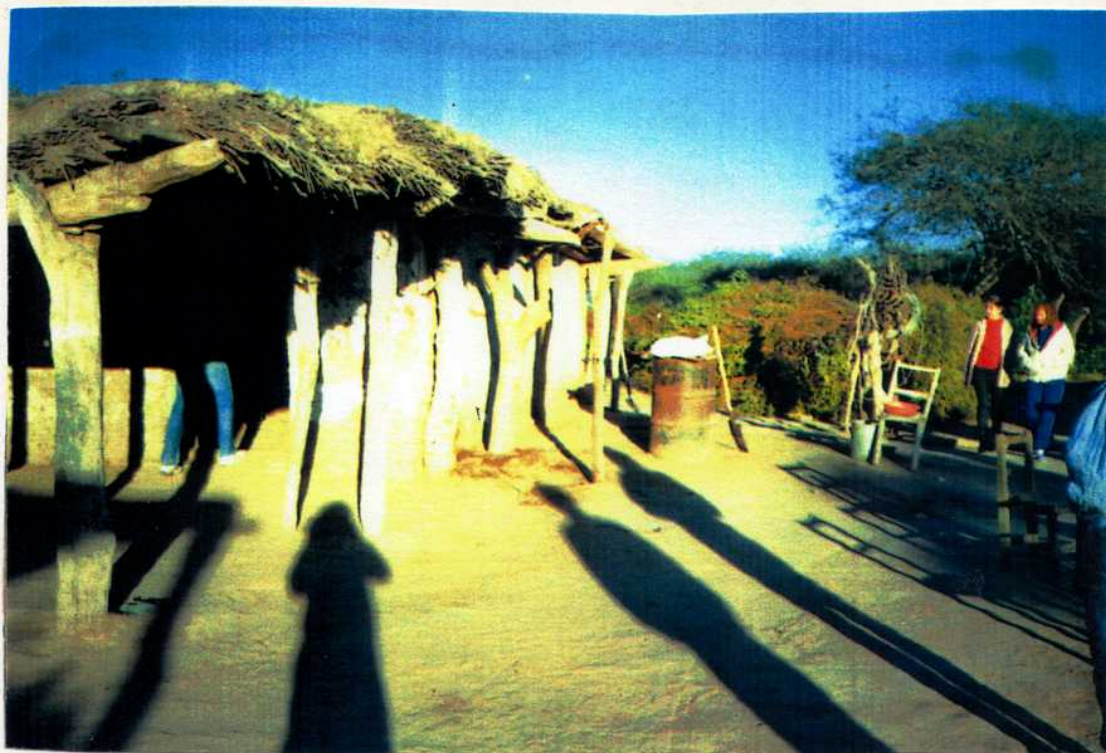


Fig. 4.- A: Fotografía de una vivienda rural.
B: Fotografía del interior de una vivienda rural.

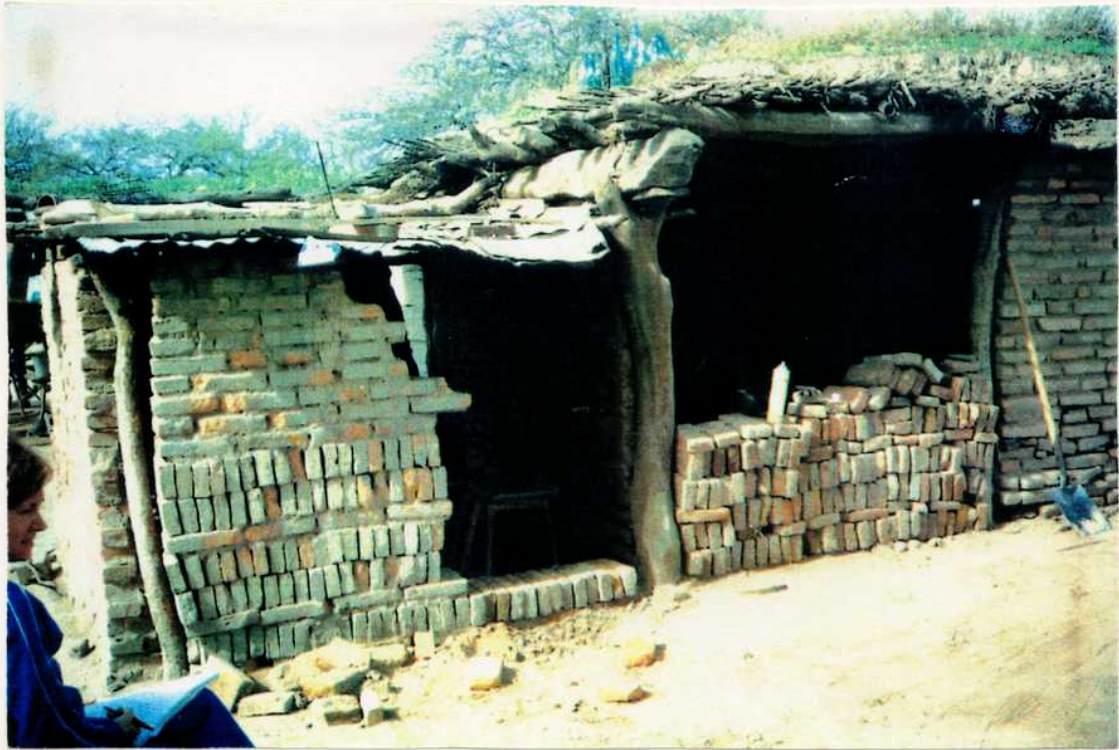


Fig. 5.- Fotografía de una vivienda mixta, es característica la acumulación de ladrillos u otros materiales de construcción.



Fig. 6.- Fotografía de una vivienda urbana de paredes revocadas.

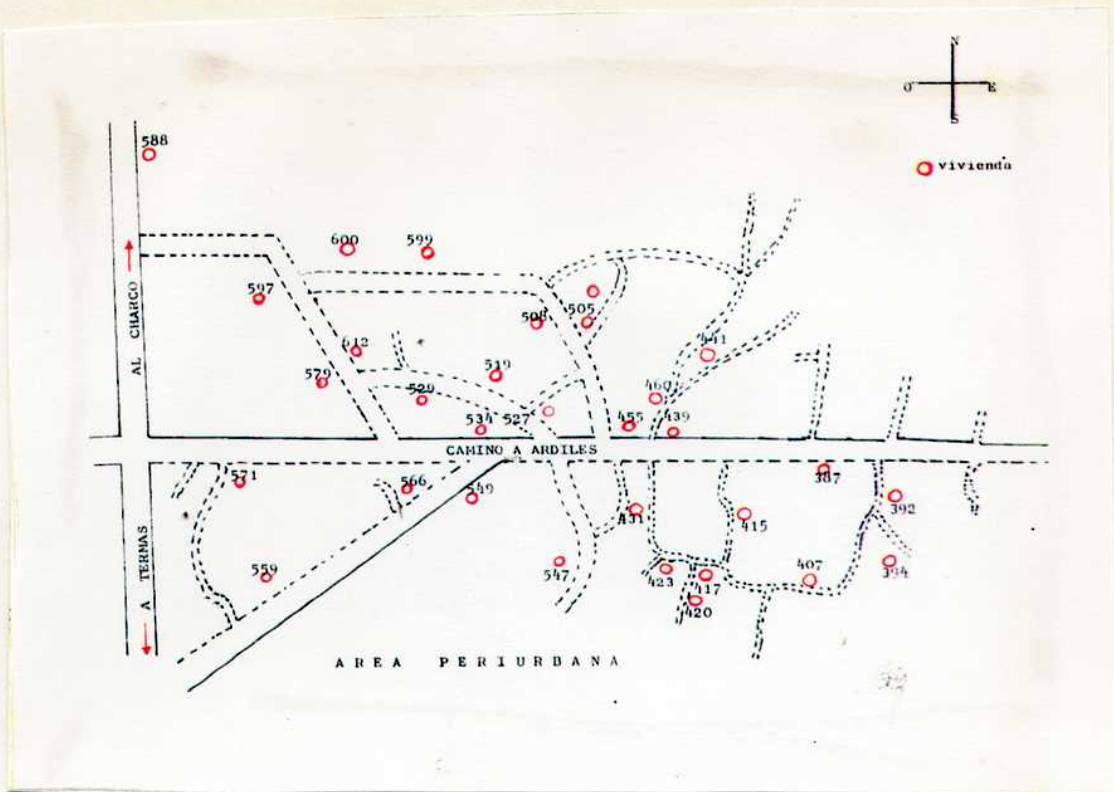


Fig. 7.- Diagrama topográfico del área periurbana, con señalización de rutas, caminos y viviendas.



Fig. 8.- Diagrama topográfico del área intermedia, con señalización de rutas, caminos, viviendas, tres escuelas, una iglesia y un puesto sanitario.

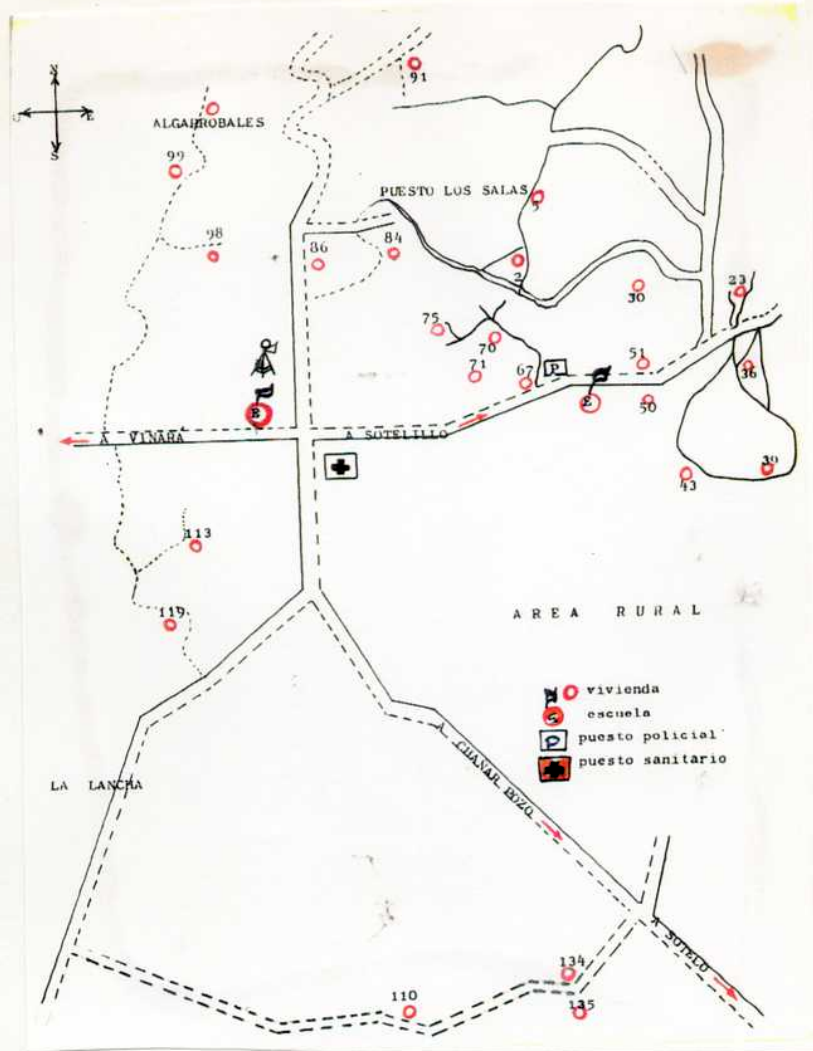


Fig. 9.- Diagrama topográfico del Área rural, con señalización de rutas, caminos, viviendas, dos escuelas, un puesto policial, un puesto sanitario y un molino.



CODIFICACION	Número y tipificación de vivienda	
	Número de perro	
DESCRIPCION	Ubicación de la casa según subáreas	
	Nombre del dueño del animal	
	Edad	Pelaje
	Sexo	Contextura
	Tamaño	Señas particulares
CUESTIONARIO	Color	
	Hábitos de caza	
	Hábitos alimentarios	
APARIENCIA FISICA	Migraciones	
		

Fig 10.- Diagramación de las encuestas e identificación de los animales.

viviendas de material, el área I distaba entre 15 y 30 kms de Termas y tenía viviendas mixtas y ranchos en similares proporciones, y el área R distante de 30 a 50 kms mostraba ausencia de casas de material (Tablas I, II y III del Apéndice). Cada subzona incluyó dos áreas relevadas por agentes sanitarios del sistema de APS.

3.3.1.6.- Selección de las viviendas y topografía del área:

Se seleccionaron 108 de las 611 viviendas del área, de acuerdo a dos condiciones impuestas:

- 1.- Que se hubieran encontrado triatominos durante la búsqueda entomológica realizada un año antes con el personal del SNCh.
- 2.- Que en las viviendas habitara al menos un perro.

Las figuras Nº 7, 8 y 9 muestran los diagramas topográficos correspondientes respectivamente a las áreas Pe, I y R de la Zona. En los mapas se detallan rutas nacionales y provinciales, caminos, viviendas estudiadas, escuelas, puestos sanitarios y policiales e iglesias.

3.3.2.-Encuesta epidemiológica realizada a los dueños de los perros incorporados a este estudio:

Se programó un cuestionario para ser respondido por los dueños de los canes para saber las características y hábitos de los perros de la muestra y que incluyó cinco sectores:

- codificación
- descripción
- cuestionario
- características físicas (Identikit).

3.3.2.1.- Codificación:

Se programó un sistema simple de codificación de los animales numerados en orden consecutivo de incorporación al estudio, acompañado del número de sector correspondiente al agente sanitario y del número de vivienda otorgado por el plan piloto antes mencionado.

3.3.2.2.- Descripción:

Se incluyeron datos de sexo, edad, tamaño, estimación de peso, apariencia, color, contextura y tipo de pelaje.

3.3.2.3.- Cuestionario:

El interrogatorio estuvo asociado a:

a) la procedencia de los animales.

b) su actividad en la vivienda (en este caso se discriminaron tres actividades básicas y sus combinaciones).

1.- animales guardianes de la casa,

2.- cazadores que desarrollan actividades de caza en el monte,

3.- los cabreros arreadores de cabras, animales que se alimentan de leche de cabra durante la lactancia, cuidan de las cabras y pernoctan con ellas en los corrales o en el monte. Por tratarse de una característica ocupacional, se convino incluir en esta clasificación solo a los animales mayores de un año.

c) Sus hábitos alimentarios.

d) Sus hábitos de caza si se trataba de un animal cazador.

e) Su permanencia en la vivienda (posibilidad de pernoctar fuera de la casa para la evaluación de otras posibles fuentes de infección). Debido a las características migratorias de la población humana de la zona se determinó cuántos de esos

animales eran migrantes junto con los humanos.

f) El lugar de la vivienda donde duerme el perro para evaluar su asociación al domicilio y al peridomicilio.

La figura 10 muestra un esquema de la encuesta epidemiológica empleada en el estudio.

3.3.2.4.- Características físicas:

Se realizó un identikit de cada animal detallando señales características, manchas y color del pelaje a ambos flancos y en la cara.

3.3.3.- Metodología de evaluación del perfil de infección de los animales estudiados:

3.3.3.1.- Número de perros estudiados:

Se computaron 353 perros habitantes de las 108 viviendas seleccionadas para este estudio. Ocho perros (2%) debieron ser excluidos por los siguientes motivos: tres estuvieron ausentes en dos oportunidades en que se visitó la vivienda, dos se escaparon al monte, dos fueron regalados para la fecha del estudio y uno fue excluido por su agresividad. Sobre un total de 345 perros se determinó la Densidad Poblacional Canina por vivienda (DPC) definida como el número total de perros habitantes de las viviendas del área total y de las subáreas.

3.3.3.2.- Estudios efectuados en terreno:

Se calcularon las prevalencias de infección y morbilidad de los perros habitantes de viviendas infestadas con triatominos por estudios serológicos, parasitológicos y clínicos. Estas correspondieron al 97% de las viviendas con caninos de la Zona.

Se define la prevalencia como la frecuencia de infectados respecto del total de individuos de la muestra.

El tipo de estudio y número de animales se presentan en la Tabla VII.

3.3.3.2.1- Estudios serológicos:

Se extrajeron 8 ml de sangre no heparinizada de vena braquiocefálica, yugular ó safena de 331 perros de los 345 encuestados (95%), y se separó el suero con el objeto de detectar anticuerpos específicos anti-T.cruzi. Se dejó retraer el coágulo y se conservó el suero en alícuotas y congelado hasta su procesamiento en el INDIECH. Una vez normatizado el método de conservación para sueros caninos (Result. Cap II.5.7) se los conservó diluidos al 50% en glicerina bufferada (nueve partes glicerina Merck/ una parte de solución estabilizadora de fosfatos pH 7.2), diluyente empleado como conservador de muestras de suero humano (173).

La figura 11 muestra una fotografía del área donde se observan muestras sanguíneas recién extraídas y listas para ser centrifugadas. La figura 12 es una fotografía del área operativa en la que se está realizando la reacción serológica de HAI.

3.3.3.2.2.- Estudios parasitológicos:

La parasitemia de 340 perros (99% de los ingresados al estudio) fue detectada por xenodiagnóstico (41). Se utilizaron 20 T.infestans por perro.

Se seleccionó una muestra al azar de 42 sueros a los que se les realizó el método de enriquecimiento de Strout (128) para la búsqueda de parásitos por observación directa.

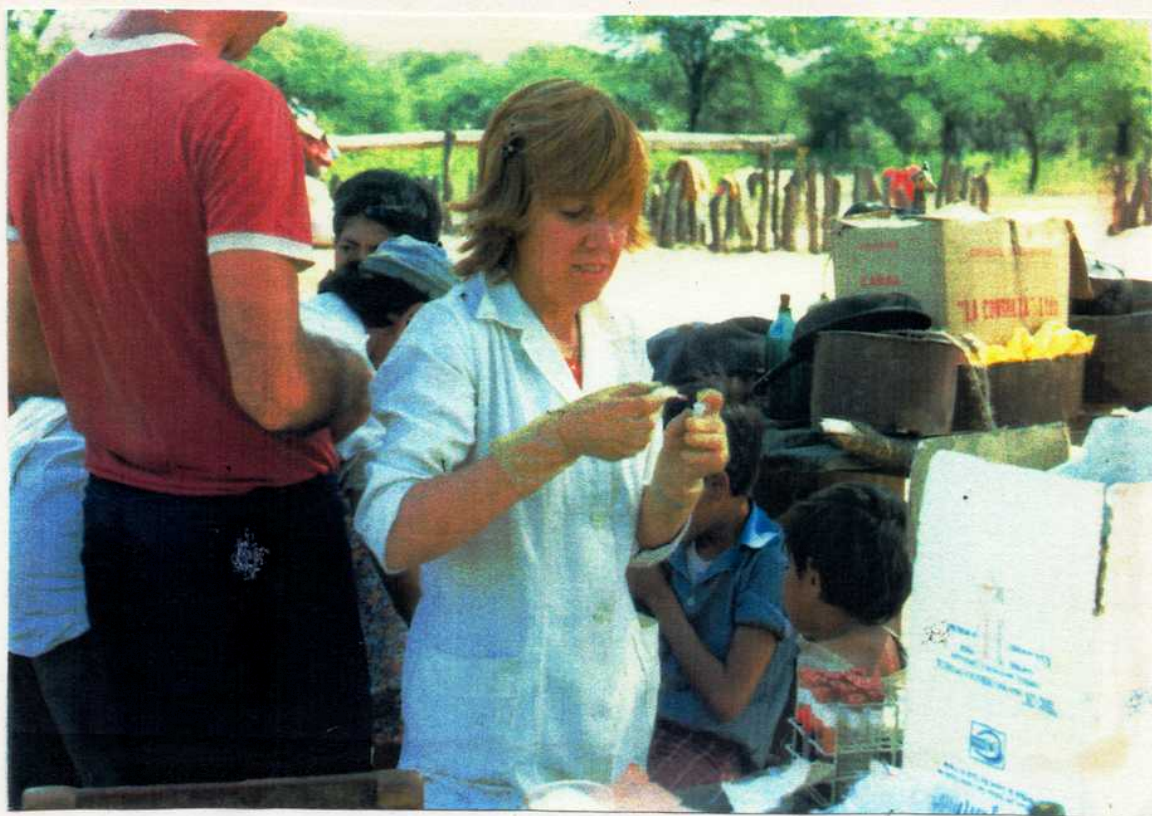


Fig. 11.- Extracción de sangre en el área operativa.



Fig. 12.- Estudios serológicos de hemaglutinación indirecta realizados en terreno.

La separación y preparación de muestras de sangre para serología y Strout se realizó diariamente al regreso del laboratorio.

3.3.3.2.3.- Estudios clínicos:

Con el objeto de evaluar el estado clínico de los animales se obtuvieron 85 registros electrocardiográficos (ECG) de los perros mayores de dos años. Se siguió la misma metodología y se contó con el mismo equipo que se empleó con los animales infectados experimentalmente.

3.3.3.3.- Estudios realizados en el laboratorio:

3.3.3.3.1.- Estudios serológicos:

Las muestras glicerizadas de suero y el suero puro fueron remitidos al INDIECh., donde se realizaron IFI y HAI. Se realizaron estudios de ELISA con los discordantes. Las reacciones serológicas se realizaron según metodología previamente descripta.

3.3.3.3.2.- Estudios parasitológicos:

La lectura de las heces de los insectos se realizó a los 30 y 60 días de aplicadas las cajas según metodología para humanos (41).

3.3.3.3.3.- Estudios clínicos:

La interpretación de los ECG fué efectuada por el Dr. Julio Lázzari en el Hospital Municipal Ramos Mejía de la Ciudad de Buenos Aires.

La Tabla VII detalla los estudios del seguimiento de la infección, y su frecuencia. Los estudios serológicos y parasitológicos fueron iniciados inmediatamente después de dejar el terreno.

TABLA VII

Estudios para evaluar el perfil de infección de 345 canes habitantes de las viviendas encuestadas.

Tipo de estudio	Perros estudiados	%	(respecto de 345 canes)
Extracción de sangre	332	96	
Evaluación de anti-cuerpos específicos	331	95	
Hemaglutinación indirecta	332	96	
Inmunofluorescencia indirecta	331	95	
E.L.I.S.A.	14	4	
Xenodiagnóstico	340	99	
Strout	42	12	
ECG	85*	45	

(*) se efectuó ECG a los mayores de dos años de las áreas periurbana e intermedia.

3.4. EVOLUCION DE LA INFECCION POR T.cruzi EN PERROS.

3.4.1. Comparación entre los perfiles de infección de perros experimental y naturalmente infectados con T.cruzi:

Estudios parasitológicos por xenodiagnóstico (41) (Mat. y Mét 3.1.5.2/3.3.3.2.2.) y serología mediante IFI y HAI (Mat. y Mét.3.1.5.1/3.3.3.3.1) en canes de laboratorio y de terreno se emplearon para trazar sus respectivos perfiles de infección y compararlos entre sí.

Estos procedimientos presentaron diferencias metodológicas según se aplicaron a animales de campo o del laboratorio:

a.- Los estudios de campo fueron transversales. Seguimientos corto y largo plazo se efectuaron en los del laboratorio.

b.- Los canes de terreno se sometieron a un protocolo único de seguimiento de la infección (Mat. y Mét. 3.3.3.2). En el laboratorio, la evaluación de los respectivos protocolos fué realizada con la frecuencia que cada caso requería.

3.4.2. Parámetros de infección:

Pertenecieron a dos modalidades: unos permitieron evaluar morbilidad (estudios electrocardiográficos y anátomo-patológicos). Otros, trazar el perfil parasitológico-serológico de la infección.

3.4.2.1.- Comparación de los perfiles parasitológicos y serológicos entre la infección natural y experimental:

Para cada lote experimental se corroboró la homogeneidad del comportamiento parasitológico y serológico individual y se descartaron aquellos que se apartaban de los respectivos patrones. Se comparó este comportamiento entre lotes inoculados

con la misma cepa en diferentes condiciones metodológicas (vía, procedencia de parásitos, dosis, etc), y se confrontaron los perfiles con los obtenidos en la infección natural.

3.4.2.2.- Comparación de los resultados de morbilidad entre canes natural y experimentalmente infectados con T.cruzi:

Se calculó la prevalencia de morbilidad en ambos grupos de infección (natural y experimental), como el número de animales infectados con trazados alterados respecto del número de canes infectados con T.cruzi provistos o no de alteraciones ECG.

Se determinó la proporción atribuible (177) a cada alteración como el entre la diferencia de prevalencias para esa alteración entre los expuestos (I_1) y los no expuestos a la infección (I_0) y la prevalencia de ésta entre los expuestos

$$PA = \text{Proporción atribuible a una dada alteración} = \frac{I_1 - I_0}{I_1}$$

$$PA = 1 - (1/RT) \quad RT = \text{Razón de tasas.}$$

PA fué evaluada en animales estudiados en campo (infectados y no infectados) y en el laboratorio (infectados controles), y actuó como medida de la atribución para cada alteración ECG a la infección por T.cruzi (177).

Los resultados ECG de los pobladores de la zona fueron obtenidos por el Dr. Sergio Sosa Estani y comparados con los registrados en perros de la misma área.

3.4.3.- Limitaciones metodológicas y operativas de la comparación entre canes natural y experimentalmente infectados:

Estudios electrocardiográficos seriados para estudiar la persistencia de alteraciones ECG de los canes del laboratorio no

se correlacionaron con los resultados transversales de campo.

La falta de disponibilidad de canes con trazados alterados y habitantes de un área endémica para evaluar morbilidad mediante anátomo-patología imposibilitó la comparación en este aspecto.

3.5. -Estudios estadísticos:

Análisis de frecuencia fueron efectuados mediante la prueba de χ^2 . Una prueba no paramétrica (Test U de Mann-Whitney) fue utilizada a fin de comparar poblaciones triatominas (178,179).

RESULTADOS

CAPITULO I.- MODELO CANINO DE INFECCION Y ENFERMEDAD PRODUCIDA POR T.cruzi:

4.1.- Estudios previos a la inoculación por T.cruzi:

Todos los canes del estudio del modelo mostraron xenodiagnósticos negativos, serología no reactiva para T.cruzi, y trazados ECG normales.

4.2.- Estudios posteriores a la infección provocada con cepas de T.cruzi:

4.2.1.- Supervivencia de los animales:

Todos los perros de L I y L II (Tabla V), inoculados con la cepa CA-I sobrevivieron a la infección. De los 23 animales inoculados con Tul, 11 sobrevivieron y constituyen el L III. Los animales restantes (no figuran en Tabla V) murieron antes del primer mes de infección y fueron reinoculados cuando llevaban entre 5 y 9 api (Tabla VIII). Siete murieron antes de los 30 días de la reinfección y los restantes, que presentaban un cuadro terminal fueron sacrificados a los 45 días.

Los diez canes de L IV murieron entre las 5 y 6 semanas post inoculación (Tabla VIII).

4.2.2.- Estudios parasitológicos de perros experimentalmente infectados con T.cruzi:

El objeto de la inoculación de L I y L II fué evaluar la eficiencia de la vía de inoculación y determinar el perfil parasitológico de los perros, mientras que en L III y L IV se

estudió la influencia de la cepa y la dosis de T.cruzi sobre el desarrollo del modelo.

4.2.2.1- Estudios parasitológicos por xenodiagnóstico de perros oculados con una cepa de baja virulencia (CA-I):

En el L I constituido por perros inoculados con parásitos provenientes de materia fecal de vinchucas alimentadas sobre ratones infectados se recuperaron parásitos de todos los perros inoculados. En cinco de seis canes, los xenodiagnósticos se positivizaron antes de 1 mpi y P I-2, inoculado por vía conj, se mostró parasitémico a los 22 mpi luego de resultados reiteradamente negativos. De los seis, cuatro fueron estudiados sistemáticamente hasta los 24 mpi y mostraron xenodiagnósticos reiteradamente positivos, con una proporción variable en el número de cajas con presencia de T.cruzi entre el 25% y el 100% (Tabla VIII).

En el L II constituido por perros inoculados con parásitos provenientes de materia fecal de vinchucas alimentadas sobre perros infectados se observó el comportamiento parasitológico que se esquematiza en la figura 13.

Tres de cuatro animales mostraron parasitemia sostenida detectada hasta los 620 dpi. P II-1 mostró resultados parasitológicos alternativamente positivos y negativos. Nunca presentó más de 3 resultados mensuales negativos sucesivos. Los restantes tres perros de L II mostraron positividad reiterada a lo largo de 14 controles (Tabla VIII).

4.2.2.2.- Estudios parasitológicos por xenodiagnóstico de perros inoculados con una cepa virulenta (Cepa Tul) de T.cruzi:

En el L III constituido por perros inoculados con parásitos provenientes de sangre de ratón, siete de once animales de L III mostraron parasitemia detectable entre 7 y 47 mpi. En los restantes se registraron resultados reiteradamente negativos de 2 a 5 xenodiagnósticos según el animal (Tabla VIII).

Uno de tres (L III-a), 3/3 (L III-b) y 3/5 canes (L III-c) inoculados con dosis crecientes de parásitos, positivizaron sus xenodiagnósticos a los 23, 22 y 7 mpi respectivamente.

Todos los animales de L III mostraron xenodiagnósticos negativos durante el control parasitológico previo a la reinoculación efectuada a los 5-9 api.

Tres de los 4 canes que sobrevivieron al mes de reinoculación fueron parasitémicos hasta el sacrificio (Tabla VIII).

En el L IV constituido por perros inoculados con dosis bajas de parásitos de la cepa Tul provenientes de sangre de ratón:

Durante la primer semana post infección, Strout y xenodiagnóstico fueron negativos en todos los animales. Ambos métodos fueron positivos en 7/10 perros en la 2ª semana y en 10/10 en la 3ª. Entre la 4ª y 5ª semana 3/10 canes evidenciaron parasitemia patente por Strout y en 9/10 fué subpatente por xenodiagnóstico (Tabla VIII).

De los resultados de los cuatro lotes se desprende que el empleo de ambas cepas y vías de inoculación, permitió una infección canina evidenciable por xenodiagnóstico a los 30 dpi en la mayoría de los animales.

Se corroboró la efectividad de ambas vías: por inoculación ip

2/2 (L I), 4/4 (L II), 7/11 (L III) y 10/10 canes (L IV) fueron parasitémicos a los 30 dpi. De la misma manera, 3/4 (L I) inoculados por vía conj y 2/2 (L II) reinoculados por vía conj fueron parasitémicos por xenodiagnóstico a los 30 dpi.

TABLA VIII

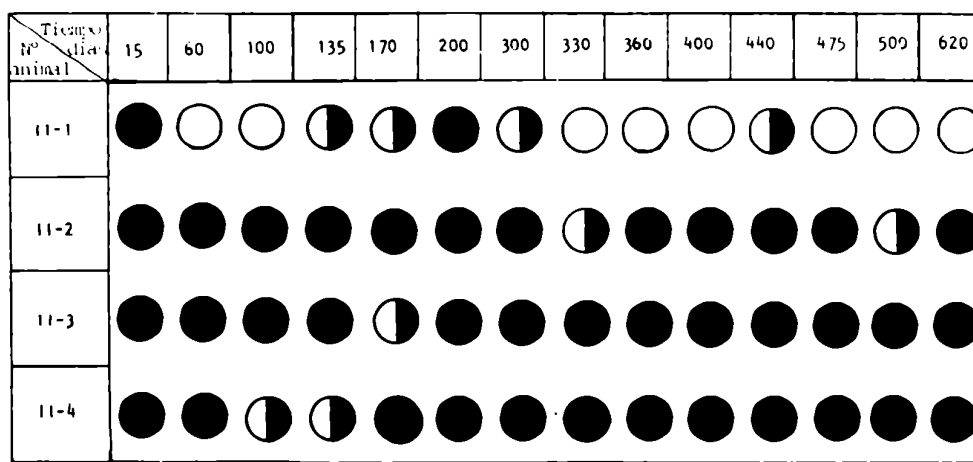
Estudios parasitológicos en perros experimentalmente infectados con las cepas Tulahuén y CA-I de T.cruzi

Lote Nº (n/cepa)	Perro Nº	Dosis	Vía	Xenod. aplicados (mpi)	a los:
I (6/CA-I)	1	5x10 ⁹	ip	(1) ...S	
	2		conj	(1) (5) (20) (24) ...S	
	3		conj	(1) (15) ...S	
	4		ip	(1)	
	5		conj	(1) (4) (15) (16) (18)	
	6		conj	(1) (4) (11) (12) (15) (16) (18)	
				I* PRE-R* R*	
III (11/Tul)					
III-a	1	5x10 ⁴	ip	(1) (11) (34)	(98) M+
	2			(1) (9) (11)	M+
	3			(23) (47)	(112) (1) M+
III-b	4	7.5x10 ⁴	ip	(22) (45)	(109) M+
	5			(32) (55)	(120) M+
	6			(22) (33)	(109) (1) M+
III-c	7	1x10 ⁹	ip	(1) (11)	(100) M+
	8			(7) (77)	(1) S
	9			(23) (47) (77)	(1) +M
	10			(7) (28)	
	11			(3)	

TABLA VIII (cont.)
 Estudios parasitológicos en perros experimentalmente infectados
 con las cepas Tulahuén y CA-I de I.cruzi.

Lote Nº n/cepa	Nº de perro	Dosis	Vía	Xenod. aplicados a las (spi)				
II (4/CA-I)					5x10 ⁹ ip (@)			
IV					(1)	(2)	(3)	(4)
	1	1x10 ⁹	ip	○ St ● St ● St ● St	-	+	+	+
	2			○ St ○ St ● St ○ St	-	+	+	-
	3			○ St ○ St ● St ○ St	-	-	+	-
	4			○ St ● St ● St ● St	-	+	+	+
	5			○ St ● St ● St ● St	-	+	+	-
	6			○ St ○ St ● St ○ St	-	-	+	-
	7			○ St ○ St ● St ○ St	-	-	+	-
	8			○ St ○ St ● St ● St	-	+	+	+
	9			○ St ● St ● St ○ St	-	+	+	-
	10			○ St ○ St ● St ● St	-	+	+	-

○ ningún parásito en las lecturas de las cuatro cajas de xenod.
 ○ parásitos observados en las lecturas de materia fecal de
 vinchucas de 1 ó 2 cajas del xenodiagnóstico.
 ○ parásitos observados en las lecturas de materia fecal de
 vinchucas de 3 ó 4 cajas del xenodiagnóstico
 S.I.= sin información. I* = inoculación R*= reinoculación.
 PRE-R* = pre-reinoculación.
 (@) seguimiento en fig 13. S= Strout M+= muerte.
 mpi = meses post infección. spi= semanas post infección.
 CA-I= cepa Argentina I. Tul= cepa Tulahuén.
 ip= intraperitoneal. conj= conjuntival



La lectura microscópica del xenodiagnóstico se realizó a partir de una suspensión de materia fecal de 10 *T. infestans* contenidos en cada caja.

- Ningún parásito observado en la lectura de 4 suspensiones (4 cajas).
- ◑ Parásitos observados en la lectura de una o dos suspensiones (1 ó 2 cajas).
- Parásitos observados en la lectura de tres o cuatro suspensiones (3 ó 4 cajas)

Fig. 13.- Evolución de la parasitemia detectada mediante xenodiagnósticos mensuales en 4 canes del lote II infectados con la cepa CA-I.

Un perfil parasitológico homogéneo fué inducido por la cepa CA-I en los lotes I y II. No se observaron diferencias significativas asociadas a la vía de inoculación (Resultados. Cap. IV. 7.1).

Inóculos variables entre 10^3 y 10^5 tri sanguíneos de ratón de la cepa Tul de T.cruzi fueron letales para este modelo animal.

La CA-I indujo una parasitemia sostenida similar a la observada en el modelo ratón.

4.2.3.- Estudios serológicos de perros infectados en el laboratorio con cepas CA-I y Tul de T.cruzi:

4.2.3.1.- Reactividad serológica:

La Tabla IX describe la reactividad serológica para L I y L II durante el curso de la infección y para L III a los 5-9 api. En todos los lotes, inóculos procedentes de ambas cepas de parásitos en dosis variables produjeron anticuerpos específicos anti T.cruzi en dos o más reacciones desde los 30 dpi y hasta el final del seguimiento.

Durante los 30 dpi, todos los perros de L I fueron **reactivos** para AD, y 5/6 para HAI. A los 12 mpi 2/5 y 4/4 mostraron reactividad para HAI y AD respectivamente. Los animales de L II mostraron positividad serológica para las 3 reacciones en forma sistemática desde el 1º al 15º mpi.

Los animales de L III a los 77-120 mpi mostraron reactividad para FC en 4/11 canes, para HAI en 1/11 y para AD en 8/10 animales. De ellos, 3 presentaron positividad para dos reacciones serológicas simultáneas y los restantes mostraron resultados discordantes.

TABLA IX

Positividad serológica en el curso de la infección en canes inoculados con dos cepas CA-I y Tul de T. cruzi.

Cepa-Lote (Via/n)	M E S E S P O S T - I N O C U L A C I O N														
	1			5			12			15			77-120		
	FC	HAI	AD	FC	HAI	AD	FC	HAI	AD	FC	HAI	AD	FC	HAI	AD
I-CA-I (conj, ip/6)	ND	5*	6	---	ND	---	ND	2*	4**	S	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
II- CA-I (ip/4)	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
III- Tul (ip/11)	*****											4	1	8	

(*) número de animales reactivos. ip= intraperitoneal.
 conj= conjuntival AD= Aglutinación directa.
 HAI= Hemaglutinación indirecta. FC= Fijación de complemento.
 CA-I= cepa Argentina I. Tul = cepa Tulahuén.
 S~~~~~ = sacrificio. S.I.= sin información.
 ***** = Sin información serológica previa a los 77 meses post-
 infección. # = 2/5 perros; ** = 4/4 perros; @ = 8/10 perros

4.2.3.2.- Estudio de los título máximos en la evolución de la infección canina por la cepa CA-I:

La Tabla X muestra la evolución serológica de los canes de L II inoculados con CA-I. Los títulos máximos registrados a lo largo de 500 dpi fueron 1/1024, 1/256 y 1/32 para AD, HAI y FC respectivamente.

No se observaron diferencias en los título serológicos de P II-1 y P II-3, previa y post reinoculación.

Respecto de los títulos máximos de FC y HAI no se registraron diferencias individuales entre los 4 canes. Para AD, tres perros mostraron títulos de 1/1024 y el restante reactividad

serológica hasta la dilución 256.

No hubo asociación entre títulos máximos y la etapa clínica de la infección (Res. Cap I 4.2.4.). Los aumentos o disminuciones de títulos no estuvieron asociados a patrón alguno.

TABLA X

Seguimiento serológico de la infección experimental canina con *T.cruzi* (Cepa CA-I/Lote II). Títulos máximos en función del tiempo de evolución de la infección (hasta 500 dpi).

Nº de perro	FC (dpi)	HAI (dpi)	AD (dpi)
II-1	1/32* (60)	1/512 (330)	1/1024 (100)
II-2	1/16 (275)	1/128 (400)	1/256 (60)
II-3	1/32 (330)	1/256 (100)	1/1024 (200)
II-4	1/32 (100)	1/64 (365)	1/1024 (60)

FC= fijación de complemento.

(*) título máximo.

HAI= hemaglutinación indirecta.

AD= Aglutinación directa.

CA-I= cepa Argentina I.

4.2.4. Estudios electrocardiográficos en lotes de perros infectados experimentalmente con *T.cruzi*:

4.2.4.1.- Estudio de los canes inoculados con la cepa CA-I:

En 2/6 canes de L I inoculados por vía conj se registraron alteraciones de la repolarización ventricular a los 40 y 670 dpi en uno (P I-6) y a los 760 dpi en el otro (P I-2). Entre los 40 y 670 dpi P I-6 registró trazados normales. Los restantes animales mostraron trazados normales hasta el sacrificio.

Tres de cuatro canes de L II, estudiados sistemáticamente durante 570 dpi mostraron alteraciones transitorias o persistentes según el animal (Tabla XI). P II-1 mostró una

frecuencia cardíaca alta de 160-250 latidos/minuto (l/m) desde la inoculación hasta los 270 dpi. A los 300 dpi, una frecuencia de 130-180 l/m con cambios en el marcapaso auricular y bloqueo sino auricular de 2º grado. En los cuatro meses siguientes se observaron cambios en D1 en rotación antihoraria y negativización de la onda T. A los 11 mpi, aumento de la severidad del bloqueo y estímulos sinusales bloqueados con frecuencia cardíaca baja de 70-170 l/m. A los 13 mpi el ECG tendió a la normalización con desaparición de los trastornos auriculares desde los 14 mpi hasta el sacrificio.

Tres de cuatro canes de L II, estudiados sistemáticamente durante 500 días mostraron alteraciones de carácter transitorio y/o persistente según el animal.

El perro II-2 mostró trazados ECG normales sin particularidades a lo largo de 19 controles durante 570 días de infección. La frecuencia cardíaca registrada osciló entre 95 y 150 l/m.

El perro II-3 mostró trazados normales hasta los 230 dpi y una frecuencia cardíaca de 100-150 l/m. A partir de los 270 dpi mostró evidencias de una injuria en cara ántero-lateral de miocardio, bloqueo sino-auricular de segundo grado y una frecuencia cardíaca baja, de 60-135 l/m. Los signos de la injuria perduraron hasta los 370 dpi. A los 400 dpi se observaron extrasístoles ventriculares y desde los 440 dpi las manifestaciones del bloqueo sino-auricular de 2º grado que persistieron con una magnitud variable hasta los 575 dpi.

El perro III-4 mostró trazados normales hasta los 200 dpi, y

una frecuencia cardíaca de 100-150 l/m. A partir de esa fecha se observaron evidencias de una injuria en cara ántero-lateral miocárdica que se acentuó a los 180 dpi. A los 300 dpi se registraron cambios en el marcapaso auricular, bloqueo sino-auricular de segundo grado y la frecuencia cardíaca descendió a 65-170 l/m . A los 320 dpi se observaron además, alteraciones en la repolarización de la cara ántero-lateral del miocardio, e isquemia en cara diafragmática. A los 430 dpi extrasístoles auriculares, y hasta la finalización del seguimiento a los 500 dpi persistieron la injuria y el bloqueo sino-auricular (Tabla XI).

TABLA XI

Estudios electrocardiográficos seriados de perros del lote II inoculados con T.cruzi*.

Identif. del animal	dpi	Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)	RESULTADO
II-1	60 100 130 170 200 230 270	160-250	Normal.
	300 340	130-180 190	Cambios del marcapaso auricular. Baja frecuencia cardíaca. Bloqueo sino-auricular de 2º grado.
	370	190	Cambios del marcapaso auricular. y bloqueo sino-auricular de 2º grado. Cambios en D1 en rotación antihoraria y negativización de la onda T (cambios posicionales?)
	400	70-170	Aumento de la severidad del bloqueo. Dos ó tres estímulos sinusales bloqueados. Sin cambios en D1.
	440 450 525 575	150 165 150-165 165	Desaparición de los trastornos sino-auriculares y completa normalización del ECG.

dpi = dias post-infección.

TABLA XI. Cont.

Identif. del animal	dpi	Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)	RESULTADOS
II-3	50	100-150	Normal
	100		
	130		
	170		
	200		
	230		
	270	100-130	Injuria miocárdica en cara ántero-lateral.
	277		
	285	50-120	Disminución progresiva de la injuria.
	290		
	300	100-135	Disminución progresiva de la injuria.
	302		
	308	80-130	Bloqueo sino-auricular de 2º grado. Cambios del marcapaso auricular. Baja frecuencia cardíaca. Disminución progresiva de la injuria.
	312		
	320		
	330	125	
	335	75-105	Progresiva disminución de la injuria hasta su total desaparición.
	345		
	360		
	370	125	Ligera anormalidad del ritmo debido al bloqueo. Normalización casi por completo.
385	135		
390	150	Normal.	
400	115	Extrasístoles ventriculares.	
440	115	Bloqueo sino-auricular de 2º grado.	
475	125	Normal.	
525	115-125	Bloqueo sino-auricular de 2º grado.	
575	130	Disminución del bloqueo.	

dpi días post infección.

TABLA XI. Cont.

Identif. del animal	dpi	Frecuencia cardíaca (latidos/minuto)	RESULTADOS
II-4	60	125	Normal
	100	115	
	130	115-150	
	170	120-170	
	200	100-150	
	235	100-150	Injuria miocárdica en cara ántero-lateral.
	270	100-150	Acentuación de la injuria.
	177	80-150	
	285	120-150	
	290	75-150	Injuria miocárdica en cara ántero-lateral. Bloqueo sino- auricular de 2º grado.
	297		
	300	65-160	Injuria miocárdica en cara ántero-lateral. Bloqueo sino- auricular de 2º grado. Cambios en el marcapaso auricular. Baja frecuencia cardíaca.
	302	85-160	
	304	90-150	
	308	75-150	
	312	65-150	
	320	115-150	Leve disminución de la injuria.
	320	115-150	Leve disminución de la injuria.

dpi= días post-infección.

(*) el P II-2 mostró ECG normales durante el seguimiento.

4.2.4.2.- Estudios electrocardiográficos en perros infectados experimentalmente con la cepa Tul:

Los estudios de ECG pre y post aplicación de aspartato de ajmalina de los perros de L III, tuvieron por objeto evaluar el estado clínico de los animales y predecir daños en el sistema de conducción mediante el uso del fármaco.

Tres de once perros del lote III, habiendo transcurrido 6-8 api y al 4. mpr mostraron trastornos primarios de la repolarización ventricular. La Tabla XIII muestra el seguimiento de los canes de L III pre y post reinoculación. En uno de ellos (P III-9) se observaron evidencias de injuria en cara anterior, bradicardia sinusal y trastornos primarios de la repolarización ventricular en cara diafragmática y lateral miocárdica. Este animal había presentado en el control pre reinoculación a los 8 api un ECG con una extrasístole ventricular.

Los dos perros restantes (P III-1 y P III-11) presentaron ECG normales hasta el control previo a la reinoculación, y al mes de ésta trastornos primarios de la repolarización ventricular en ambos.

TABLA XII

Estudios clínicos de perros inoculados con la cepa Tulahuén. ECG seriados del lote III, previa y posteriormente a la administración endovenosa de ajmalina a los 77-120 meses de la primo-infección.

Lote III# Nº Perro	ECG a los minutos de la aplicación de ajmalina:					
	basal	3'	6'	9'	12'	15'
III-7	I.T	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
III-4	Normal	Normal	Normal	Alt.M.A E.A.	Alt.M.A. E.A.	Alt.M.A.
III-5	Normal	E.V	Normal	Normal	Normal	Normal
III-6	Bl.S.A.	Normal	Normal	Normal	Bl.S.A.	Bl.S.A.
III-8	Normal	Bl.S.A.	Normal	Bl.S.A.	Normal	Normal
III-10	Normal	Bl.S.A.	Normal	Bl.S.A.	Normal	Normal
III-11	Bl.S.A. pronunc.	Bl.S.A.	Bl.S.A.	Bl.S.A.	T.R.V. en V4	Bl.S.A.

(#) tres perros con ECG normales no modificaron sus trazados. I.T.= inversión acentuada de la onda T en cara diafragmática y en la anterior. Alt.M.A.= alteración en el marcapaso auricular. E.A.= extrasístoles auriculares. E.V.= extrasístoles ventric. Bl.S.A.= Bloqueo sino-auricular de 2º grado. V4= derivación V4.

La aplicación de aspartato de ajmalina antes de la reinoculación provocó alteraciones en los trazados en 2 de 8 por efecto de su aplicación (Tabla XII). En uno de ellos (P III-4) se observó un trazado basal normal y a los 9 minutos (*) de la aplicación del fármaco extrasístoles auriculares y alteración del marcapaso auricular, que persistieron hasta 15' con recuperación posterior. En el otro (P III-11) a los 15' trastornos de la repolarización ventricular en la derivación V4 con recuperación a la alteración basal (Bl.S.A.).

En los restantes cinco canes del lote no hubo modificación de los trazados por efecto del fármaco (Tabla XII).

TABLA XIII

ECG en perros del lote III previa y post-reinoculación con T.cruzi de la cepa Tul.

Identif. del perro	api	Pre-reinocul.	Post-reinoculación a los 30 días post-inf.
III-1	2	Normal	T.P.R.V.
III-3	9	Bloqueo S.A.	Bloqueo S.A.
III-8	6	S.I.	Bloqueo S.A.
III-9	5	Normal c/una E.V. Bl.S.A.	T.P.R.V. Injuria cara ant. Bradycardia sinus.
III-10	6	Normal	T.P.R.V.
III-11	6	Bloqueo S.A. pronunciado	Bloqueo S.A.

T.P.R.V.= Trastornos primarios de la repolarización ventricular.
Bl.S.A.= Bloqueo sino-auricular de 2º grado. api= años post-infección. S.I.= sin información. EV= extrasístole ventricular.
(*) en cara difragnática y lateral. sinus.= sinusal.

TABLA XIII

ECG en perros del lote III previa y post-reinoculación con T.cruzi de la cepa Tul.

Identif. del perro	api	Pre-reinocul.	Post-reinoculación a los 30 días post-inf.
III-1	8	Normal	T.P.R.V.
III-3	9	Bloqueo S.A.	Bloqueo S.A.
III-8	6	S.I.	Bloqueo S.A.
III-9	5	Normal c/una E.V. Bl.S.A.	T.P.R.V. Injuria cara ant. Bradicardia sinus.
III-10	6	Normal	T.P.R.V.
III-11	6	Bloqueo S.A. pronunciado	Bloqueo S.A.

T.P.R.V.= Trastornos primarios de la repolarización ventricular.
Bl.S.A.= Bloqueo sino-auricular de 2º grado. api= años post-infección. S.I.= sin información. EV= extrasístole ventricular.
(* en cara difragmática y lateral. sinus.= sinusal.

4.2.5.- Sintomatología clínica en perros experimentalmente infectados con T.cruzi. Animales de L IV:

Todos los perros mostraron a los 20-25 dpi poliadenitis leve o severa e hipertermia desde los 22 dpi, y signos neurológicos de variada intensidad a los 35-40 dpi. En 2/10 claudicación de miembros posteriores, en 4/10 paresia de miembros posteriores, cuadriplejia en 2/10 y mielomeningo-encefalitis progresiva en 2/10.

4.2.6. Estudios anatómo-patológicos en perros experimentalmente infectados con T.cruzi:

4.2.6.1.- Animales inoculados con la cepa CA-I (L I y L II):

En el miocardio de 3 de 6 animales de L I se observó una miocarditis crónica focal caracterizada por infiltrados linfoplasmocitarios focales. Los perros estudiados de L II (P II-2 y P II-4) mostraron una miocarditis crónica multifocal caracterizada por infiltrados linfoplasmocitarios, necrosis de las fibras miocárdicas, edema y muy escasos amastigotes de T.cruzi (Figura 14 A). Una miocarditis crónica más severa con parches de fibrosis y compromiso biventricular se observó en P II-4 (Figura 14 B).

4.2.6.2.- Animales inoculados con la cepa Tul:

Los animales de L III que murieron durante el curso de la etapa aguda mostraron el cuadro típico de la cardiopatía chagásica aguda, con abundantes parásitos en miocardio, escasos infiltrados inflamatorios y edema. De los restantes, los sacrificados entre el 1º y 3º api mostraron leves infiltrados multifocales.

Los animales del lote IV no fueron sometidos a estudios histopatológicos.

4.3.- Estudios en lotes de animales controles:

Los controles de los lotes I, II, III y IV de infección mostraron xenodiagnósticos y serología negativos en el momento previo a la inoculación y al sacrificio de los respectivos lotes de infección.

Los trazados ECG obtenidos en dos oportunidades a lo largo de los seguimientos de infección fueron normales y mostraron bloqueo sino-auricular de segundo grado en el 30% de los casos. Los estudios AP mostraron tejidos y órganos sin particularidades.

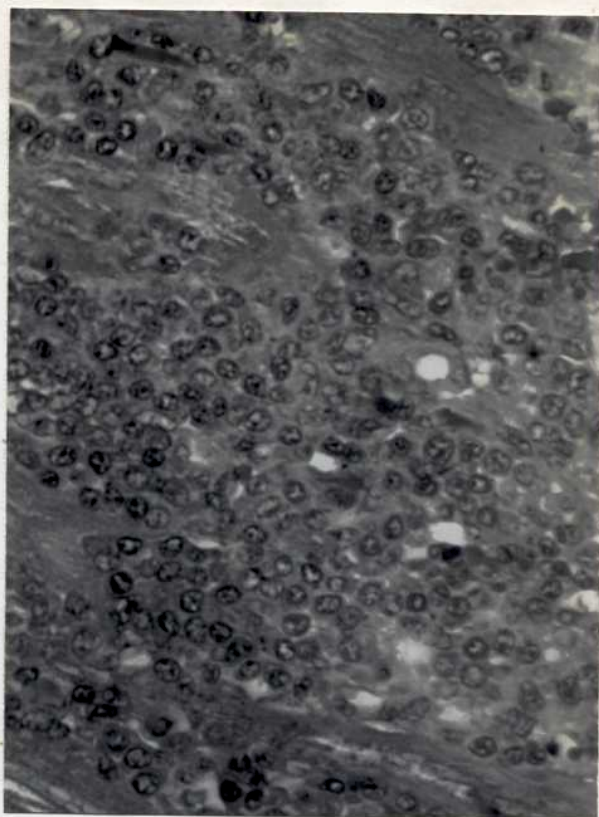


Fig.14.- Miocarditis crónica en perros infectados con la cepa CA-I de T.cruzi.

- A: Lesión inflamatoria focal en miocardio; constituida por células mononucleares. Hematoxilina y Eosina, 160x.
- B: Detalle de lesión inflamatoria activa, caracterizada por macrófagos, células linfoides, edema y necrosis de fibras miocárdicas. Hematoxilina y Eosina, 400x.
- C: Fibrosis focal secuelar en miocardio. Hematoxilina y Eosina, 400x.

DISCUSION DEL CAPITULO I

Este trabajo tuvo por objeto desarrollar un modelo controlado de infección experimental por T.cruzi en canes. Con este propósito se provocó una infección caracterizada por niveles de parasitemia detectada por métodos directos e indirectos durante todo su curso, anticuerpos específicos anti T.cruzi por dos o más reacciones serológicas en las etapas aguda y crónica de la infección y signos de morbilidad a partir de estudios clínicos, electrocardiográficos y anatomopatológicos (39).

Se seleccionaron dos cepas estandarizadas de diferente grado de virulencia y patogenicidad, las cepas Argentina I y Tulahuén de T.cruzi, una induce baja mortalidad en animales de laboratorio, y la otra de mayor virulencia muestra una elevada capacidad invasiva de los tejidos. Ambas se habían empleado anteriormente en ratones (169,180,181), conejos (182) y monos (37,48). En ratones lactantes, la cepa Argentina I produce baja mortalidad y es poco virulenta en adultos, en los que provoca una infección con parasitemia baja, sostenida y de concentración constante (169). La cepa Tulahuén induce niveles elevados de parasitemia y la muerte del 100% de los ratones adultos a los 9-15 dpi (55). Por otra parte, ambas cepas son diferentes desde el punto de vista biológico. Así, las tasas individuales de crecimiento y el volumen modal máximo de clones aislados de la cepa CA-I, son significativamente diferentes de los registrados para la cepa Tulahuén (183). Por otra parte, se observaron variaciones en el contenido de DNA y en el período lag entre los distintos clones de CA-I (183). Sin embargo, desde el punto de vista antigénico se demostró que esta cepa es altamente homogénea (184).

La etapa aguda de perros experimentalmente infectados fue exhaustivamente investigada. Se evaluó el efecto de la dosis (36), vía (36,111), cepa (78,65), aparición de megavisceras (74), y caracterización de las manifestaciones clínicas neurológicas (67,68,69), electrocardiográficas (70,71,76) e histopatológicas (75,80,73,77,72,66). Los canes inoculados con cepas estandarizadas M. dos Reis (70), 12-San Felipe y Colombiana (79), cepa "O" de origen silvestre (66), cepas "M" y "D" de procedencia humana (66), Perú (36), "A" y "W" (72), Brazil (73,72) y otras de cardiópatas chagásicos agudos (77,66) mostraron parasitemia patente entre los 20-30 dpi (70), 18-25 dpi (79), 10-120 dpi (66), 21-28 dpi (73) y 10-36 dpi (72) entre otros. En nuestro trabajo, los perros infectados con la cepa Tulahuén mostraron parasitemia por observación directa entre los 7-28 dpi. Esta cepa provocó desde la segunda semana una sintomatología clínica con compromiso neurológico de muy variada intensidad. Parasitemias elevadas desde la tercer semana y un cuadro clínico agudo provocaron la muerte de los animales entre la quinta y octava semanas. Los resultados parasitológicos y clínicos de la inoculación con parásitos de dos cepas de variada virulencia permitió caracterizar la etapa aguda canina en los primeros tres meses de infección, y coincidió con los resultados obtenidos con la cepa Colombiana (79), San Felipe (79), M (66), D(66) y O (66).

En infecciones con dosis masivas de la cepa Perú (36) sobrevivió el 9% de los infectados y se detectó parasitemia patente a los 7-14 dpi (36), mientras que con elevados inóculos de una cepa procedente de un paciente cardiópata chagásico agudo sobrevivió el 41% y se registraron parásitos en sangre por observación directa a los 28-55 dpi (75). Las características de

virulencia de las cepas Perú y Tulahuén indican cierta similitud entre ambas.

En infecciones con elevada tasa de mortalidad (36,75), el perfil en cronicidad se trazó con los resultados de perros sobrevivientes resistentes de la primo infección. El empleo de resistentes para estudios de cronicidad ha sido frecuente en la literatura porque permite someterlos a sucesivos inóculos para evaluar este efecto que en condiciones naturales de infección es muy frecuente.

Animales sometidos a inoculaciones masivas y a reinoculaciones no han modificado su perfil parasitológico (185) o serológico (186). Sin embargo, inóculos con bajas dosis aplicados a ratones de la cepa Tulahuén aumentaron la parasitemia y mortalidad (187) con un curso coincidente con el de los perros infectados con esa misma cepa en este estudio, los cuales aumentaron la mortalidad desde el 59% al 90% entre primo infección y reinoculación.

Por otra parte, otros autores que infectaron ratones Swiss relacionaron el aumento de la parasitemia y mortalidad por efecto de las reinoculaciones con la disminución de la resistencia natural cuando aumenta la edad (188). Desde una óptica diferente, este aumento de la mortalidad podría relacionarse con las escasas propiedades inmunogénicas que la cepa Tulahuén presenta.

En este trabajo, las vías intraperitoneal y conjuntival de inoculación se mostraron igualmente efectivas para provocar la infección de los perros inoculados. De ambas, la intraperitoneal fué seleccionada por brindar mayor seguridad al operador y precisión en la dosis.

Inóculos provenientes de materia fecal de vinchucas que se infectaron con CA-I al alimentarse sobre ratones y perros, lotes

I y II respectivamente, provocaron el mismo perfil serológico y parasitológico de la infección, lo cual parecería indicar que las características de virulencia y patogenicidad de la CA-I no son alteradas por pasajes a través de hospedadores murinos o caninos. En el caso de los inoculados con esta cepa se indujo parasitemia sostenida, y en los que recibieron TulaHuén su elevada virulencia impidió corroborar la persistencia de la parasitemia debido a la alta mortalidad de la mayoría de los animales.

La bibliografía es muy escasa en seguimientos a largo plazo de estudios para evaluar el perfil parasitológico de la infección experimental canina en cronicidad (155,154,189), y por ello poco se conocía del curso de la parasitemia en infecciones de larga duración. En nuestro trabajo, canes infectados con parásitos de la cepa CA-I provenientes de vinchuca fueron parasitémicos por xenodiagnóstico desde los 15 dpi hasta los 2 años posteriores a la inoculación. Los animales del lote I fueron sacrificados a intervalos regulares y todos ellos, excepto uno, fueron parasitémicos hasta el sacrificio. Los del lote II, inoculados por vía intraperitoneal con CA-I, mostraron parasitemia persistente mes a mes hasta los dos años de infección, fueran o no sometidos a reinoculaciones posteriores. Dos de ellos reinoculados por vía conjuntival con igual cepa en esa fecha, mantuvieron el mismo perfil parasitológico y no modificaron el título serológico.

Estos estudios y otros longitudinales realizados en canes de áreas endémicas de Santiago del Estero (144,162) demostraron que el perro presenta un perfil parasitológico sostenido e independiente de la edad. Sin embargo, en los animales inoculados con TulaHuén no se detectó T.cruzi a los 5-9 años de la primo infección y antes de la reinoculación y la serología fué

discordante en ese momento. Este comportamiento parasitológico sugiere, que en los perros sometidos a una infección de larga duración y sin reinoculaciones, el perfil parasitológico se aproximaría al de los pacientes crónicos (41), en los que el flujo de parásitos al torrente sanguíneo disminuye con el aumento de la edad. Perros seniles de área endémica mostraron un perfil parasitológico y serológico de infección similar al de los animales jóvenes (144,145, Resultados Cap.III). Sin embargo la renutrición de perros parasitéticos de área endémica interrumpió la persistencia de este perfil (190), lo cual sugeriría que esta persistencia estaría asociada, en los perros de terreno, a deficiencias en la fuente alimentaria y en los del laboratorio posiblemente a la cepa utilizada. Otros autores caracterizaron la etapa crónica indeterminada (78,73,72) y la sintomática (76,69,77), a los 8-10 meses (72), y a los 2-3 años de la primo infección (75) y detectaron signos de insuficiencia cardíaca congestiva con alteraciones ECG asociadas (71,77,75). Aunque nuestros resultados en infecciones a largo plazo sean insuficientes para considerar una curación espontánea (191), la discordancia serológica y la ausencia de parasitemia con nuestra metodología revelan la presencia de un estado inmunitario específico muy deprimido en las etapas tardías de la infección. Estas observaciones explicarían las diferencias en el perfil de infección entre inoculación y reinoculaciones, pero no aclaran las causas de la diferencia inversa entre dosis y parasitemia observada en los animales infectados con Tulahuén. A la luz de estos hechos, se observa que distintos protocolos de infección ensayados en perros exocriados proporcionan respuestas de difícil correlación.

El cuadro electrocardiográfico e histopatológico de la

miocardiopatía chagásica crónica es deficiente respecto del modelo ratón (79), sin embargo monta una rápida respuesta de anticuerpos específicos desde el comienzo de la infección (79,73), con títulos elevados, constantes y persistentes en toda su evolución.

Los perros infectados con la cepa CA-I mostraron alteraciones ECG transitorias y no progresivas que sugieren miocarditis focales, confirmadas más tarde por estudios histopatológicos. Un animal mostró alteraciones persistentes hasta el sacrificio, y los estudios anatomopatológicos detectaron una miocarditis de carácter focal y activa con abundantes infiltrados y edema.

Los perros sobrevivientes infectados con Tulahuén mostraron ECG normales o con alteraciones leves. Sacrificados en distintos momentos de la cronicidad asintomática presentaron escasos infiltrados linfoplasmocitarios. Algunos de ellos mostraron alteraciones de la repolarización ventricular en el primer mes de la reinfección y aunque pueda asignarse al inóculo este efecto, se trata de una alteración inespecífica de la miocardiopatía chagásica crónica, poco frecuente en ECG de pobladores de área endémicas rurales (177), en perros de nuestra zona de estudio (Res.Cap.III), en infectados humanos sintomáticos (30, 31, Introducción, 1.4.3.Tabla I).

En perros infectados en el laboratorio, alteraciones ECG compatibles con la miocardiopatía chagásica crónica humana (bloqueo completo de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo, extrasístoles ventriculares, etc), lesiones miocárdicas difusas detectables por anatomopatología y signos clínicos de insuficiencia cardíaca han sido infrecuentes en la bibliografía, y en el único caso descrito, el protocolo de

infección no fué repetible por falta de precisión en la dosis empleada (77).

La forma crónica cardíaca indeterminada donde se registren alteraciones ECG de carácter transitorio, con arritmia sinusal en algunos, y lesiones evidenciables microscópicamente (edema, focos dispersos de fibrosis y escasos infiltrados) (79) muestra coincidencias importantes con nuestros resultados de infección crónica con las cepas CA-I y Tulahuén. Sin embargo, nuestros animales registraron en los estudios histopatológicos una patente de actividad evidenciable por la presencia de abundantes infiltrados inflamatorios linfoplasmocitarios, escasa fibrosis y edema, a diferencia del carácter secuelar a la etapa aguda que otros autores encuentran en perros infectados en el laboratorio, y que revela escasa patología crónica activa (78,75,72).

Se ha sugerido que una baja proporción de perros crónicos asintomáticos desarrollan cuadros de insuficiencia cardíaca congestiva con estudios histopatológicos y electrocardiografía compatibles con una panmiocarditis. Entre otros, cinco perros experimentalmente infectados alcanzaron la cronicidad sintomática: uno se infectó con sangre de un paciente agudo, y no se mencionaron cepa y dosis utilizadas (77), otro fué inoculado con la cepa M. dos Reis y no se realizó descripción histopatológica (70), y los tres restantes fueron los únicos de un lote de 72 canes inoculados con sangre de un paciente cardíopata agudo que desarrollaron a los 2 años una miocarditis con características histopatológicas y electrocardiográficas compatibles con la miocarditis chagásica crónica observada en pacientes (75).

Estudios histopatológicos en perros naturalmente infectados mostraron un cuadro típico de miocardiopatía chagásica aguda con

degeneración de fibras miocárdicas, extensa necrosis y abundantes nidos de amastigotes (148,192) y en perros infectados de la provincia de Chaco los estudios anatomopatológicos mostraron lesiones leves asignables a la etapa crónica asintomática (149). No se han descrito hasta ahora casos de perros crónicos sintomáticos naturalmente infectados, lo cual sugiere una baja prevalencia de animales mórbitos en esa etapa de la infección.

Por comparación entre el perro y otros modelos, el ratón reprodujo el cuadro clínico de la infección chagásica aguda y crónica (55,58), y mostró un perfil parasitológico y serológico similar al observado en los pacientes (55,58,50), con lesiones histopatológicas asociadas a la miocardiopatía chagásica con correlación electrocardiográfica (53). Sin embargo, estudios fisiopatológicos que utilizan técnicas quirúrgicas de alta especialización, como en el caso de los transplantes cardíacos, requieren de un hospedador con conformación, tamaño y estructura similares a la del humano (193). La importancia de la respuesta a la infección por T.cruzi en monos del Viejo y Nuevo Mundo reside en su aproximación filogenética al ser humano. Seguimientos serológicos y parasitológicos en este modelo probaron ser altamente resistentes a la infección por T.cruzi, con muy alta recuperación clínica, negativización parasitológico-serológica en la etapa subaguda de la infección, y escasas alteraciones electrocardiográficas e histopatológicas (46,37,47,48). El conejo ha mostrado disímiles resultados en su trayectoria como modelo experimental. El uso de distintas cepas y variadas dosis influyen el curso de su infección y provocan cuadros histopatológicos de diferente severidad. En base a estudios realizados hasta ahora (62), la limitación de este

modelo es su reproducibilidad.

El bajo número de animales enfermos, entre los experimentalmente infectados desde 1950 hasta ahora (72,79,75,77), sugieren que el hospedador canino es poco sensible a desarrollar la sintomatología crónica de insuficiencia cardíaca asignable al T.cruzi. Aunque parasitemias sostenidas auguren estímulos suficientes como para poner en funcionamiento los mecanismos inmunopatogénicos, los resultados de infección natural (149) y experimental (66,73,72) en canes crónicos sugieren un estado de equilibrio parásito-hospedador donde los mecanismos inmunopatogénicos se observan disminuidos.

Estudios inmunológicos podrían contribuir a esclarecer la función que parasitemias sostenidas ejercen en esta regulación.

RESULTADOS

CAPITULO II.- ADAPTACION DE LAS REACCIONES SEROLOGICAS ANTI T.cruzi A SUEROS CANINOS:

5.1.- Reacciones serológicas adaptadas a sueros caninos: Estudio del título mínimo diagnóstico:

5.1.1.- Reacción de hemaqlutinação indirecta:

La figura 15-a muestra el diagrama de barras de la distribución de frecuencias de títulos para HAI. El 86% de los sueros de perros parasitémicos de área endémica (PP-AE) mostró reactividad serológica, y el 57% fué reactivo para diluciones de 128 a 512. El 70% de los sueros de perros no parasitémicos de área endémica (PNP-AE) fué negativo desde la dilución 2 y el resto mostró reactividad desde 16 hasta 512. El 70% de los sueros de perros no parasitémicos de Buenos Aires (PNP-BA) fué no reactivo para toda dilución y el resto mostró reactividad hasta la dilución 8 en el suero de animales sanos y hasta 16 en el suero de los afectados de alguna patología (Figura 15-a; Tabla XIV).

Para HAI se seleccionó el título 1/32 como el mínimo diagnóstico a partir del cual el 78% de sueros de PP-AE fueron reactivos y el 82% de PNP-AE mostraron reactividad por debajo de esa dilución diagnóstica.

5.1.2.- Reacción de inmunofluorescencia indirecta:

La figura 15-b muestra el diagrama de barras de la distribución de frecuencias de los títulos serológicos para la reacción de IFI de sueros de PP-AE, PNP-AE y PNP-BA. El 97% de

los sueros de PP-AE fué reactivo para alguna dilución, tal que frecuencias del 20%, 24% y 25% correspondieron a títulos de 1/128, 1/256 y 1/512, y en PNP-AE el 77% no mostró reactividad para sueros puros o diluidos. Frecuencias de 3%, 6% y 5% correspondieron respectivamente a diluciones de 32, 64 y 256.

El 84% de los sueros de PNP-AE fueron no reactivos para IFI desde la dilución 1 en adelante. Dos de los cuatro sueros restantes, uno de un animal sano y otro con moquillo, mostraron reactividad para 1/2 y 1/4 respectivamente (Fig.15-b; Tabla XIV).

Se seleccionó el título 1/16 como el mínimo diagnóstico para IFI mediante el cual el 97% de los sueros de PP-AE fueron reactivos, y tal que el 77% de PNP-AE fueron no reactivos a partir de esa dilución. Ningún suero de PNP-BA mostró reactividad para diluciones mayores o iguales a 4.

El título mínimo diagnóstico para FC y AD fué 1/1 y 1/128 respectivamente, coincidentes con los normatizados para sueros humanos. Veintiocho sueros puros o diluidos de la ciudad de Buenos Aires fueron negativos para FC, mientras que para AD presentaron reactividad serológica hasta 64 (Tabla XIV).

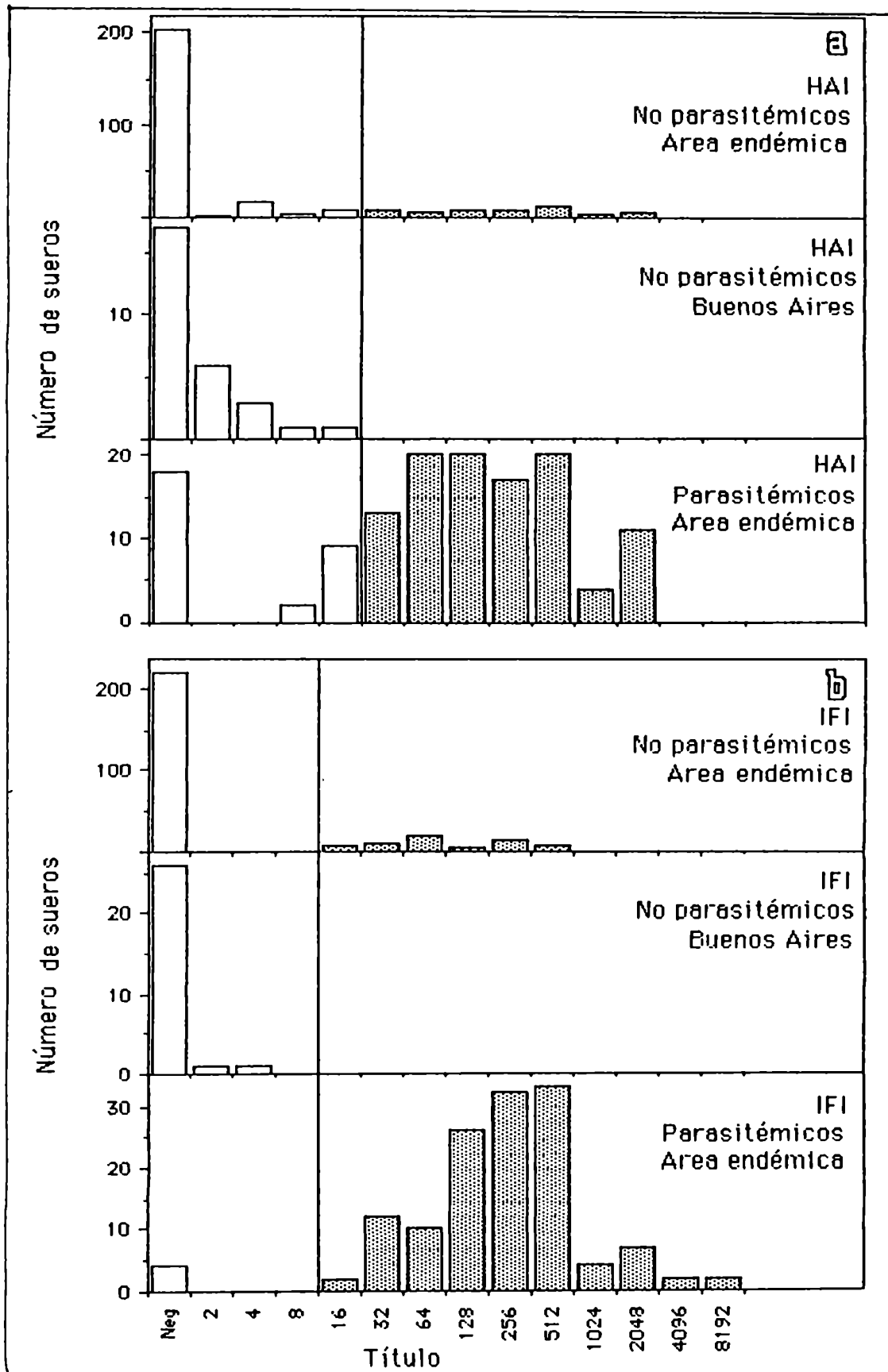


Fig. 15.- Diagrama de barras de la distribución de frecuencias de los títulos serológicos de a.-hemaglutinación indirecta (HAI) b.- inmunofluorescencia indirecta (IFI) obtenidas en lotes de sueros caninos.

TABLA XIV

Estudio del título mínimo diagnóstico de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI) de 24 y 4 sueros de perros sanos y enfermos respectivamente de la ciudad de Buenos Aires.

Reacción serológica	RESULTADOS:						Total de sueros
	Neg.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
IFI	23	1	0	0	0	0	24*
	3	0	1			0	4**
HAI	17	4	2	1	0	0	24*
		2	1	0	1	0	4**

(*) perros sanos de la ciudad de Buenos Aires.

(**) perros enfermos de la ciudad de Buenos Aires.

5.2. Sensibilidad de las reacciones serológicas normalizadas:

La sensibilidad de AD, FC, IFI, HAI y ELISA fueron del 100%, 100%, 96%, 78% y 87% respectivamente, a partir de estudios realizados sobre 31, 38, 100, 96 y 52 sueros caninos de los lotes C y D (Mat. y Mét. 3.2.2).

Las reacciones de FC, IFI y ELISA mostraron más altos valores de especificidad.

TABLA XV

Estudio de la sensibilidad y especificidad de la reacción de fijación de complemento (FC), inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemaglutinación indirecta (HAI), aglutinación directa (AD) y ELISA a partir de estudios de sueros parasitémicos de terreno y del laboratorio.

Reacción serológica	<u>Nº sueros reactivos (%)</u> Nº sueros estudiados	<u>Nº sueros no reactivos (%)</u> Nº sueros estudiados
FC	31/31# (100)*	29/30 (96.7)**
HAI	75/96@ (78.1)	230/238 (76.7)
AD	38/38# (100)	16/21 (76.2)
IFI	96/100& (96)	228/232 (97.2)
ELISA	45/52# (86.5)	51/53 (96.2)

(*) sensibilidad. (**) especificidad. (#) perros sangrados en Amamá. (@) perros sangrados en Amamá (34) y en Termas (62). (&) perros sangrados en Amamá (38) y en Termas (62).

5.3.- Estudio de la discordancia entre dos reacciones serológicas

5.3.1.- Sueros de canes parasitémicos:

De 134 sueros de PF-AE de Amamá, 107 (80%) fueron reactivos para IFI y HAI, tres (2.2%) negativos para ambos y 24 (17%) discordantes, 23 fueron reactivos para IFI y uno para HAI (Tabla XVI). De estos 24 sueros discordantes, 18 fueron analizados para AD y CF, confirmándose reactividad para ambas reacciones serológicas (no se muestra en Tabla) y la mayor sensibilidad de IFI ($P=0.05\%$, $X^2=13.4, \lambda=1$) respecto de HAI (Tablas XV y XVI).

TABLA XVI

Correlación entre las reacciones serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI) de 134 perros parasitémicos de Amamá.

IFI/HAI	Número de perros parasitémicos = 134		
	HAI positivo	HAI negativo	
IFI positivo	107 (99.07)	23# (88.46)	130 (97.02)*
IFI negativo	1# (0.93)	3 (11.54)	4 (2.98)
Total	108 (80.49)**	26 (19.51)	134 (100.0)

(*) sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta.

(**) sensibilidad de la hemaglutinación indirecta.

(#) sueros discordantes.

5.3.2. - Sueros de canes no parasitémicos:

De 286 sueros de PNF-AE, 213 (75%) fueron no reactivos para ambas reacciones y de los 73 restantes, 50 (70%) fueron positivos para ambas. Los restantes 23 eran discordantes, 16 reactivos para IFI y 7 para HAI (Tabla XVII).

TABLA XVII

Resultados de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemaglutinación indirecta (HAI) en 286 perros no parasitémicos de Amamá y Termas.

	Nº de perros no parasitémicos = 286 (%)		
	HAI positivo (%)	HAI negativo (%)	Total
IFI positivo	50 (87.72)	16 (6.99)	66 (23.07)
IFI negativo	7 (12.28)	213 (93.01)	220 (76.93)
Total	57 (19.93)	229 (80.07)	286 (100.0)

5.4.- Correlación entre resultados parasitológicos y serológicos :

De 67 sueros de PP-AE (Lote A) y 21 PNP-AE (Lote B) de Amamá, estudiado por IFI y HAI, el 92% fué seropositivo para ambas reacciones, y el 71% de los no parasitéticos fué negativo para ambas. El 7% correspondió a seronegativos parasitéticos y el 28% a seropositivos no parasitéticos (Tabla XVIII).

TABLA XVIII

Relación entre resultados parasitológicos y serológicos de 67 perros parasitéticos y 21 no parasitéticos de Amamá.

	Sueros de perros:		
	Parasitéticos	No parasitéticos	Total
Nº seropositivos &	62 (92.54)*	6 (28.57)	68 (77.27)
N* seronegativos &&	5 (7.46)	15 (71.43)	20 (22.73)
Total	67 (76.14)	21 (23.86)	88 (100)

(&) sueros reactivos para ambas reacciones serológicas.

(&&) sueros no reactivos para una o dos reacciones.

(*) Sensibilidad serológica para ambas reacciones.

5.5.- Empleo de la reacción inmunoenzimática de ELISA para el estudio de la discordancia entre IFI y HAI de sueros de perros no parasitéticos:

De 23 sueros de caninos PNF-AE de Termas, discordantes por IFI y HAI (Tabla XVIII), 13 fueron estudiados por la técnica de ELISA. Nueve eran reactivos para IFI y los 4 restantes por HAI.

En 8/13 ELISA fué positiva, de ellos cinco habían sido positivos para IFI y tres para HAI, y en el resto ELISA fué negativa, de cuales cuatro eran IFI-positivo y uno HAI-positivo. En ningún caso ELISA confirmó la reactividad de todos los sueros discordantes, y confirmó 3/4 sueros HAI-reactivos y 5/9 IFI-reactivos (Tabla XIX).

TABLA XIX

Utilización de la reacción inmunoenzimática de ELISA para el estudio de la discordancia de sueros de perros no parasitéticos de Termas.

IFI	HAI	ELISA	Nº de sueros
Pos.	Neg.	Pos.	5/9
		Neg.	4/9
Neg.	Pos.	Pos.	3/4
		Neg.	1/4

Pos = positivo.

Neg = negativo.

5.6.- Empleo de la reacción de fijación de complemento para el seguimiento de perros experimentalmente infectados con T.cruzi:

Se presentan en la Tabla XX los resultados serológicos del seguimiento a dos años de una infección experimental por T.cruzi canes (Mat. y Mét. 3.1.3. Lote II), mediante la reacción de fijación de complemento, que fué la primera en positivizarse de

las tres ensayadas (FC, IFI y AD). Los animales mostraron FC positiva a los 15 dpi, con títulos sostenidos durante 600 días.

Los títulos oscilaron entre 1/1 y 1/128, la mediana varió entre 4 y 16, y la media armónica se aproximó a la mediana en 3 de 4 animales.

TABLA XX

Perfil serológico de perros experimentalmente infectados con la cepa CA-I de *T. cruzi* mediante la reacción de fijación de complemento (FC).

Identif. del perro	Días de infección por <i>T. cruzi</i> :														
	MA	M	15	30	60	100	135	170	200	235	275	300	390	450	600
I	6.6	8	4	16	32	32	8	8		8	16	4	8	4	32
II	4.1		8	8		4	8	4	4	8	16	4	2	1	8
III	4.4	16	4			2	16	32	16	16	16	16	16	4	16
IV	6.7	8	8	8	4	32	8	8	4		ND	8	8	4	128

Título máximo 128 MA = Media armónica.
M = Mediana.

5.7.- Conservación de sueros caninos. Normalización de métodos de conservación y evaluación de los títulos serológicos de 100 sueros caninos con y sin el empleo de conservador:

5.7.1.- Diferencia de títulos entre muestras puras y glicerinadas sin discordancia entre ellas:

El 82% de los sueros mostraron el mismo título para IFI en muestras puras y glicerinadas, y el 90% tenía el mismo ó difería en una dilución. Tres muestras glicerinadas (3%) registraron aumento de títulos en dos o más diluciones, al compararlas con las puras. En las tres hubo reactividad por ELISA (Tabla XXI).

5.7.2.- Diferencias de títulos entre muestras puras y glicerinadas con discordancia serológica:

Por comparación entre sueros puros y glicerinados el 7% mostró discordancia serológica.

Tres canes fueron negativos según las muestras de suero puro y positivos según las glicerinadas. Dos pertenecían a PP-AE y eran reactivos para ELISA y HAI y el tercero, un perro PNF-AE fue reactivo para HAI y ELISA. Se confirmó la positividad de los dos primeros por empleo del conservador.

De los restantes cuatro sueros, reactivos en las muestras de suero puro y negativos en las glicerinadas, uno pertenecía a un PP-AE y era reactivo para HAI y ELISA. Los tres restantes eran PNF-AE y no reactivos para HAI, tal que en el suero del PP-AE se detectó reactividad cuando se usó conservador. De los restantes, la imposibilidad de efectuar ELISA por escasez de suero dificultó su análisis (Tabla XXI).

TABLA XXI

Correlación entre resultados de IFI de muestras de sueros puros y glicerinados. Evaluación de la capacidad de conservación de una solución tamponada de glicerina.

	Comparación de muestras puras y glicerinadas		
	Sin discordancia serológica	Con discordancia serológica	Total
Igual título	82	-	82
Títulos que difieren en una dilución.	8	-	8
Títulos que difieren en más de una dilución.	3	7	10
Total de sueros	93	7	100

DISCUSION DEL CAPITULO II

Existe gran número de reacciones serológicas de uso frecuente en el diagnóstico de enfermedades parasitarias. Se fabricaron reactivos comerciales para Toxoplasmosis, Leishmaniasis Tripanosomiasis Americana y Africana, Amebiasis, Schistosomiasis y otras Helmintiasis (194).

Las reacciones serológicas anti T.cruzi en humanos permiten detectar anticuerpos fijadores de complemento (99,41), aglutinantes (195,161,196), precipitantes (197), y de superficie (198). Se desarrollaron programas de cooperación internacional para la normatización metodológica de IFI, HAI, CF y AD (199), se seleccionaron programas de control de calidad para convalidar el funcionamiento de reactivos y equipos (200) para emplearlos en estudios poblacionales longitudinales (91) y transversales (164,201), de prevalencias de infección en poblaciones rurales (202) o en bancos de sangre (98).

En reacciones empleadas en animales, algunos de sus parámetros serológicos básicos han sido desestimados. Estudios de la sensibilidad, especificidad, título mínimo diagnóstico y distribución de frecuencias de títulos, entre otros, son el marco teórico metodológico para la detección de anticuerpos específicos en las diferentes especies.

Evaluaciones serológicas en poblaciones animales de Estados Unidos y América Latina empleando metodología para humanos omitieron los controles de reactividad (154), ni evaluaron la sensibilidad de las reacciones para las diferentes especies (154,160), en relevamientos epidemiológicos de poblaciones animales domésticas y silvestres (127).

Se acepta que la función de las reacciones serológicas en especies animales es sólo indicadora de respuesta, si no median

estudios confirmativos de su confiabilidad (127).

La sistematización de la metodología de normatización de técnicas serológicas de humanos a los sueros caninos ha sido objeto de este estudio. Métodos sensibles para la detección del agente causal se requieren para determinar la sensibilidad y descartar el efecto de reacciones cruzadas por otros organismos o por efecto de diversas patologías clínicas.

Se compararon los resultados de xenodiagnósticos y fijación de complemento en canes (154), y humanos (189) de un área endémica del nordeste de San Pablo en Brasil para evaluar en ambas especies la correlación entre métodos. Las prevalencias de infección por xenodiagnóstico y por fijación de complemento en los pobladores, del 5% y 55% respectivamente, revelaron dificultades metodológica para la detección de T.cruzi o de los anticuerpos específicos (189). Desde entonces no se realizaron evaluaciones sistemáticas de la sensibilidad de los métodos parasitológicos y serológicos en caninos. Por esta causa, en este trabajo fueron tomados en cuenta los parámetros antes mencionados.

Así, la intersección entre los histogramas de frecuencias de títulos de perros parasitémicos y no parasitémicos de un área endémica para la Enfermedad de Chagas fué equidistante entre 8 y 16 y entre las diluciones 16 y 32 para IFI y HAI respectivamente, y se registró un título máximo de 1/4 y 1/16 para IFI y HAI en el suero de los animales enfermos de la ciudad de Buenos Aires. En base a ambos resultados se seleccionó 1/16 como el título mínimo diagnóstico para IFI y 1/32 para HAI. La elevada correlación entre resultados parasitológicos y serológicos sugiere baja probabilidad de reacciones cruzadas, a mayores diluciones que las seleccionadas, para canes de terreno

afectados de otras infecciones y patologías.

En sueros caninos se seleccionaron títulos mínimos diagnóstico para AD igual a 1/128 (160) como en este trabajo. En otros estudios con sueros caninos títulos mayores (1/128 para HAI) (127), o menores (1/16 para HAI) (159) fueron seleccionados.

Se utilizaron cuatro antígenos para HAI, tres de fabricación industrial y el cuarto preparado en el INDIECH con glóbulos rojos tanados humanos Rh negativo. En tres de ellos, previa y posteriormente a la adaptación del método, los resultados fueron negativos para sueros caninos de etapas aguda y subaguda de la infección experimental. Uno de los antígenos de fabricación comercial masiva, descrito precedentemente brindó resultados satisfactorios en canes. La metodología de tanado, la procedencia de glóbulos y conservadores empleados en el producto no pudo ser determinada. Un alto número de sueros de perros parasitémicos de Amamá mostraron títulos de 1/16 por debajo del mínimo de reactividad para HAI, los cuales fueron reactivos para FC, IFI y AD. Esta discordancia disminuyó la sensibilidad del HAI al 78% y resultó la más baja de las cinco reacciones serológicas. Distintos lotes comerciales de HAI han mostrado variada sensibilidad para nuestros controles normatizados de reactividad. Se acepta que diferencias diarias en el tanado de los glóbulos en procedimientos a gran escala inciden en la sensibilidad de los lotes (203). Si bien la reacción de hemaglutinación indirecta mostró la más baja sensibilidad entre las ensayadas, satisfizo los requerimientos mínimos de una reacción utilizable en terreno. Por ser de simple operatividad y no requerir infraestructura sofisticada ha sido empleada con éxito en Termas y Amamá, sobretodo antes de la normatización de los métodos de conservación de sueros.

La reacción de IFI empleada en 100 sueros mostró una sensibilidad del 96%, y homogénea para lotes de sueros caninos de terreno y laboratorio.

Las reacciones de FC y AD, empleadas en bajo número de sueros de terreno, presentaron el máximo de sensibilidad en ambas. De ellas, la primera fué utilizada para evaluar el perfil serológico de perros experimentalmente infectados que mostraron reactividad entre los 15-600 días de infección. Positivización serológica por FC fué descripta a partir de los 60 dpi (80).

La reacción de AD muestra en humanos un comportamiento de muy alta sensibilidad y baja especificidad (196). En sueros de perros de áreas endémicas de Amamá la empleamos como la cuarta reacción serológica, y en el laboratorio para la búsqueda de anticuerpos aglutinantes en los perros candidatos a dadores, durante los primeros seis meses y entre los 5 y 10 años de la infección.

La reacción inmunoenzimática de ELISA ha sido utilizada con éxito en seguimientos de pacientes (204) y en evaluaciones epidemiológicas de poblaciones humanas (201). Su sensibilidad fué del 100% en pacientes cuando se emplearon antígenos preparados a partir de fracciones subcelulares del parásito (205) y del 87% en nuestra experiencia con los perros del lote de Amamá con antígenos obtenidos a partir de un homogenato total de T.cruzi. Esta reacción requirió normatizar un alto número de reactivos para la adaptación a sueros caninos. Sin embargo, el empleo de conjugados y antígenos de mayor sensibilidad y pureza podrían aumentar aún más la sensibilidad de la reacción para el diagnóstico serológico de los perros.

La técnica de la glicerina tamponada ha probado su eficiencia para la conservación de muestras de sueros caninos. El 90% conservó su título y en el 3% rescató reactividad, que muestras

no glicerizadas de canes parasitéticos han desestimado.

Las evaluaciones realizadas con las cinco técnicas a partir de sueros de perros parasitéticos, han permitido constatar fehacientemente sensibilidad, distribución de títulos, títulos máximos, mínimos, media armónica y evolución de la infección experimental. Conclusiones asociadas a lotes de perros parasitéticos terreno fueron extraídas como soporte secundario al basamento metodológico, por falta de certeza para detectar infección a diferencia de los parasitéticos.

El empleo de canes en su doble función de reservorios naturales y hospedadores experimentales de T.cruzi permitió modelar la respuesta serológica en estos animales y evaluar los parámetros asociados a las cinco reacciones, auxiliados por animales probadamente infectados, en terreno y en el laboratorio; por otra parte, comparar su aplicabilidad a variadas circunstancias y concluir que en todas las reacciones ensayadas la de elección será aquella que mejor se adapte a las condiciones impuestas de factibilidad, operatividad, sensibilidad, especificidad o bajo costo.

La serología es útil como método de vigilancia de la transmisión del T.cruzi o como indicador de la persistencia del control de esta transmisión en un área endémica para la enfermedad de Chagas. Por ello, esta normatización puede ser aprovechada por los laboratorios integrantes de los programas de control de la infección para la investigación serológica de este reservorio doméstico, del cual se ha probado que en condiciones de baja transmisión se infecta antes que el humano (145).

RESULTADOS

CAPITULO III.- ANALISIS DE LOS PARAMETROS POBLACIONALES Y SU RELACION CON LA INFECCION POR T.cruzi EN CANES DE UN AREA ENDEMICA DE ARGENTINA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS:

6.1.- Características estructurales de la viviendas incorporadas al estudio:

6.1.1.- Distribución de viviendas e infestación por triatominos:

Los datos agrupados del tipo de vivienda para las tres áreas se detalla en la Tabla XXII.

TABLA XXII

Datos agrupados de tipificación de viviendas según el área.

Nº de viviendas tipo:

Area	Nº de viviendas tipo:			Total	(%)
	Rancho	Mixta	de Material		
Rural	5	17	0	22	(23.5)
Intermedia(*)	6	30	8	44	(46.8)
Periurbana(**)	2	5	21	28	(29.7)
Total	13	52	29	94	
	(13.9)	(55.4)	(31.8)		

(*) Se excluyeron del cómputo los datos de cinco viviendas no tipificadas.

(**) Se excluyeron del cómputo los datos de tres viviendas no tipificadas.

La figura 17 muestra la distribución de las subáreas en la Zona y de 94 viviendas tipificadas de las tres subáreas.

6.1.2- Grado de infestación por triatominos de las viviendas seleccionadas:

Los datos individuales de infestación domiciliaria, del número de perros por vivienda y la tipificación urbanística del caserío se presentan en el Apéndice pto.1.

En el estudio entomológico de base previo al rociado, se capturaron 707, 1220 y 518 vinchucas de los dormitorios de R, I y Pe respectivamente (Tabla XXIII). Durante la evaluación entomológica post rociado se encontraron vinchucas en 11 domicilios de I, en rango de 1-5 vectores por vivienda y en 5 viviendas de Pe en rango de 1-10 vectores por vivienda (Apéndice Pto 1).

En I y R se observó mayoría de viviendas mixtas y en Pe de casas de material. En todas las áreas se encontraron representadas viviendas tipo 1 y 2, no se observaron viviendas de material en R, las que constituyeron el 72% de Pe y estuvieron presentes en el 18% de las viviendas de I (Fig. 17). Fué heterogénea la distribución de viviendas tipificadas según los materiales de construcción ($\chi^2 = 36.45$; $P \geq 0.05$, $\lambda = 4$)

TABLA XXIII

Captura de triatominos en domicilio de las áreas rural (R), intermedia (I) y periurbana (Pe) durante la evaluación basal pre y post rociado.

Area	Número de viviendas	N* de vinchucas capturadas en domicilio:	
		pre	post
Rural	22	707	0
Interm.	46	1220	17
Periurb.	27	518	16
Total (%)	95*	2445 (99.7)	33 (1.3)

pre = pre rociado. post = post rociado a los 12 meses.
 (*) cinco viviendas no fueron evaluadas desde el punto de vista entomológico.

Figura 16

Tipificación y distribución de viviendas infestadas con vinchucas

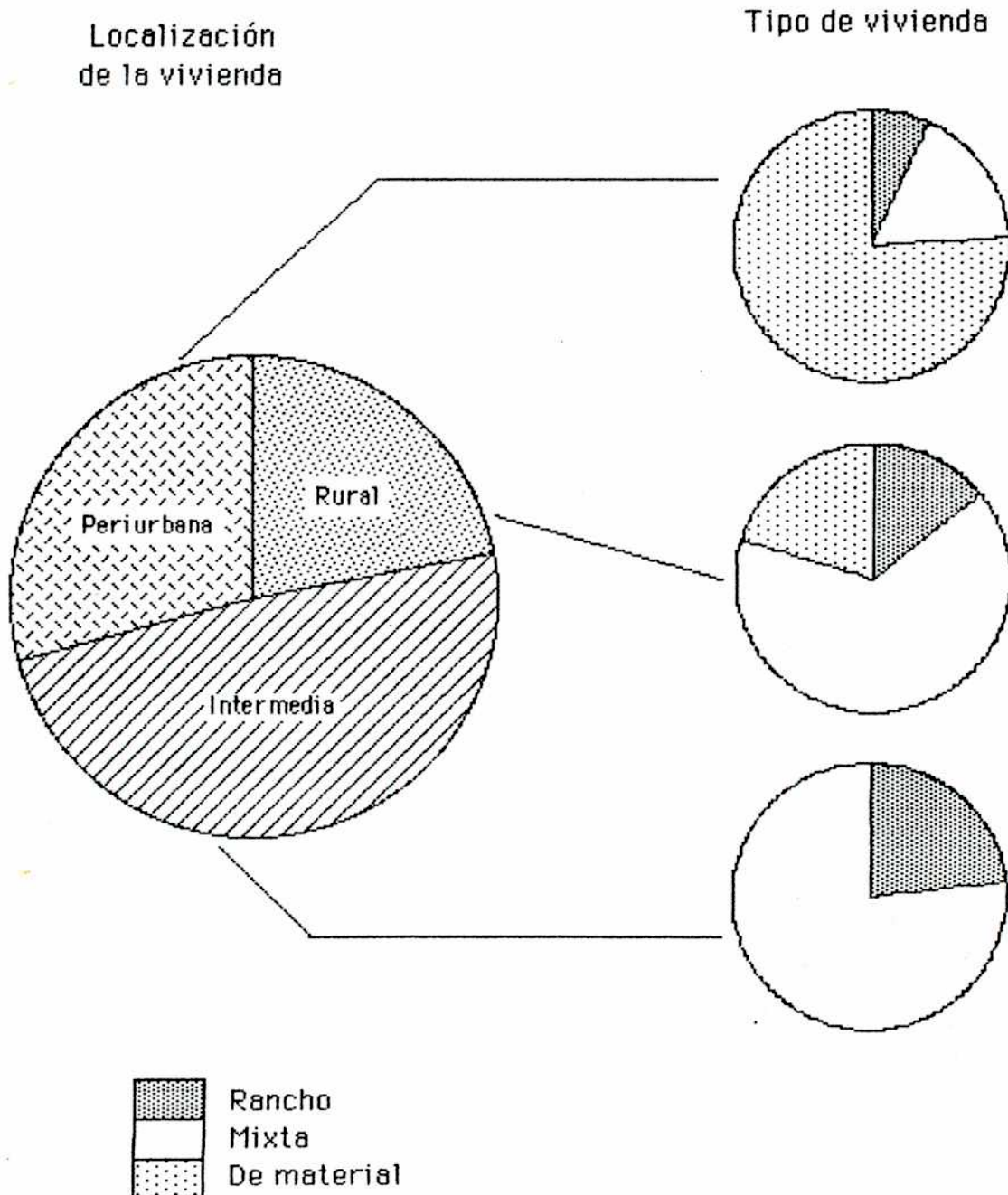


TABLA XXIV

Infestación domiciliar de base y post rociado de las áreas rural (R), intermedia (I) y periurbana (Pe).

Número de vinchucas por casa en domicilios:

Area	Número de viviendas	Pre-rociado		Post-rociado	
		M	d	M	d
R	22	23	25.6	0	0
I	46	15	30.4	3	2.5
Pe	27	14	11.1	3	2.2

M = mediana d = desviación standart (*) = en dormitorios.

Se registró mayor dispersión de triatominos en viviendas de R y de I que en las de Pe, y no se encontraron diferencias significativas entre ellas (Tabla XXIV).

6.2.- Características de la población canina sujeta a estudio:

6.2.1.- Densidad poblacional canina por vivienda (DPC):

Respecto de 345 perros pertenecientes a 100 viviendas rurales, la DPC fué 3.4 perros/casa. No se registraron diferencias significativas entre la DPC total y las correspondientes a cada subárea (DPC_r= 3.3; DPC_i= 3.3; DPC_{pe}= 3.6).

La figura 17 muestra la distribución de frecuencias de canes por unidad de vivienda. En el área total, 2,3 y 4 perros por vivienda fueron encontrados más frecuentemente. Se encontró un perro en el 7% de las viviendas y otro 7% estuvo constituido por viviendas con 6 o más perros. No se registraron diferencias respecto de este patrón en las respectivas subáreas. Del total de 103 viviendas visitadas se estudiaron los perros pertenecientes a

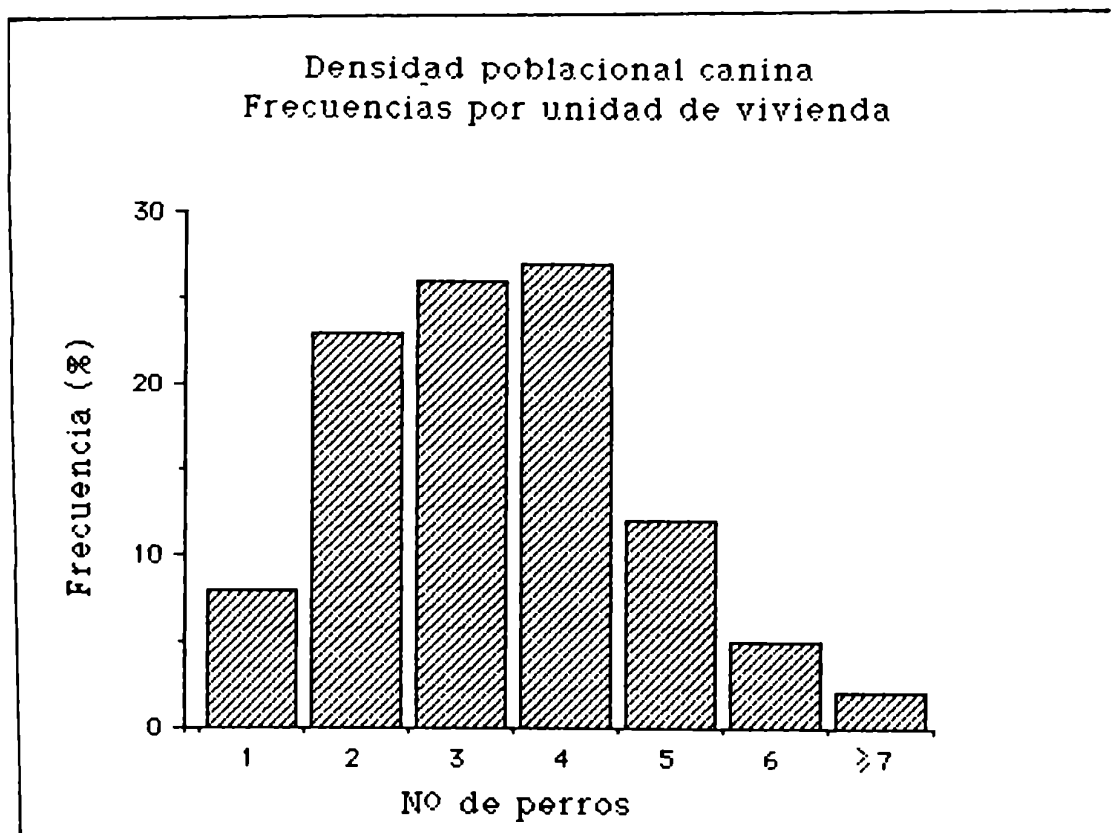


Fig.17.- Densidad poblacional canina (DPC). Frecuencias por unidad de vivienda en canes del área endémica de Termas.

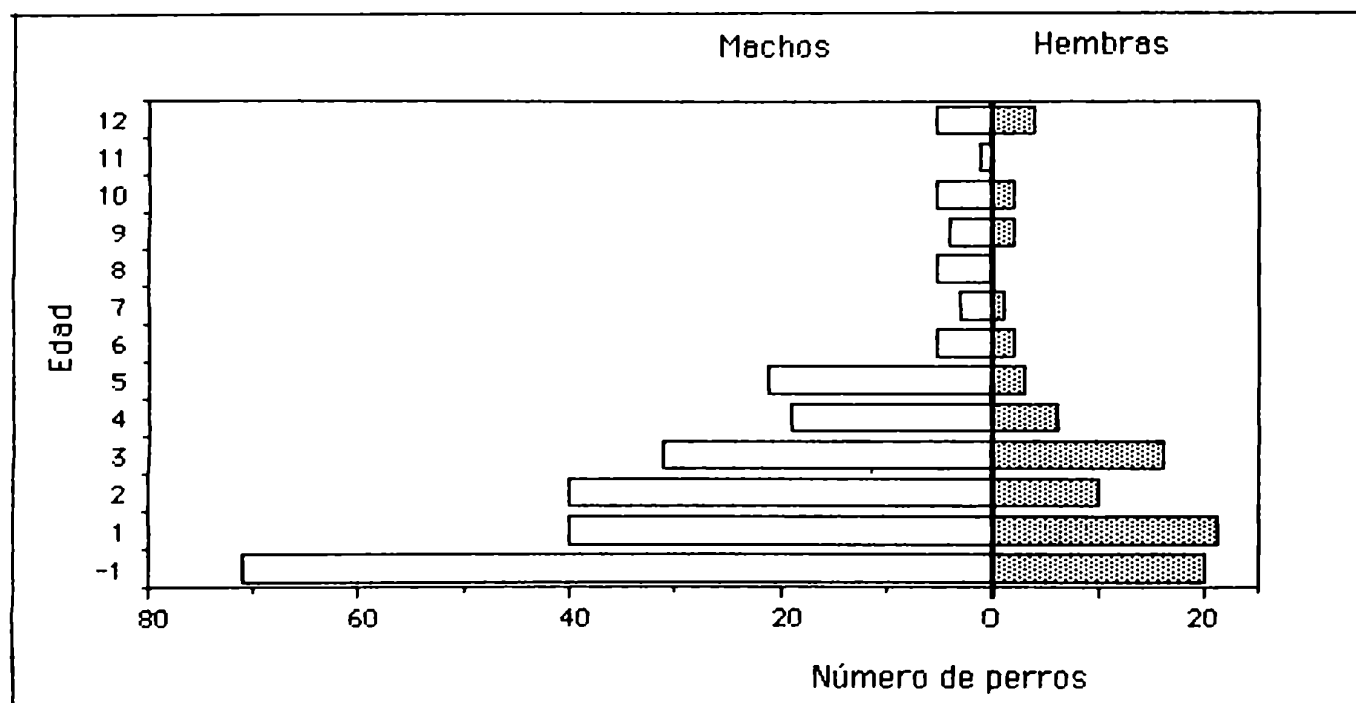


Fig.18.- Diagrama de barras de la distribución de sexos en canes del área endémica de Termas.

100 (97%), en número de 22, 49 y 29 viviendas para R, I y Pe respectivamente (Tabla XXVI).

El 47% de los perros del estudio habitaban I, cuyas viviendas constituyeron el 49% de las estudiadas (Ver Figura 17).

6.2.2.- Edad, sexo y función de los animales en la vivienda rural:

6.2.2.1.- Edad:

La Tabla XXV muestra las frecuencias de edad para intervalos etarios anuales crecientes de los canes del estudio discriminados por área operativa. El 75% de la población estuvo comprendido en el intervalo de edad entre 0-3 años y el 90% entre 0-5 años y el 10% correspondió a mayores de 6 años.

Se observó una disminución del 32% en el número de perros con edades comprendidas entre 1 y 2 años respecto de los de 0-1 año, y una disminución cercana al 50% en los de 3 años respecto de los menores de un año. Una disminución del 35%, 15% y 62% entre los canes del primer y segundo intervalo anual se registró en Pe, I y R respectivamente, que fue significativamente mayor ($P=0.05\%$) en canes de R respecto de los de I y Pe (Tabla XXV).

TABLA XXV

Frecuencias de edad para intervalos etarios anuales de perros habitantes de la Zona discriminados por Área.

Intervalo etario (en años)	NUMERO DE ANIMALES DE LAS AREAS				
	Periurbana	Intermedia	Rural	Total	%
_1*	29	40	21	90	26.5
1-**	19	34	8	61	17.8
	14	27	12	53	15.7
3-	19	19	10	48	14.1
4-5	17	20	12	49	14.3
6-7	3	7	1	11	3.2
8-9	2	6	3	11	3.2
10-11	3	3	2	8	2.3
= 12	4		3	9	2.6
Total	110	158	72	340	

(*) animales nacidos despues del rociado.

(**) animales nacidos antes del rociado.

6.2.2.2.- Sexo:

La relación de machos por hembra de la Zona (Rt) fue de 2.9, y para menores y mayores de un año fue 4.1 y 2.6 respectivamente (Tabla XXVI) entre los cuales no se registraron diferencias significativas (P=0.05%). La figura 19 muestra la pirámide poblacional de machos y hembras del área total.

Pe mostró la menor relación de machos a hembras en animales menores (2.2) y mayores de un año (1.6) (P=0.05), en I la relación fue 5,6 para los menores de un año y 4.3 para el resto y en R 3.2 y 2.7 para menores y mayores de un año respectivamente.

TABLA XXVI

Relación de sexos (R) para las diferentes áreas según intervalos etarios bianuales crecientes.

Intervalo etario (años)	A R E A S							
	Periurbana		Intermedia		Rural		Total	
	M	R	M	R	M	R	M	R
<1 *		2.2	34	5.6	16	3.2	70	4.1
1-**			26	3.2	4	1.0		1.9
2-3			36	3.6	18	4.0	76	3.0
4-5	12	2.4	18			3.0	39	3.9
			6	6.0		0	8	2.6
3-9	1	1.0	5	5.0	3	***		4.5
≥ 10	3	0.7	4	***	4	2.0	11	1.8
1-20	50	1.6	95	4.3	32	2.7	183	2.6
0-20	70	1.7	129	4.6	54	2.8	253	2.9

M = machos * animales nacidos después del rociado.
 ** animales nacidos antes del rociado.
 *** no hay hembras en ese intervalo.

Los animales de Pe mostraron un patrón homogéneo de R_e para todos los intervalos de edad y aunque no se observaron diferencias significativas entre los distintos intervalos de Pe y de R, ambos mostraron una tendencia heterogénea. Los animales de 1-5 años mostraron un R_e de 2.0-2.4, 1.0-4.0 y 3.2-9.0 para Pe, I y R respectivamente.

6.2.2.3.- Características ocupacionales de los animales censados según diferenciación por área:

Guardianes, cazadores y cabreros estuvieron representados en el 69% , 26% y 5% respectivamente (Tabla XXX).

Excepto los cabreros, que definen su rol desde el nacimiento, al mamar leche de las cabras, fué a partir del primer año la edad que los perros tuvieron asignado su rol en la vivienda rural. Los cazadores, además de su función específica, eran guardianes de la vivienda.

6.2.2.4.- Hábitos alimentarios y de caza de los canes de este estudio:

Fué homogénea la información proporcionada por los dueños de los canes respecto de sus hábitos alimentarios y de caza. Mezclas de polenta, anco y chicharrón se prepararon a los animales y fueron excepcionales las viviendas donde se proporcionó sobras de comida a los perros. Los cazadores se alimentaban de carnes cocidas y en ningún caso de presas crudas.

6.3.- Dinámica de la infección por T.cruzi en canes de área endémica:

6.3.1.- Perfil parasitológico de infección:

La prevalencia total de infección por xenodiagnóstico (Px) de perros de ambos sexos de 0-11 meses y de un área rociada un año antes del estudio fue del 11% , y del 21%. en los mayores de un año, que nacieron en un ambiente no rociado (Tabla XXVII). No hubo disminución de la parasitemia detectada por xenodiagnóstico en canes adultos y seniles respecto de los más jóvenes, y a crecientes intervalos de edad se observó una tendencia creciente de Px. La Tabla XXVIII muestra los perfiles de infección para animales discriminados por sexo. No observaron diferencias significativas en los perfiles de infección de machos y hembras, y diferencias parciales estuvieron relacionadas el bajo número de animales en algunos intervalos. Fueran machos hembras, animales de 1-3 años de edad mostraron Px del 9-18% y los de 4-5 años del 33-42%. El incremento observado en los de 10-11 años, y en los mayores de 12 confirman que habría tendencia a parasitemia sostenida en animales seniles (Tablas XXVII y XXVIII). En los mayores de 6 años diferencias de Px para distintos intervalos del mismo y de diferente sexo se debieron al bajo número de animales.

6.3.2.- Perfil serológico de la infección en machos y hembras de área endémica:

La prevalencia de infección global para machos y hembras (Pi) por IFI y HAI fue del 30%. En ambos sexos, Pi creció a medida que aumentó la edad de los animales. Las hembras del

intervalo de 6-7 años mostraron P_i igual a cero, coincidente con los resultados del xenodiagnóstico.

Entre los perros que habitaron el área antes del rociado, el 50% de los machos y el 60% de las hembras se infectaron antes de cumplir los 4 años, mientras que respectivamente el 84% y 81% lo hicieron antes de cumplir los 6 años.

De los infectados, el 88% fueran machos o hembras mostraron *T. cruzi* o anticuerpos específicos antes de cumplir los ocho años de edad (Tabla XXVIII).

Animales menores de un año mostraron P_i similares a P_x . De 11 machos infectados, 19 eran parasitémicos, de los cuales 3 eran no reactivos, y de las 2 hembras reactivas ambas eran parasitémicas. En los mayores la relación P_x/P_i fue de 1 a 2.

6.3.3.- Evaluación y comparación del perfil de infección para las distintas subáreas:

P_x de R (P_{xR}) fué significativamente mayor ($P=0.05\%$) a P_x de I (P_{xI}) y P_x de Pe (P_{xPe}), esta tendencia se observó en todos los intervalos y especialmente en el de 1-5 años (Tabla XXVII).

P_x y P_i fueron crecientes para crecientes intervalos de edad, en el área total y en las distintas subáreas.

TABLA XXVII

Prevalencias de infección por serología y xenodiagnóstico de perros de ambos sexos encuestados según discriminación de área.

A R E A S

Edad	Nº de perros	Periurbana		Intermedia		Rural		Total	
		Px	Pi	Px	Pi	Px	Pi	Px	Pi
-1*	92	2/28	3/24*	3/41	3/40 [#]	3/22	3/22	8/92	9/86
1-5**	213	13/70	27/69 [#]	18/103	36/100 [#]	15/41	20/41	46/213	83/210
6-11	27	2/8	3/8	4/14	12/14	2/5	4/5	8/27	19/27
≥ 12	8	0/4	1/4	2/2	2/2	1/2	1/2	3/8	4/8
0-20	340	17/110		27/160		21/70 [#]		65/340	
		34/105		53/156		28/70		115/331	

(*) animales nacidos después del rociado.

(**) animales nacidos antes del rociado.

(&) faltó un suero para serología.

(#) faltaron dos sueros para serología.

Px= prevalencia de infección por xenodiagnóstico (%).

Pi= prevalencia de infección por serología (%).

(")= $P \geq 0.05\%, \chi^2 = 6.01, \lambda = 2$.

TABLA XXVIII

Prevalencias de infección mediante inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación y xenodiagnóstico en machos y hembras, para intervalos etarios crecientes.

Sexo	Edad en años	Nº perros examinados	% de positivos:			
			parasitemia (%)	n	serología (%)	n'
Machos	<1*	72	12.5	9&	11.1	8
	1-**	39	15.4	6	20.5	26
	2-3	74	16.2	12	35.1	24
	4-5	40	42.5	17	60.0	2
	6-7	8	37.5	3	75.0	6
	8-9	9	33.3	3	55.5	3
	10-11	6	16.6	1	55.5	3
	= 12	5	40.0	2	60.0	3
	0-20	181	24.3	44	37.0	67
Hembras	<1*	18	11.1	2	11.1	2
	1-**	22	9.1	2	9.1	2
	2-3	27	18.5	5	51.8	14
	4-5	9	33.3	1	66.6	6
	6-7	3	66.6	2	66.6	2
	8-9	2	0	0	100.0	2
	10-11	2	0	0	50.0	1
	= 12	4	0	0	25.0	1
	0-20	69	14.5	10	40.6	28
Total de machos y hembras		340(@)	19.1	65	31.7	105

- (*) animales nacidos después del rociado.
 (**) animales nacidos antes del rociado.
 n = número de perros parasitémicos.
 n' = número de perros reactivos.
 (@) se realizó serología a 331 perros.
 (&) 6 canes eran serologicamente reactivos.

6.3.4- Asociación entre niveles de infestación y dinámica de infección:

6.3.4.1.- Animales que se desarrollaron en un ambiente post rociado:

Noventa canes menores de un año vivieron en un medio con muy baja infestación domiciliaria, 33 vinchucas en el total de viviendas estudiadas (Tabla XXIII). Once de ellos (12.2%) fueron parasitémicos, siete pertenecían a viviendas donde la evaluación entomológica de domicilio fué cero. En estas 11 viviendas no se observaron hembras infectadas, excepto en una donde había una hembra de 5 años de edad parasitémica y de serología reactiva. De ellas, 8 eran mixtas y 3 urbanas.

6.3.4.2.- Animales que se desarrollaron en un ambiente no controlado para el desarrollo de triatominos:

Doscientos cincuenta perros crecieron en un medio no rociado excepto durante el año previo al estudio. P_i fueron crecientes para crecientes intervalos etarios. Fueran machos o hembras, P_x no disminuyó para los crecientes intervalos anuales.

6.3.5.- Comparación entre perfiles de infección de perros mayores de un año clasificados según su rol:

Perros cazadores (c) y guardianes (g) mostraron similares P_i ($P_i(g)=37\%$ y $P_i(c)=47\%$) y P_x ($P_x(g)=21\%$ y $P_x(c)=29\%$), no así los cabreros (ca) que constituyeron el 5% de los canes de este estudio y mostraron P_i y P_x significativamente menores ($P=0.05\%$) que en los restantes ($P_x(ca)=6.6\%$; $P_i(ca)=13.3\%$).

Igual registro de P/S se observó en canes que cumplían diferentes funciones (Tabla XXIX).

$P_i(ca)$ coincidió con la registrada para los animales que

pernoctan en el corral (dato no mostrado en Tabla), 13.3% en ambos casos.

TABLA XXIX

Prevalencias de infección por serología (Pi) y xenodiagnóstico (Px) de perros mayores de un año clasificados según su rol en la zona.

Rol de los perros en la vivienda:

	Guardianes	Cazadores	Cabreros	Total
Nº de perros examinados(%)	168 (69)	71 (26)	15 (5)	254** (100)
Px (%)	20.8	28.3	6.6	22.4
Pi (%)	37.5	47.8	13.3	38.6

(**) perros clasificados por su función.

6.3.6.- Comparación entre los perfiles de infección de perros clasificados según su estado general:

Se estudió la influencia que parasitemias sostenidas durante largos períodos de tiempo ejercen en el estado general de los canes.

La Tabla XXX muestra la relación entre parasitemia y estado general de 60 perros infectados con T.cruzi. De ellos 39 (65%) presentaron estado satisfactorio y 36 (60%) eran parasitémicos según estudios de xenodiagnóstico. De los parasitémicos, el 61% mostró estado general satisfactorio, y de 24 infectados con T.cruzi no parasitémicos, el 71% presentó estado satisfactorio.

No se observó asociación ($\chi^2 = 0.57$; $p \geq 0.05$, $\lambda = 1$) entre el estado general de los canes y la parasitemia.

TABLA XXX

Correlación entre prevalencias de infección por serología y/o xenodiagnóstico, y el estado general de 60 perros infectados sometidos a revisión clínica veterinaria.

Estado general	Infectados parasitémicos (%)	Infectados no parasitémicos (%)	Total (%)
Satisfactorio	22(61.1)	17(70.9)	39(65)
No satisfact.	14(38.9)	7(29.2)	21(35)
Total	36(23.4)	24(15.6)	60(100)

6.3.7.- Morbilidad en perros de área endémica evaluada por estudios clínicos de electrocardiografía:

De 85 ECG obtenidos de animales mayores de dos años de I y Pe, 32 fueron normales, 40 mostraron arritmia sinusal y 15 de ellos presentaron pausas prolongadas en los trazados. Los restantes 12 mostraron diversas alteraciones: extrasístoles ventriculares, bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo y evidencias de isquemia e injuria en cara ántero-lateral (Tabla XXXI). Diez de doce animales (83.3%) con una o más alteraciones mostraron serología y/o xenodiagnósticos positivos. En 2/10 perros serológicamente reactivos para T.cruzi y en 2/3 parasitológica y serológicamente negativos presentaron bradicardia sinusal. En seis animales con reactividad serológica, con o sin parasitemia, se observó bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior izquierdo en tres, hemibloqueo anterior izquierdo en dos y extrasístoles ventriculares en uno.

Dos animales que mostraron en los trazados evidencias de isquemia e injuria en cara ántero-lateral cardíaca (Tabla XXXII, Nº 135 y Nº 146) fueron reactivos y no reactivos por serología respectivamente.

TABLA XXXI

Distribución de alteraciones por ECG en perros de dos subáreas de la Zona (periurbana e intermedia).

Alteración	Prevalencia* (%)	ECG alterados ECG totales
Arritmia sinusal	47.0	40/85
Bradicardia sinusal	5.9	5/85
Extrasístoles ventr.	1.2	1/85
BRD y/o HBAI	5.9#	5/85
Isquemia e injuria cardíaca **	2.3	2/85
Alteraciones varias	61.0	52/85

(*) número de animales con alteraciones/ número de animales totales

(#) uno con bradicardia sinusal.

(**) en cara ántero-lateral.

BRD = bloqueo completo de rama derecha

HBAI = hemibloqueo anterior izquierdo.

No se observaron preferencias de edad, sexo o de área entre los perros con alteraciones clínicas. Siete de ocho, con trazados ECG alterados pertenecían a familias sedentarias, que permanecían con sus animales en el área durante todo el año (Tablas XXXI y XXXII).

6.3.8.-Migración:

El carácter de vivienda perteneciente a habitantes migrantes temporarios o no fue considerado para captar la influencia de las migraciones en las poblaciones de vectores y en los perfiles de infección de sus perros. De 103 viviendas del

estudio, 91 (88.3%) se clasificaron como viviendas de pobladores sedentarios (VFS) y viviendas de pobladores migrantes (VPM).

TABLA XXXII
Alteraciones ECG detectadas en perros de las áreas Periurbana e Intermedia infectados con T.cruzi.

Nº casa	Area	Sexo	Edad	INFECCION		Migra	Alteraciones ECG
				Xeno.	Serol.		
392	Pe	♂	8	Neg	Pos	no	B.S.
439	Pe	♀	9	Neg	Neg	si	B.S.
420	Pe	♂	4	Pos	Pos	no	B.S.
394	Pe	♂	3	Neg	Pos	si	E.V.
612	Pe	♂	3	Pos	Pos	no	Bloqueo rama der. Hemibloqueo ant.izq
268	I	♂	5	Pos	Pos	no	Hemibloqueo ant.izq.
268	I	♂	4	Neg	Pos	no	Isquemia e injuria ántero-lateral.
187	I	♀	2	Neg	Neg	si	Isquemia e injuria ántero-lateral
156	I	♂	5	Pos	Pos		Bloqueo rama der. Hemibloqueo ant.izq. Arritmia sinusal c/ pausas prolongadas.
247	I	♂	2	Pos	Pos		Bloqueo rama der. Hemibloqueo ant.izq.
237	I	♂	5	Neg	Neg	no	B.S. acentuada
181	I	♂	8	Pos	Pos	no	Hemibloqueo ant.izq. B.S. acentuada

B.S.= Bradicardia sinusal E.V.= extrasístoles ventriculares.
der=derecha. ant.izq.=anterior izquierdo. Xeno=xenodiagnóstico.

A los perros de familias de hábitos migrantes que viajaban con sus dueños, se los denominará perros migrantes (PM) y a los perros pertenecientes a familias migrantes perros no migrantes (PNM). El 29.5% y el 70.5% correspondieron respectivamente a VPM

y a VPS respectivamente. El 41%, 31% y 9% de las viviendas de Pe, I y R respectivamente pertenecían a pobladores migrantes. No se registraron diferencias ($P=0.05\%$) entre ellos.

El 27% de los perros migraba con regularidad, el 37%, 29% y 10% de éstos pertenecían a Pe, I y R respectivamente.

No se registraron diferencias estadísticas entre P_x de perros migrantes (23%) respecto de los sedentarios (25%), ni tampoco entre P_i , 30% y 41% para migrantes y sedentarios respectivamente.

P_{x_i} y P_{i_i} fueron similares ($P=0.05\%$) para perros migrantes y sedentarios. Los animales sedentarios de Pe mostraron $P_{i_{Pe}}$ y $P_{x_{Pe}}$ con una tendencia creciente respecto de los migrantes (Tabla XXXVI). No se compararon P_{x_R} y P_{i_R} por el escaso número de familias migrantes.

TABLA XXXIII

Prevalencias de infección por xenodiagnóstico y serología de los perros de viviendas de pobladores migrantes (VPM) y sedentarios (VPS) diferenciadas según la subárea.

	A R E A S							
	Periurbana		Intermedia		Rural		Total	
	VPM	VPS	VPM	VPS	VPM	VPS	VPM	VPS
Nº viviendas	11	16	13	29	2	20	26	65
P_x perros (%)	4/27 14.8	12/46 26.1	7/30 23.3	15/74 20.2	3/5 60.0	14/45 31.1	14/62 22.6	41/165 24.8
P_i perros (%)	5/27 18.5	19/46 41.3	11/30 36.6	31/74 41.9	3/5 60.0	18/45 38.8	19/62 30.6	68/165 41.2

P_x = prevalencia de infección por xenodiagnóstico.
 P_i = prevalencia de infección por serología.

6.3.9.- Aproximación a un estudio de riesgo:

6.3.9.1- Número de viviendas habitadas por lo menos por un perro parasitémico:

TABLA XXXIV

Porcentaje de viviendas habitadas por uno ó más perros parasitémicos según la subárea.

	A R E A S			Total
	Periurbana	Intermedia	Rural	
Nº viviendas	31	49	23	103
N* casas con perros con xen+	13	20	14	47
(%)	(41.9)	(40.8)	(60.9)	(45.6)

xen+= xenodiagnóstico positivo.

Se detectó el 46% de viviendas habitadas por lo menos por un perro parasitémico, y 42%, 46% y 61% para Pe, I y R respectivamente.

6.3.9.2.- Influencia de los materiales de construcción en el perfil de infección de los canes:

El 14%, 55%, y 31% de las viviendas de la Zona correspondió a ranchos, viviendas mixtas y urbanas respectivamente. El 7%, 26% y 12% de los canes habitantes de caseríos tipo 1,2 y 3 respectivamente eran parasitémicos y el 27%, 61% y 19% de las casas tipo 1, 2 y 3 respectivamente albergaban algún can parasitémico. Fué significativa la diferencia ($P \geq 0.05\%$) en el número de perros parasitémicos habitantes de viviendas mixtas

respecto de los ranchos y de las urbanas, y el porcentaje de viviendas mixtas con perros parasitéticos fue estadísticamente mayor que el de los restantes tipos respecto del porcentaje de perros parasitéticos y de casas con perros parasitéticos (Tabla XXXV).

De 56 viviendas mixtas, 50 (89%) se analizaron respecto de los materiales de construcción del techo, 19 (38%) mostraron techo de chapa u otro material de construcción y el resto estaba construido parcial o totalmente con materiales autóctonos. De esos 19, 11 (58%) tenían por lo menos un perro parasitético y el 33% de los perros habitantes de esas viviendas eran parasitéticos. No mostraron diferencias significativas ($P=0.05\%$) en el número de perros parasitéticos y en el número de viviendas con ellos entre caseríos mixtos provistas o no de techo de material.

Fué heterogeneo el patrón de distribución de viviendas para cada subzona. La figura 16 muestra el diagrama de tortas de la distribución de viviendas tipo 1, 2 y 3 del área total y de las respectivas subáreas.

En R el 77% de las casas eran ranchos y no se observaron viviendas urbanas. En I el 70% eran mixtas y en Pe el 72% urbanas. El 30% y 28% de las viviendas restantes de I y Pe respectivamente, pertenecían en iguales proporciones a los otros dos tipos urbanísticos. No se evaluó la influencia de los materiales de construcción en el perfil de infección de canes agrupados por subárea por la heterogeneidad de la distribución de viviendas. Para el estudio de la infestación por T.cruzi en los tres tipos de viviendas de la Zona, se incluyeron viviendas con canes de un tamaño mayores que crecieron en un medio

controlado de infestación domiciliaria y peridomiciliaria; una vivienda de Fe (Nº 387), habitada por dos perros menores de un año y fue excluida del cómputo.

La Tabla XXXVI muestra los niveles de infestación de 74 viviendas tipificadas. La mediana del número de triatominos encontrados en viviendas tipo 1, 2 y 3 inmediatamente antes del rociado fué 27, 21 y 11 respectivamente, y los porcentajes de infección por T.cruzi del 44%, 38% y 13% para viviendas tipo 1, 2 y 3 respectivamente. Se observaron diferencias significativas (P=0.05%) entre los porcentajes de infección por T.cruzi en vinchucas de caseríos urbanos respecto de los porcentajes de vectores de los restantes tipos (Tabla XXXVI).

TABLA XXXV

Correlación entre parasitemia en canes y características de construcción de los caseríos del estudio.

AREA (Nº casas)	Tipo de vivienda	Nº P xen(+) (%) Nº P totales	Nº casas P xen(+) (%) Nº casas totales
Total	ranchos	4/59 (6.7)	4/15 (26.6)
(100)	mixtas	50/188 (26.5)*	34/56 (60.7)**
	de material	11/91 (12.1)	6/31 (19.3)

Nº P xen (+) = número de perros parasitémicos.

Nº casas P xen (+) = número de casas con perros parasitémicos.

Nº P totales = número de perros totales.

(*) de los perros 50 parasitémicos que habitaban viviendas mixtas, 17 (33%) pertenecían a viviendas con techo de chapa y 34 (66%) perros parasitémicos habitantes de viviendas mixtas pertenecían a viviendas con techo de enramada.

(**) 63% (12/19) de las casas mixtas con techo de chapa mostraban perros parasitémicos y el 56.7% (21/37) de las viviendas mixtas con techo de enramada tenían perros parasitémicos. (#) = P= 0.05%, $\chi^2 = 13.6$, $\lambda = 2$.

TABLA XXXVI

Niveles de infestación en viviendas clasificadas según los materiales de construcción utilizados en la Zona.

Tipo de vivienda	Nº viviendas	Número de vinchucas por domicilio:	
		Mediana	% infectadas
1 (Rancho)	12	27	44
2 (mixta)	40	21	38
3 (urbana)	22*	11	13

(*) se excluyó una vivienda del área periurbana que tenía dos perros menores de un año.

DISCUSION DEL CAPITULO III

El reconocimiento de la población canina rural de un área endémica, para la enfermedad de Chagas tuvo dos propósitos: conocer el perfil poblacional canino y de la infección natural por T.cruzi en perros para compararlo con el perfil experimental, y por otra parte, estudiar la influencia de la distancia a un centro urbano sobre los parámetros poblacionales y de infección y morbilidad por T.cruzi en estos animales, para interpretar cómo interaccionan reservorios y hospedadores en los diferentes ambientes.

La participación del perro como proveedor de sangre y tripanosomas al ciclo doméstico de la transmisión ha sido reconocida en Argentina (119,83), Brasil (143), Venezuela (150) y Chile (162), entre otros. Sin embargo las marcadas diferencias en las prevalencias de infección canina y su influencia en la alimentación de los vectores (86,82) en las diferentes áreas geográficas justifican las discrepancias respecto de la importancia de su participación.

En nuestro país, la estrecha asociación entre el perro y el poblador rural puede ser la causa que aquí se presenten la más elevadas prevalencias de infección canina de Latinoamérica (146). El perro es la principal fuente de parásitos y sangre para la alimentación de triatominos domiciliarios (140), además el T.infestans presenta un índice de afinidad por este hospedador trece veces superior al del hombre (83).

Con el objeto de realizar un estudio transversal del perfil de infección canina en una provincia endémica para la Enfermedad de Chagas, se utilizó la infraestructura de una estación

experimental piloto asentada en el Hospital Regional de la Ciudad de Termas del Departamento de Río Hondo. Allí se desarrolló un programa modelo de interrupción de la transmisión del T.cruzi al hombre y a los animales domésticos con participación comunitaria, que tuvo una duración de cinco años. Financiado con fondos del TDR/OMS y con el apoyo del Ministerio de Salud, fué llevado a cabo por investigadores del INDIECH y del Servicio Nacional de Chagas de la provincia de Córdoba.

La gran extensión del área donde 600 viviendas adscriptas al plan estaban asentadas imposibilitó el estudio de la población canina en su totalidad. Se seleccionaron y se estudiaron todas las viviendas con canes del área bajo programa que mostraron resultados positivos en la evaluación entomológica previa al rociado.

En nuestro país, las prevalencias de infección en canes de Santiago del Estero, Córdoba, Chaco, Jujuy y Salta, entre otras, mostraron respectivamente prevalencias de infección por serología del 67% (146), 68% (144), 17% (149), 25% (206) y 38% (207). El período en el cual estos estudios seroepidemiológicos en canes se han llevado a cabo y la metodología utilizada tienen una influencia relevante sobre el valor de la información en relación a la importancia de la infección humana y del potencial de transmisión del T.cruzi.

En este trabajo, las prevalencias de infección y morbilidad de los perros se calcularon respecto de las viviendas infestadas con triatominos, que correspondieron al 97% de las totales de la Zona. Bajo el supuesto teórico de baja transmisión de T.cruzi a perros de viviendas no infestadas, las respectivas prevalencias de infección de canes de caseríos infestados o no, serían menores a las obtenidas en este estudio. Sin embargo, el bajo número de

viviendas excluidas permite desestimar esta diferencia.

La pirámide de la población canina en estudio, mostró que una elevada mortalidad se produce en animales jóvenes entre los 2 y 4 años, coincidentemente con lo observado en otras áreas endémicas del norte argentino (202).

Dietas desbalanceadas, hipoproteicas e hipocalóricas, presencia de ecto y endoparásitos caninos y ambiente climático adverso, se asocian con la disminución del 32% en el número de canes entre el primero y segundo año, más acentuada en los del área rural, deficiente en recursos sanitarios y económicos.

El 61% de los canes de la Zona mostró un estado general aceptable. Se consideraron las características del pelaje, la dentición, el desarrollo de masas musculares, la estimación del peso y el nivel de hidratación. Si el 32% de los perros de la Zona no alcanza a cumplir el primer año de vida, y los mayores presentan estado satisfactorio en su mayoría, el ambiente podría ser particularmente adverso para los más pequeños, que se adaptan si sobreviven al primer año.

Estudios seriados de peso y talla de los animales, y evaluación de ingesta calórica para estimar estado nutricional hubieran sido necesarios. Su asociación con la infección canina por I.cruzi requiere metodología apropiada y se aleja del objetivo de este estudio.

La ausencia de métodos apropiados para estimar la edad de canes adultos condiciona a inferirla por la información familiar y provoca un sesgo en la edad de los mayores por las dificultades para determinarla con exactitud. Sin embargo, la distribución de frecuencias caninas en la Zona coincidió con la pirámide poblacional de canes rurales de esa provincia (202,145) y

confirmó la veracidad de la información.

El alto número de machos por hembra (2.6:1) estuvo asociado al control ejercido por los pobladores sobre las crías de sexo femenino. La subárea periurbana mostró una relación de 1.7:1 machos por hembra, intermedia entre las registradas en centros urbanos (208) y las obtenidas en el resto de la Zona de estudio, ya que las ciudades muestran una distribución canina de sexos cercana al 50% (208) donde se ejercen diferentes formas de control poblacional (esterilización, confinamiento, etc). Las relaciones entre sexos para poblaciones caninas de ésta y otras localidades rurales, 3.5:1 en Santiago del Estero (202), son similares y podrían sugerir análogos mecanismos de selección, los que instrumentados en áreas con otras condiciones ecológicas y ambientales conducen a resultados similares. Las diferencias observadas entre la pirámide poblacional de machos y hembras estuvieron relacionadas con una marcada disminución del número de machos en los primeros intervalos de edad, coincidentes con los resultados experimentales asociados a la mayor susceptibilidad de los machos a las infecciones (209).

El estrecho contacto entre humanos y perros de la zona y la proximidad física entre ambos, durante el trabajo y en horas de descanso, obliga a considerar la influencia de los canes en el desarrollo de las poblaciones de vectores del domicilio y del peridomicilio. En este trabajo se estudió el efecto que toda la población canina ejerce sobre los vectores, en ella se incluyeron los perros cabreros, aunque por su función, inciden solamente sobre las del peridomicilio, sin embargo sólo el 5.5% de los perros estuvieron relacionados a los corrales, y de ellos el 13.3% estaba infectado con T.cruzi.

La influencia de las características estructurales de las viviendas rurales en la dinámica de transmisión del T.cruzi al hombre, se evaluó en éste y otros estudios mediante las prevalencias de infección de humanos en viviendas revocadas y no revocadas (83,84), los niveles de infestación por vectores triatominos (82, 210, Result. CapIII) y la proporción de vectores infectados con T.cruzi (119, Result. Cap III).

La tipificación de las viviendas se basó en la procedencia de los materiales estructurales, sin evaluar su utilidad ni las características de construcción de las viviendas. Todas las que presentaron mezcla de materiales autóctonos y comerciales en cualquier proporción fueron incluidas en la categoría de mixta, y por ese motivo la Zona presentó un 55% de viviendas mixtas y un 14% y 23% de ranchos y de material respectivamente. De las mixtas el 34% tenía techo de chapa, y el resto de enramada, sin embargo no se observaron diferencias entre prevalencias de infección de canes habitantes de ambas.

Posteriores estudios requerirían ahondar en las diferencias asociadas a mejoramiento en techos, paredes o pisos, tipo de material comercial empleado y la influencia de las mejoras en las prevalencias de infección a mediano y largo plazo como fué sugerido (84). En este trabajo, la mayor proporción de animales parasitémicos se encontró entre los que habitaban viviendas mixtas. Esta proporción se mantuvo cuando se analizaron los resultados en referencia a las viviendas con perros parasitémicos. Una posible interpretación sería la habitual presencia de ladrillos apilados en las proximidades de los dormitorios de viviendas en vías de transformación y que favorecerían la cría de triatominos, ya que es reconocida la

relación entre el número de vectores y la infección por T.cruzi en pobladores rurales (210,211).

En Costa Rica, la presencia de leñas en las proximidades de las casas, fué reconocida como un importante factor de riesgo para el refugio y entrada de los vectores a los domicilios (212). El révoque parcial de paredes mostró niveles de reinfestación similares a los originales (84) e indica que transformaciones estructurales parciales no influyen los niveles de infestación. Sin embargo no se observaron diferencias significativas en el número promedio de vectores para los distintos tipos de vivienda.

Las viviendas mixtas de este trabajo o pertenecen siempre a la clasificación de viviendas mejoradas, sino de viviendas construidas con determinados materiales, la mayoría de las veces combinados de manera desorganizada. Un ejemplo de ello lo constituye el uso de ladrillos huecos no revocados combinados con techo de enramada o paredes de enramada combinadas con techo o chapa de cinc.

La presencia de grietas en viviendas mixtas permite suponer una sensibilidad similar a la registrada en ranchos. En viviendas de material, la presencia de paredes lisas y techo de chapa o cemento permite encontrar los insectos con mayor facilidad, aumentando por lo tanto la sensibilidad del método.

Por las características de los materiales empleados, escasez de grietas, techos lisos y pisos de material las viviendas de productos comerciales mostraron los más bajos porcentajes de infección por T.cruzi en vectores (13%), el más bajo número de casas con perros parasitémicos (19%) y las más bajas prevalencias de infección en canes (12%) respecto de los de viviendas mixtas.

Los perros jóvenes de 0-2 años presentaron parasitemia y serología concordantes en su mayoría, y en perros mayores de 4 años de edad uno de cada dos era ^{reactivos} parasitémico. El escaso número de animales mayores de 12 años (2.6%) mostraron ^{como} en los jóvenes una elevada correlación entre parasitemia y serología. La extrapolación de estos datos a una cinética de la infección en la vida del perro sugeriría que el sistema inmune juega un rol preponderante en el control de la infección. Además, el comienzo de esta cinética parece coincidir con el momento de generación de nuevos casos en las poblaciones humanas (164), ya que perros y pobladores se infectan en la etapa juvenil.

Los perros menores de un año mostraron prevalencias de infección del 12%, y la evaluación entomológica realizada simultáneamente a la toma de muestras registró ausencia de vectores en sus domicilios y en muy bajo número en el peridomicilio de cuatro de ellos. La posibilidad que estos animales se hayan infectado por vía perinatal está latente, sin embargo se requerirían estudios sistemáticos para evaluar la descendencia de las hembras en edad reproductiva e infectadas con T.cruzi habitantes de esas viviendas, con el objeto de estudiar la influencia de esta vía de transmisión.

El 22.5% de los perros infectados y el 6.7% de los no infectados mayores de 2 años presentaron alteraciones ECG de variado grado de compatibilidad con lo observado en humanos. Las diferencias registradas entre ellos sugieren alguna participación de la infección en la presencia de las alteraciones. Seguimientos ECG de los canes infectados con alteraciones clínicas, test de Ajmalina y estudios **post-mortem** permitirían evaluar la influencia del T.cruzi en estos procesos patológicos,

y determinar el grado de asociación entre las manifestaciones eléctricas en los pacientes y en este reservorio.

El área rural mostró características propias que lo diferenciaron del resto de la Zona, las mayores prevalencias de infección por xenodiagnóstico en canes, la más marcada disminución en el número de perros de 1-2 años respecto de los menores de un año, el área con la menor proporción de viviendas habitadas por pobladores migrantes y con los más altos porcentajes de vinchucas domiciliarias infectadas con T.cruzi. Además, el área rural presentó solamente viviendas mixtas y ranchos, las que representan las de mayor riesgo para la transmisión de la infección. Puede suponerse que la permanencia en la vivienda del poblador sedentario y sus animales posibilita una fuente sanguínea permanente para las poblaciones domiciliarias de redúvidos. Por otra parte, la elevada mortalidad de los perros en las etapas tempranas de vida estaría asociada a desnutrición y condiciones sanitarias deficientes que incidirían sobre el sistema inmune y éste sobre el control de la infección. Las elevadas prevalencias de infección por xenodiagnóstico en canes del área rural, superiores a las registradas en las restantes subáreas contribuyen al suministro de una mayor fuente de parásitos a las poblaciones de vectores.

Las características de esta subárea son similares a otras zonas alejadas de los poblados urbanos y de baja densidad poblacional, las cuales respecto de sus características de infección podrían asemejarse a la dinámica de esta enfermedad en toda la provincia.

RESULTADOS

CAPITULO IV.- EVOLUCION DE LA INFECCION NATURAL Y EXPERIMENTAL POR T.cruzi EN CANES:

7.1.- Comparación entre los perfiles parasitológicos de canes infectados en condiciones naturales y experimentales:

7.1.1.- Etapa aguda de la infección:

7.1.1.1.- Infección experimental:

En cinco de seis canes de L I se recuperó T.cruzi en la etapa aguda durante los primeros 3 mpi (Resultados. Cap I, 4.2.5). En 4 de ellos no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05\%$) respecto del número de cajas con lectura positiva, y de 19 cajas aplicadas, 16 (84%) se positivizaron en este período. El quinto animal (P I-6) mostró lecturas positivas para T.cruzi en 1/4 cajas aplicadas.

En los cuatro canes de L II se recuperó T.cruzi antes de los 3 mpi. No se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05\%$) en el perfil parasitológico de tres animales del L II (PII-2, PII-3, PII-4). En el restante (PII-1) 4/11 (36%) cajas fueron positivas. No se registraron diferencias ($P \geq 0.05\%$) entre las medias del número de cajas positivas respecto de las aplicadas a los 4 animales, tal que el 77% (34/44) de las cajas mostraron lectura positiva para T.cruzi. No se registraron diferencias significativas ($p=0.05\%$) en el número de cajas positivas de 5 canes de L I y 3 de L II (84% y 91% respectivamente) todos inoculados con CA-I. En la etapa aguda de la infección se aplicaron 63 cajas y en el 79% se detectó T.cruzi.

7.1.1.2.- Infección natural. Comparación con el perfil parasitológico de la infección experimental:

Un total de 6 canes de Termas, menores de ocho meses estaban infectados en el momento del estudio. Cinco eran parasitémicos y uno no, y de 10 cajas aplicadas a éstos, en 8 (80%) se detectó T.cruzi. No se registraron diferencias significativas ($P \geq 0.05\%$) entre los porcentajes de cajas positivas (79%) de canes agudos infectados en el laboratorio, respecto de los agudos de campo (80%).

7.1.2.- Curso de la parasitemia en la etapa crónica de la infección:

7.1.2.1: Infección experimental:

Desde el segundo año de la infección experimental se aplicaron 8, 4, 11 y 17 cajas a los 4 perros de L II, P II-1, P II-2, P II-3 y P II-4 respectivamente, de los cuales el 50%, 75%, 27% y 59% de las lecturas fueron positivas para T.cruzi. No se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05\%$) entre los porcentajes correspondientes a P II-2, P II-3 y P II-4, y de 48 cajas aplicadas, 44 (92%) fueron positivas para T.cruzi.

7.1.2.2. Infección natural. Comparación con los resultados de la infección experimental:

Nueve perros de área endémica infectados con T.cruzi y mayores de 7 años de edad positivizaron el 89% (16/18) de las cajas de xenodiagnóstico aplicadas.

No se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05\%$) entre los porcentajes de cajas positivas (92%) de canes crónicos infectados con la cepa CA-I respecto de los crónicos de campo (89%).

7.2.- Comparación entre los perfiles serológicos de canes infectados en condiciones naturales y experimentales mediante HAI: Evolución de los anticuerpos específicos:

7.2.1.1.- Infección experimental:

La figura 20 muestra la evolución serológica de dos canes infectados con la cepa CA-I en el laboratorio (A), y los títulos serológicos registrados en los perros de terreno de 4-8 meses de edad y en los mayores de 7 años de edad (B).

Durante los primeros 3 meses de la infección experimental, 4 controles serológicos por animal mostraron reactividad en todos los sueros. La media armónica, los títulos máximo y mínimo y el rango de los títulos serológicos fueron 288, 512-128, y 192 respectivamente para P II-1, y de 128, 64-256, y 160 respectivamente para P II-3. Durante 2 mpr 5 registros serológicos por animal fueron reactivos (no se muestra en la figura). La media armónica, los títulos máximo y mínimo y el rango fueron 256, 128-512 y 320 respectivamente para P II-1 y 150, 64-256 y 160 respectivamente para P II-3.

7.2.1.2.- Infección natural. Comparación con los resultados de la infección experimental:

Cinco animales menores de 8 meses infectados con T.cruzi en área endémica mostraron una media armónica de 986, título máximo de 8096 y mínimo de 64, y el rango = 2016.

Ocho canes de área endémica infectados con T.cruzi y mayores de 7 años presentaron una media armónica de 562, un título

máximo de 2048, mínimo de 32 y rango = 1008.

En el 80% y 100% de los perros agudos y crónicos de campo respectivamente, la serología fué reactiva para dos más reacciones empleadas y respecto de los títulos serológicos, no se registraron diferencias en la media armónica ni en los títulos máximos entre canes agudos de ambos grupos. Sin embargo, en los crónicos de terreno fué manifiesta la tendencia a presentar más elevados títulos que los restantes, no así el perfil parasitológico de la infección, que fué el mismo para perros natural y experimentalmente infectados, tanto en la etapa aguda como en cronicidad.

7.3.- Comparación entre prevalencias de morbilidad de canes infectados en el laboratorio y en terreno. Estudio de la Proporción Atribuible (PA) a la infección por T.cruzi en las alteraciones ECG:

La Tabla XXXVIII muestra las prevalencias de alteraciones ECG en los infectados en el laboratorio, con ambas cepas: bloqueo sino auricular de 2º grado y trastornos primarios de la repolarización ventricular, y en los infectados en terreno: bloqueo completo de rama derecha y hemibloqueo anterior izquierdo. Extrasístoles ventriculares, isquemia e injuria cardíaca e inversión de la onda T estuvieron presentes en canes natural y experimentalmente infectados.

La PA a la infección natural y experimental para las distintas alteraciones osciló entre el valor máximo ± 1.0 asociada a la presencia de estímulos sinusales bloqueados, alteración del marcapaso auricular, extrasístoles ventriculares, hemibloqueo anterior izquierdo y bloqueo completo de rama derecha. Una

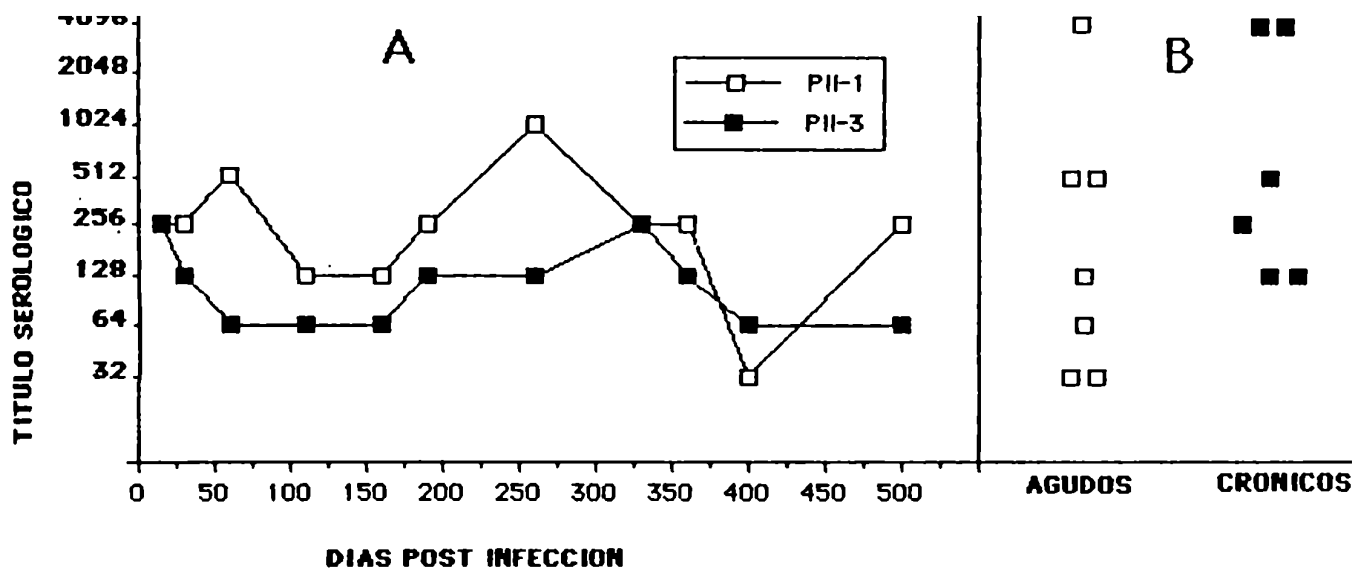


Fig. 20.- Estudios serológicos por hemaglutinación indirecta (HAI) en perros infectados con T. cruzi.

- A: Evolución serológica de dos canes infectados con la cepa CA-I de T. cruzi (P II-1 y P II-3) hasta los 500 días post infección.
- B: Títulos serológicos detectados en canes de terreno menores de 8 meses de edad (agudos) y en los mayores de 7 años de edad (crónicos).

Los resultados del seguimiento ECG de los pobladores de la Zona mostraron concordancia con nuestros resultados. La PA a la infección para hemibloqueo anterior izquierdo, bloqueo completo de rama derecha, extrasístoles ventriculares y bradicardia sinusal fué positiva y con fuerte asociación con la infección en los dos últimos, ya sea en pobladores como en perros rurales.

Los elevados valores de signo positivo de PA en canes de terreno y del laboratorio estuvieron relacionados con el bajo número de animales estudiados por ECG (n=85), de los cuales 31 mostraron alteraciones ECG comunes con los pobladores, 27 y 4 serológicamente reactivos y no reactivos respectivamente (Tabla XXXIX).

TABLA XXXVIII

Prevalencias de morbilidad y Proporción Atribuible a la infección para alteraciones ECG detectadas en 21 canes de infectados con CA-I y Tulahuén de T. cruzi y en 85 del Área endémica de Termas.

Alteraciones ECG	Infección experimental						Infección Natural		
	CA-I			Tul			Termas		
	I1	I0	PA	I1	I0	PA	I1	I0	PA
	Inf	Cont		Inf	Cont		Inf	No inf	
Arritmia sinusal	0.07	0.1	-0.43	0	0	-	0.58	0.40	+0.31
BS	0.30	0	+1.0	0	0	-	0.06	0.05	+0.16
BCRD	0	0	-	0	0	-	0.06	0	+1.0
HBAI	0	0	-	0	0	-	0.11	0	+1.0
BSA (2º grado)	0.30	0.1	+0.33	0	0	-	0	0	-
EY	0.10	0	+1.0	0.09	0	+1.0	0.02	0	+1.0
Isquemia e Injuria	0.20	0	+1.0	0	0	-	0.025	0.022	0.12
AMA	0.20	0	+1.0	0	0	-	0	0	-
ARV	0.30	0.10	+0.66	0.27	0	+1.0	0	0	-
Inversión de onda T	0.10	0.10	0	0.09	0	+1.0	0.20	0	+1.0
Estímulos sinusales bloqueados	0.10	0	+1.0	0	0	-	0	0	-

I1= prevalencias para una alteración ECG entre los expuestos.

I0= prevalencias para una alteración ECG entre los no expuestos.

PA= Proporción Atribuible a una dada alteración = $\frac{I_1 - I_0}{I_1}$

BSA (2º grado)= bloqueo sino-auricular de segundo grado.

BCRD=bloqueo completo de rama derecha. AMA= Alt. marcapaso auric.

HBAI= hemibloqueo anterior izquierdo. EV= extrasístoles ventric.

BS= bradicardia sinusal. ARV= alteración de la repolariz. ventric.

TABLA XXXIX

Comparación entre la Proporción Atribuible a la infección por T.cruzi en seis alteraciones ECG observadas en pobladores y perros de la Zona de estudio.

Alterec. ECG	INFECCION NATURAL									INFECCION EXPERIMENTAL					
	HUMANOS					PERROS				PERROS					
	NR		R			NR		R		NR		R			
n	%	n	%	PA	n	%	n	%	PA	n	%	n	%	PA	
ARV	44	33.6	32	28.3	-0.12	0	-	0	-	-	1	16.6	1	33.0	+0.51
HBAI	18	12.9	22	19.5	0.33	0	-	1	11	+1.0	0	-	0	-	-
BCRD	4	2.9	4	3.5	0.19	0	-	1	6.6	+1.0	0	-	0	-	-
BS	7	5.0	9	8.0	0.37	1	5.5	1	6.6	+0.16	0	-	10	3.0	+1.0
EY	2	1.4	5	4.4	0.67	0	-	40	2.5	+1.0	0	-	21	2.0	+1.0
ZEI	1	0.7	0	0	0	40	2.5	45	2.2	+0.12	0	-	10	20	+1.0

I₁= prevalencias para una alteración ECG entre los expuestos.
 I₀= prevalencias para una alteración ECG entre los no expuestos.
 PA= Proporción Atribuible a una dada alteración= $\frac{I_1 - I_0}{I_0}$

ARV= Alteración de la repolarización ventricular.
 HBAI= Hemibloqueo anterior izquierdo.
 BCRD= Bloqueo completo de rama derecha.
 EV = Extrasístoles ventriculares.
 ZEI = Zona electricamente inactiva.

DISCUSION DEL CAPITULO IV Y DISCUSION FINAL

En base a los resultados parasitológicos y clínicos de la infección experimental y natural canina por T.cruzi se comparó el curso de la infección en ambos grupos durante las etapas aguda y crónica de la infección.

En los canes infectados en el laboratorio, la etapa aguda incluyó los primeros tres meses de la infección y en los naturalmente infectados se consideraron todos los infectados menores de 8 meses de edad, probadamente agudos por la escasa duración de la infección. Animales experimentalmente infectados fueron incluidos en la categoría de crónicos desde el segundo año de infección. Los perros infectados en terreno y de 8-20 años de edad eran crónicos, ya que el 88% de los canes, fueran machos o hembras, se infectaron antes de cumplir los 8 años (Result. Cap III,6.3.2). La información obtenida de canes naturalmente infectados de 1-7 años fué desestimada.

Los animales del laboratorio mostraron reactividad serológica sostenida desde las etapas más tempranas de la infección, y coincidentes con los resultados de los canes naturalmente infectados, ya sean agudos de edades comprendidas entre 0 y 7 meses como crónicos de más de 8 años de edad. Este carácter refleja la persistencia de los anticuerpos específicos anti T.cruzi sostenida aún en animales seniles. Respecto de los títulos serológicos, no se registraron diferencias significativas entre ambos grupos.

En los animales de terreno, las alteraciones ECG mostraron mayor compatibilidad con las detectadas en los pobladores de esa misma zona que con las de canes del laboratorio y confirmada por

los similares resultados en la Proporción Atribuible a la infección para seis alteraciones específicas comunes.

El porcentaje de ECG registradas en los perros infectados con T.cruzi en campo fueron similares a los de pobladores mayores de 15 años habitantes de la Zona. Se requerirían seguimientos ECG sistemáticos de los pobladores y sus perros para evaluar la evolución de la morbilidad. A pesar de la escasa sintomatología clínica registrada en perros infectados con T.cruzi habitantes de la periferia de Resistencia (149), nuestros hallazgos en campo alientan a investigar signos y manifestaciones de enfermedad en canes de esta área. Resulta llamativo que estos autores presentaran en 1985 prevalencias de infección del 17% en canes de las cercanías de Resistencia cuando en 1981 y 1985 se registraron prevalencias de infección del 30% y del 26% en hombres jóvenes habitantes de esa provincia endémica respectivamente (3), SEGURA E.L. 1991, comunicación personal).

La comparación entre el curso de la infección natural y experimental permitió reactualizar la validez del modelo experimental canino desarrollado en este trabajo y concluir que el curso parasitológico y serológico de los experimentales se correlaciona con el correspondiente de terreno.

Este trabajo proporcionó el basamento metodológico para reafirmar la utilidad de este modelo experimental en sus formas aguda y crónica indeterminada y permitió caracterizar la infección natural canina mediante la estandarización de parámetros metodológicos, con el objeto de emplearlos como modelos de la infección natural en el ensayo de drogas parasiticidas, vacunas experimentales y evaluar la alteración de parámetros de infección en animales sujetos a diferentes condiciones nutricionales.

CONCLUSIONES

1.- Las vías de inoculación intraperitoneal y conjuntival de T.cruzi fueron igualmente efectivas para la infección de los canes con cepas de diferente grado de virulencia, y el perfil parasitológico-serológico fué similar para animales inoculados con diferentes vías.

2.- El curso de la etapa aguda tuvo una duración de tres meses, con parasitemia detectada por observación directa y sintomatología clínica caracterizada por fiebre, poliadenitis y compromiso neurológico de intensidad variable.

3.- La infección experimental por T.cruzi indujo un perfil parasitológico y serológico sostenido desde la inoculación y durante los siguientes cuatro años.

4.- En infecciones caninas experimentales de larga duración (cinco años o más) y sin aplicación de reinoculación alguna, no se detectó T.cruzi en sangre periférica por métodos directos ni indirectos, y la serología fué discordante.

5.- Las reinoculaciones con la misma cepa efectuadas en la etapa crónica temprana de la infección no modificaron el perfil parasitológico-serológico ni indujeron alteraciones clínicas. Las reinoculaciones realizadas en etapas tardías de la cronicidad provocaron una reagudización de la infección con elevada mortalidad y parasitemia.

6.- Las alteraciones ECG se registraron durante la etapa aguda de

la infección experimental, y en cronicidad desde los 7 mpi. De carácter transitorio o permanente, mostraron un grado variable de intensidad y fueron compatibles en algunos casos con las que se presentan en pacientes afectados de una miocardiopatía chagásica crónica.

7.- Infiltrados inflamatorios linfoplasmocitarios rodeando abundantes nidos de amastigotes, con edema y necrosis de fibras miocárdicas caracterizaron miocarditis agudas típicas de esa fase de la infección. En la etapa crónica se observó una miocarditis crónica focal en actividad con abundante edema, disociación de fibras miocárdicas sin nidos de amastigotes y fibrosis de aparición aislada.

8.- El perfil parasitológico-serológico de los animales infectados en el laboratorio mostró las mismas características que en los naturalmente infectados en una provincia endémica, ya fueran infectados con una cepa de T.cruzi de bajo o de elevado grado de virulencia.

9.- En cronicidad se detectaron títulos serológicos no diferenciables significativamente en los canes de terreno respecto de los infectados en el laboratorio.

10.- Las alteraciones ECG registradas en los canes de terreno mostraron mayor similitud a lo observado en pobladores rurales de esa y otras regiones endémicas de Argentina que a los infectados en el laboratorio, los que mostraron alteraciones de carácter transitorio en la mayoría de los casos, poco asociados a los patognomónicos para la infección chagásica humana.

RESUMEN

Con el propósito de caracterizar el curso de la infección experimental canina se infectaron 4 lotes de perros mestizos, dos con la cepa Argentina I de T.cruzi, y otros dos con la cepa Tuluahuén de T.cruzi, altamente virulenta y que provoca elevados niveles de parasitemia en ratones endo y exocriados.

Para descartar animales naturalmente infectados durante la selección de los perros candidatos y realizar el seguimiento post infección, se normatizaron cinco reacciones serológicas de humanos (Fijación de complemento, aglutinación directa, hemaglutinación indirecta, ELISA e inmunofluorescencia indirecta) a sueros caninos.

En el laboratorio, inóculos con CA-I se aplicaron en el primer lote por las vías intraperitoneal y conjuntival para evaluar su efectividad y en el segundo por vía intraperitoneal para realizar un seguimiento parasitológico, serológico y clínico durante dos años, con posterior estudio histopatológico. Los dos lotes infectados con la cepa Tuluahuén recibieron dosis altas y moderadas por vía intraperitoneal. En los inoculados con dosis más bajas se caracterizó la etapa aguda de la infección desde el punto de vista parasitológico, serológico y clínico. Los sobrevivientes a elevados inóculos fueron estudiados serológica, parasitológica y clínicamente durante un lapso no menor de 5 años. A los 5-9 años de la infección fueron reinoculados con similar dosis e igual cepa para evaluar su modo de respuesta a la infección, previa y posteriormente a ese segundo inóculo.

En área endémica se determinaron los parámetros básicos de una población canina mediante el estudio de 340 perros de un área rural de la provincia de Santiago del Estero, cercana a la ciudad

turística de Termas. Se evaluó el perfil de infección por T.cruzi en estos animales y la influencia de la distancia a la ciudad sobre las prevalencias de infección y morbilidad de este reservorio doméstico. Con este propósito se dividió la zona en 3 subáreas, periurbana, intermedia y rural, las que mostraron diferencias ambientales y urbanísticas asociadas a la distancia a la ciudad.

Durante la infección experimental se comprobó que ambas vías ensayadas fueron igualmente efectivas, y se seleccionó la intraperitoneal para inocular los restantes lotes. Los animales del segundo lote inoculados con CA-I mostraron parasitemia y serología reactiva sostenidas durante 2 años, sin requerir reinoculación alguna. Presentaron alteraciones ECG de variada intensidad, transitorias o persistentes hasta el sacrificio. No se modificó el perfil parasitológico, serológico y clínico de la infección con posterioridad a dos inoculaciones con dosis elevadas de la misma cepa.

En los animales inoculados con dosis bajas de la cepa Tulahuén se detectó parasitemia patente en canes entre la segunda y la cuarta semana. La detección de parasitemia por métodos indirectos persistió hasta la muerte espontánea de los animales, como consecuencia del compromiso mielo-meningo-encefalítico de variado grado de intensidad. Se caracterizó, por lo tanto, la etapa aguda de la infección experimental en base al perfil parasitológico y clínico de los animales, la cual persistió durante 3 meses según nuestras condiciones experimentales.

En los inoculados con altas dosis de la cepa Tulahuén, el 50% murió durante la etapa aguda, y los restantes mostraron un perfil parasitológico y clínico sostenido durante 4 años de infección. Entre los 5-9 años de la primo infección y previamente a la

reinoculación, los resultados parasitológicos negativos y la serología discordante sugirieron una disminución de la respuesta específica en una infección de larga duración. La reinoculación con la misma cepa favoreció la reagudización de la infección, reaparición de parasitemia, alteraciones ECG de variada intensidad y la muerte del 90% de los animales.

La sensibilidad de las reacciones serológicas fué del 78%, 86%, 96%, 100% y 100% para HAI, ELISA, IFI, FC y AD, y los títulos mínimo diagnóstico fueron 32, 0.2, 16, 1 y 128 respectivamente. AD y HAI resultaron de fácil aplicabilidad en ambientes carentes de infraestructura adecuada, aún en áreas endémicas rurales. Las restantes reacciones, de mayor grado de complejidad fueron empleadas con éxito en el INDIECH a sueros del área transportados congelados conservados en glicerina tamponada.

En terreno, la pirámide poblacional canina mostró una pendiente más pronunciada a medida que los perros pertenecían a viviendas alejadas de la ciudad de Termas.

Las prevalencias de infección por serología y xenodiagnóstico de la Zona de estudio fueron del 19% y 30% respectivamente. El 20% de los infectados y el 7.5% de los no infectados mostraron alteraciones ECG en su mayoría compatibles con la miocardiopatía chagásica crónica humana.

No se observaron diferencias en los parámetros poblacionales y de infección entre perros de las áreas periurbana e intermedia: La zona rural, distante entre 30 y 50 km de la ciudad presentó:

las más altas prevalencias de infección por xenodiagnóstico en los perros; la mayor disminución del número de animales de 1-2 años respecto de los de 0-1 año como medida indirecta de la mortalidad durante los primeros años de vida; la menor

proporción de pobladores migrantes "golondrinas", los más altos porcentajes de vinchucas infectadas con T.cruzi, la ausencia total de viviendas construidas con materiales comerciales, de los cuales se ha probado que restringen la transmisión en base a la disminución del número de huecos y grietas habituales en el adobe y la enramada.

Fué significativo el aumento de perros parasitémicos habitantes de viviendas mixtas, provistas de materiales autóctonos y comerciales respecto de los ranchos, tal que el apilamiento de materiales de construcción en viviendas en vías de transformación fomentaría los escondites de los vectores.

Prevalencias de infección por serología y xenodiagnóstico fueron del 19% y 30% respectivamente. El 20% de los infectados y el 7.5% de los no infectados mostraron alteraciones ECG en su mayoría compatibles con la miocardiopatía chagásica crónica humana.

Por comparación entre los perfiles de infección por serología y parasitemia, de alteraciones ECG de perros infectados en condiciones naturales y experimentales se corroboró:

1.- el mismo patrón parasitológico durante la infección aguda y crónica en canes de laboratorio y terreno, se registraron: bradicardia sinusal, extrasístoles ventriculares, isquemia e injuria cardíaca e inversión de la onda T en perros infectados en el laboratorio y en terreno. Otras alteraciones ECG fueron específicas de cada grupo. La proporción atribuible a la infección por T.cruzi para cada alteración ECG fué empleada como índice de correlación entre alteraciones e infección. Bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior izquierdo, extrasístoles ventriculares, alteraciones del marcapaso auricular y estímulos

sinusales bloqueados mostraron asociación positiva máxima. Arritmia sinusal, bradicardia sinusal, isquemia e injuria cardíaca, trastornos primarios de la repolarización ventricular e inversión de la onda T presentaron una asociación positiva menor.

Este trabajo constató la utilidad del modelo canino desde el punto de vista parasitológico y serológico para ensayos con quimio e inmunoterapia, estudios individuales de la cinética de los anticuerpos específicos, y aplicación del modelo para estudios fisiológicos de alta complejidad quirúrgica, como trasplantes cardíacos y renales, perfusión de órganos infectados, trasplantes de tejidos infectados a receptores sanos, y electrofisiología, entre otros. Probó que la infección experimental induce alteraciones ECG de carácter inespecífico en mayoría y que la histopatología es típica de las etapas clínicas aguda y crónica indeterminada de la infección al hombre. La estandarización de las variables poblacionales y de infección de canes naturalmente infectados permite su empleo como modelo de infección natural, donde las variables ambientales, nutricionales y sanitarias pueden evaluarse a partir de sus controles.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Comitee on the control of Chagas Disease. Buenos Aires, 16-18 October 1989.
- 2.- PEREIRA BARRETTO M. 1979. Epidemiología. En: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan. Cap.3.pp 89-.
- 3.-SEGURA E.L., PEREZ A., YANOVSKY J.F., ANDRÁDE J. y MARTINI G.W.de.1986. Disminución en la prevalencia de infección por T.cruzi (Enfermedad de Chagas) en hombres jóvenes de la Argentina. Bol. Of. Sanit. Panam. 100 (5): 493-509.
- 4.- PEREIRA BARRETTO M. 1975. Possible role of wild mammals and triatomines in the transmission of T.cruzi to man. In New Approaches in American Trypanosomiasis Research. FAHO. Nº 318. pp 307-.
- 5.- ROTHHAMMER F. 1985. Chagas disease in Chilean Mummies. Parasitology Today I (1):3.
- 6.- DIAS J.C.P. 1989. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert committee on the control of Chagas disease. Buenos Aires, 16-21 october 1989.
- 7.- CHAGAS C.1911. Molestia de Carlos Chagas ou tireoidite parasitaria. Nova doença humana transmitida pelo "barbeiro" (Conorhinus megistus). Segunda Conferencia na Academia Nacional de Medicina.Tipogr. Leuzinger (Rio de Janeiro):28.
- 8.-CHAGAS C. 1923. La Trypanosomiase Américaine. Etude du parasite et de son insectae intermediaire: 3-19. Cohetânea de Trabalhos Científicos Edit. Universidade de Brasilia
- 9.- HOARE C.A. 1972. The trypanosomes of mammals. En " A zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications. Ed.(Oxford-Edimburgh): 62.
- 10.- SOUZA W. de and SOUTO-PADRON T. 1980. The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae. J. Parasitol. 66 (2): 229-135.
- 11.- SOUZA W. de. CARVALHO T.U. de and BENCHIMOL M. 1978. Trypanosoma cruzi: Ultraestructural, Cytochemical and Freeze-Fracture Studies of Protein Uptake. Experimental Parasitology 45: 101-115.

12.- TIBAYNENC M. 1985. On the microdistribution and sexuality of T.cruzi. Trans. Roy. Soc.Trop. Med. Hyg. 79: 882.

13.- DIAS E. 1934. Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Osw. Cruz, 28 :1-110.

14.- BRACK C. 1968. Electronmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von T.cruzi Under besonderer berücksichtigungsformen un Ubertrager Rhodnius prolixus. Acta Tróp.25: 298.

15.- BRENER Z. 1972. Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas. Soc. Arg. Parasitol. Taxonomia e ciclo evolutivo do T.cruzi.

16.- GONZALEZ CAPP A.E.M., KATZIN A.M., ARASCO N. & LAJMANOVICH S. 1981. Comparatives studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains of T.cruzi. Medicina (Buenos Aires) 41: 549-555.

17.- PINTO DIAS J.C. 1979.Mecanismos de transmissao. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Guanabara Koogan. Cap.4. pp.152-.

18.- POSTAN M., DVORAK J.A. and MC DANIEL J.F. 1983. Studies on T.cruzi clones in inbred mice. I. Comparisson of the course of infection of C3H/HEN mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32 (3): 497-506.

19.- SOUSA M.A. de and ALENCAR A.A. 1984. On the tisular parasitism of T.cruzi Y strain in Swiss mice. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 26 (6): 316-321.

20.- CHIA-TUNG PAN,S. 1978. Trypanosoma cruzi: Ultraestructure of Morphogenesis in vitro and in vivo. Exp. Parasitol.46: 42-107.

21.- GONZALEZ CAPP A.S.M., KLOETZEL J., KATZIN A.M. and DOS SANTOS R.R. 1980. Trypanosoma cruzi: Activity of inmune sera on surface antigens. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 22 (6): 275-280.

22.- LAZZARI J.O. 1989. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert committee on the control of Chagas Disease. Buenos Aires, 16-21 october.

23.- ARGUMOSA J.A. Medicina Neotropical. Trypanosomiasis Americana. Lab.Beherens Editores. Apart.62. Caracas. Venezuela.

- 24.- RASSI A. 1979. Clínica: Fase aguda. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Guanabara Koogan. Cap.7. Clínica: Fase Aguda. pp 249-.
- 25.- SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE ENFERMEDAD DE CHAGAS. 1972. Soc. Arg. Parasitol. Buenos Aires. Dic. 1972.
- 26.- ANDRADE Z.A. e ANDRADE S. 1979. Patología. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Guanabara Koogan. Cap. 6. pp. 199-.
- 27.- FACTOR S., CHO S., WITTNER M. & TANDWITZ H. 1986. Abnormalities of the coronary microcirculation in acute murine Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34 (2): 246-253.
- 28.- SAID G., JOSKOWICZ M., BARREIRA A.A., EISEN H. 1985. Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. Ann. Neurol. 18: 676-682.
- 29.- SCHMURIZ G.A. 1987. Autoimmunity in Chagas' Disease. Mem. Inst. O. Cruz. Rio de Janeiro. Suppl. 82: 287-301.
- 30.- ROMANA C. 1963. Enfermedad de Chagas. Lopez Libreros Editores. Cap. 3: 64.
- 31.- POSSE R.A., MOUZO G. y BARRIO N. 1981. Aspectos epidemiológicos de la Enfermedad de Chagas-Mazza en la República Argentina. En: Enfermedad de Chagas. Centro Nacional de Arritmias Cardíacas. Hosp. Prof. Dr. Mariano R. Castex. Ministerio de Salud. Buenos Aires. Argentina.
- 32.- MARCONDES DE REZENDE J. 1979. Clínica: Manifestações digestivas. In: Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Guanabara Koogan. Cap. 9. pp. 312-.
- 33.- ANDRADE S.G. 1978. Possibilidade de incorporação de proteínas do hospedeiro pelo T. cruzi. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 20 (5): 279-284.
- 34.- ROIT I.M BROSTOFF J. & MALE D.K. 1985. IMMUNOLOGY. Churchill Livingstone. Edimburgh. London. Melbourne. New York. Cap. 17.
- 35.- BRENER Z. 1980. Immunity to T. cruzi. Adv. Parasitol. 18: 247-292.

36.- MARSDEN P.D. and HAGSTROM J.W.C. 1968. Experimental T.cruzi infection in Beagle puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation on the course of the infectio. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62 (6): 816-824.

37.- RIARTE A.R., SINAGRA A.J. LAURICELLA. M.A., BOLOMO N., MORENO M., COSSIO P. & SEGURA E.L. Chronic experimental infection by T.cruzi in Cebus apella. Enviado a la Revista Acta Trópica para su publicación.

38.- TEIXEIRA A.R.L. 1984. Animal model of the human disease. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Meeting on Animal Model Schedule. 23 July.

39.- UNDP/WORLD BANK/WHO. 1984. Special programme for Research and Training in Tropical Diseases. TDR/IMMCHA-AMOD/8.3. Geneva.

40.- ABRAMO ORREGO L., LANSETTI J.C., BOZZINI J.P., DE MARTINI G.G. W. 1980. Hemocultivo como método de diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires) 40, Suppl. 1: 56-62.

41.- CERISOLA J.A., RHOWEDDER R., SEGURA E.L. DEL PRADO C.E. ALVAREZ M and MARTINI G.W. 1974. El xenodiagnóstico: Normalización-utilidad. Premio Geigy 1974. Publicación del Ministerio de Bienestar Social, Secretaria de Salud Pública. Buenos Aires. Argentina.

42.- GUERREIRO C., MACHADO A. 1913. Da reacção de Bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Med. 27 (23): 225.

43.- CHAGAS C. 1909. Nova trypanozomiasis humana. Mem. Inst. D. Cruz 1 (II). Carlos Chagas. Coletânea de trabalhos científicos. Ed. Universidade de Brasilia.

44.- MAGARINOS TORRES C. e TAVARES B.M. 1958. Miocardite no Macaco Cebus após Inoculações Repetidas com Schyzotrypanum cruzi. Mem. Inst.O. Cruz 56 (1): 85-118.

45.- MARSDEN P.D., SEAH S.K.K., DRAPER C.C., LE PETTITT L.E., MILES M.A., VOLLER A. 1976. Experimental T.cruzi infection in Rhesus monkeys II. The early chronic phase. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. 70 (3): 247-251.

46.- SEAH S.K.K., MARSDEN P.D., VOLLER A. and LE PETTITT L.E. 1974. Experimental Trypanosoma cruzi infection in Rhesus monkeys-The acute phase. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 68(1): 63-69.

47.- BOLOMO N., MILEI J. COSSIO P.M., SEGURA E.L. LAGUENS R.P., FERNANDEZ L.M. y ARANA R.M. 1980. Enfermedad de Chagas experimental en un primate sudamericano (*Cebus* sp). Medicina (Buenos Aires) 40 (6/1): 667-672.

48.- FALÁSCA A., GRANA D., BUCCOLO J., GILI M., MERLO A., ZOPPI J. and MARESO E. 1986. Susceptibility of the *Cebus apella* monkey to different strains of *T.cruzi* after single or repeated inoculations. PAHO Bulletin 20 (2): 117-137.

49.- MORALES M.C., CARDONI R.L., RIMOLDI M.T., ESTEVA M. & MILEI J. 1987. Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with *T.cruzi*. Medicina (Buenos Aires) 47: 493-9.

50.- CARDONI R.L., RIMOLDI M.T., ESTEVA M. & DE BRACCO M.M.E. 1986. Humoral antibody response in mice infected with *T.cruzi*. Medicina (Buenos Aires) 46: 435-439.

51.- CULBERTSON J.T., KESSLER W.R. 1942. Age resistance of mice to *T.cruzi*. J. Parasitol. 28 (2): 155-158.

52.- CABEZA MECKERT P., CHAMBO G.J.y LAGUENS R.P. 1980. Enfermedad congénita secundaria a la infección crónica del ratón con *T.cruzi*. Modelo experimental de la enfermedad de Chagas congénita. Medicina (Buenos Aires) 40 Supl.1: 40-44.

53.-LAGUENS R.P., CABEZA MECKERT P. y GELPI R.J. 1980. Enfermedad de Chagas crónico en el ratón. I. Estudios electrocardiográficos y morfológicos del corazón. Medicina (Buenos Aires) 41 (1): 35-39.

54.- CARDOSO J.E. y BRENER Z. 1980. Hematological changes in mice experimentally infected with *T.cruzi*. Mem. Inst. Osw. Cruz, Rio de Janeiro, 75 (3-4): 97-104.

55.- LAGUENS R.P., CABEZA MECKERT P., BASOMBRIO M.A., CHAMBO G., COSSIO P.M., ARANA R.M. y GELPI R.P. 1981. Infección crónica del rató con *T.cruzi*. Modelo experimental de .Enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires) 40 Supl.1: 33-39.

56.- MILEI J., MORALES M.C., BOLOMO N.J., BASOMBRIO M.A., COSSIO P.M. 1984. Correlación electrocardiográfica-anatomopatológica en la miocardiopatía chagásica crónica del ratón. Medicina (Buenos Aires) 44: 483-488.

57.- LAGUENS R.P., CABEZA MECKERT P., CHAMBO G., GELPI R.J. 1981. Chronic Chagas'disease in the mouse II. Transfer of the heart disease by means of inmunocompetent cells. Medicina (Buenos Aires) 41(1): 40-43.

- 58.- SEGURA E.L., CAMPOS J.M., BRONZINA A., CERISOLA J.A. 1975. Antigenos de las fracciones subcelulares de T.cruzi. I. Localización de antígenos y proteínas en las fracciones subcelulares. Medicina (Buenos Aires) 35: 451.
- 59.- GONZÁLEZ CAPPA S.M., BRONZINA A., KATZIN A.M., GOLFERA H., DE MARTINI G.W. & SEGURA E.L. 1980. Antigens of subcellular of T.cruzi. III. Humoral immune response and histopathology of immunized mice. J. Protozool. 27 (4): 467-471.
- 60.- TEIXEIRA A.R.L. 1984. Animal model of the human disease. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Meeting on Animal Model Schedule. 23 July 1984.
- 61.- CHAGAS LIMA E SILVA F., RIBEIRO DOS SANTOS R. & FIORILLO A.M. 1977. Aspectos da resposta imune anti-coração em coelhos. Estudo da imunidade sérica e celular. Rev. Bras. de Pesquisas Med. e Biol. 10 (2): 77-88.
- 62.- CHIARI E., TAFURI W.L., BAMBIRRA E.A., REZENDE M.M., RIBEIRO T.O., CASTRO L.P., SALGADO J.A. and AMARAL DE PADUA R.A. 1980. The rabbit as a laboratory animal for studies on Chagas' Disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 22 (4): 207-8.
- 63.- RAMIREZ L.C. y BRENER Z. 1984. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas Disease. Animal model of the human disease. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Meeting on Animal Model Schedule. 23 July.
- 64.- VILLELA E. 1924. Paralyse experimentale chez le chien pour le T.cruzi. C.R. Soc. Biol. 91 (30): 979-83.
- 65.- SOUZA CAMPOS E. de 1928. Transmissao intrauterina do T.cruzi na infeçao experimental do cão. An. Fac. Med. Univ. Sao Paulo 3: 35-39.
- 66.- JOHNSON C. 1930. Cardiac Changes in dogs experimentally infected with T.cruzi. Am. J. Trop. med. 18: 197-206.
- 67.- VILLELA E.A. 1923. Transmissao intrauterina de molestia de Chagas. Encefalite congenita pelo T.cruzi (Nota previa). Folha Médica. Ano 4. Nº6.p 41.
- 68.- SOUZA CAMPOS E. de. 1925. Sur le paralyse des animaux (Chien, souris) infectes experimentalement avec les cultures de T.cruzi. C.R. Soc. Biol. 93: 40-42.

69.- VILLELA E., DIAS E. 1934. Localização das formas de multiplicação do S.cruzi na pele e nas mucosas do cão experimentalmente infectado. Parasitismo da célula epitelial da epiderme. C. R. Soc. Biol. 117 (31): 501-504.

70.- PELLEGRINO J. 1946. O electrocardiograma na fase crónica da doença de Chagas experimental no cão. Mem. Inst. O. Cruz 44 (4): 615-633.

71.-PELLEGRINO J. 1947. O electrocardiograma na doença de Chagas experimental no cão. Brasil Médico 33,34 e 35. 9-11.

72.- GOBLE F.C.1950. Observations on experimental Chagas' disease in dogs. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 1: 189-204.

73.- TOMLINSON M.J., CHAPMAN W.L.Jr., HANSON W.L. & GOVEN A.J. 1980. The effect of irradiated T.cruzi on the pathogenesis of Chagas' disease in dogs. Rev. Inst. Med.trop. Sao Paulo 22 (5): 218-230.

74.- OKUMURA M. e CORREIA NETO A. 1961. Produção experimental de "megas" em animais inoculados com T.cruzi.Rev. Hosp. Clin:338-341.

75.- ANSELMÍ A., PIFANO F., SUAREZ A., DOMINGUEZ A., DIAZ VAZQUEZ A., y ANSELMÍ G. 1965. Experimental Schizotrypanum cruzi myocarditis. Am. Heart J. 70: 630-656.

76.- LARANJA F. 1953. Aspectos clínicos da molestia de Chagas. Rev. Bras. Med. X (7): 482-491.

77.- LARANJA F.& ANDRADE Z.A. 1980. Forma crónica cardíaca da Doença de Chagas no cão. Arq. Bras. Cardiol. 35: 377-385

78.- ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G., SADIGURSKY M., MAGUIRE J.H.1981. Experimental Chagas'disease in dogs. A pathological and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. Arch. Pathol. Lab. Med. 105: 460-464.

79.-ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G. 1980. A patologia da doença de Chagas experimental no cão. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 75 (3-4): 77-95.

80.- ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G. & SADIGURSKY M. 1984. Damage and healing in the conducting tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with T.cruzi). J. Pathol. 143: 93-101

81.- ZELEDON R.1983. Vectores de la Enfermedad de Chagas y sus características ecofisiológicas. *Interciencias.*(Caracas)8:384-395.

82.- MAYER, H.F. and ALCARAZ, I. 1955. Estudios relacionados con las fuentes alimentarias de Triatoma infestans. (Homiptera Reduviidae). *Ann. Inst. Med. Reg. Tucuman* 4:195-201.

83.- WISNIVESKY-COLLI C., RUIZ A.M., LEDESMA O., GURTNER R.E., LAURICELLA M.A., SALOMON D.O., SOLARZ N. and SEGURA E.L. 1987. Ecología doméstica de la tripanosomiasis americana. Perfil alimentario del T.infestans en un área rural de la provincia de Santiago del Estero. Argentina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 20 (1): 31-39.

84.- SCHOFIELD C.J. and MARSDEN P.D. 1982.Efecto del revoque de las paredes sobre una población doméstica de Triatoma infestans. *Bol. Of. Sanit. Panam* 93 (1) : 3-9.

85.- MARSDEN P.D., DAS VIRGENS D., CASTRO C.N., BRASIL I.P., FERREIRA R., SILVEIRA A.C., DA SILVEIRA MATOS C.A., MACEDO V. and PRATS A. 1983. The control of Chagas"disease transmission in Mambai , Goias-Brazil(1980-1981). *Rev. Soc. Bras. Med.Trop.* 16: 189-195.

86.- BARRETT T.V., HOFF R., MOTT K.E., GUEDES F. and SHERLOCK I.A. 1979.An outbreak of acute Chagas' disease in the Sao Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of Trypanosoma cruzi.*Trans. Roy. Soc. Trop. Med.& Hyg.* 73 (6): 703-709.

87.- PINTO DIAS J.C. and BORGES DIAS R.1985. Participação da comunidade no controle da Doença de Chagas. *Ann. Soc.Beige. Med. trop.* 65 Suppl. 1 : 127-135.

88.- BOMBACI L. 1974. Técnicas inmunodiagnósticas para la detección de infección de T.cruzi en un banco de sangre. *Rev. Asoc. Bioq. Arg.* 39 (211-274): 44-49.

89.- CURTO DE CASAS S.I. 1985. Problemática geográfica de la endemia chagásica y técnica para su estudio. En: *Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas . Tomo I. Epidemiología-Vectores.*Capítulo IV. pp 31. Servicio Nacional de Chagas. Ministerio de Salud y Accion Social (República Argentina). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud (O.M.S.).

90.- WISNIVESKY-COLLI C., CHUIT R., SUBIAS C., GURTNER R., SOLARZ N., BUJAS M., VEGA G., BOSIO M. y SEGURA E.L. 1984. Estudio epidemiológico de Chagas en la provincia de Jujuy (Argentina). Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. 29 oct-2 nov. Huerta Grande. Pcia de Córdoba. República Argentina. EP 9.

91.- PAULONE I., CHUIT R., PEREZ A., WISNIVESKY-COLLI C. & SEGURA E.L. 1988. Field research on an epidemiological surveillance alternative of Chagas's disease transmission: the primary health care (PHC) strategy in rural areas. Rev. Arg. Microbiol. 20 (Supl.): 103-105.

92.- DIAS J.C.P. 1974. Perspectivas para o controle da doença de Chagas humana pelo emprego domiciliar de inseticidas de ação residual. Experiências de Bambuí, M.G. Brasil. Tese. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UF MB (Belo Horizonte).

93.- MAZZA S., MONTANA A., BENITEZ C. and JANZI E.Z. 1936. Transmisión de Schizotrypanum cruzi al niño por leche de la madre con Enfermedad de Chagas. Mepra 26: 41-46. (10) .

94.- BACIGALUPO J. 1948. Enfermedad de Chagas y transfusión sanguínea. Dia. Med. 20: 425-426

95.- DIAS E. 1945. Um ensaio de profilaxia da molestia de Chagas. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. 116 p.

96.- TALICE R.V. 1947. Enfermedades parasitarias y transfusión de sangre (Sangre y derivados) "Curso de Hemoterapia". (Montevideo). p.135-144.

97.- PINTO DIAS J.C. and BRENER S. 1984. Chagas' disease and blood transfusion. Mem. Inst. Osw. Cruz, Rio de Janeiro, Suppl. Vol. 79: 139-147.

98.- PEREZ A. and SEGURA E.L. 1989. Estado de la transmisión de T. cruzi por transfusiones en Argentina. Sociedad Argentina de Protozoología .7-8 sept. INDIECH. T 3.

99.- CERISOLA J.A., ALVAREZ M., LUGONES H. y REBOSOLAN J.B. 1969. Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chileno Parasitol. 24 (1-2): 1-8.

100.- FREITAS J.L.P., AMATO V., SONNTAG R., BIANCALANA A., NUSSENZWEIG V., BARRETTO G. 1952. Primeiras verificacoes de transmissao accidental da molestia de Chagas ao homem por transfusao de sangue. Rev. Paul. Med. 40: 36-40.

101.- SÉGURA E.L., PEREZ A.C., CURA E.N. and CARLOMAGNO M.A. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1989. Expert committee on the control of Chagas Disease. Buenos Aires, 16-21 october.

102.- DAD, L. 1948. Otros casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Guarico (Venezuela). Formas agudas y crónicas. Observación sobre Enfermedad de Chagas congénita. Rev. Pol. Caracas. 17 : 17-32.

103.- NATHAN-LARRIER, L. 1921. Heredite des infections experimentales a Schizotypanum cruzi. Bull. Soc. Path. Exot. 14: 232-238.

104.- ROCHA LIMA. Cit. Margarino Torres 1923. Folha Medica. Ano 4. N 4.

105.- GUILLERON C., GORODNER J.O., PAEZA E. y ALONSO J.M. 1981. Características de la infección chagásica en gestantes y recién nacidos de la localidad de Castelli (Chaco, Argentina). boletín Instituto de Patología Regional. Universidad Nacional del Nordeste IV: 35-36.

106.- MOYA P., BAROUSSE A.P. 1984. Enfermedad de Chagas congénita. Aportes del Programa Nacional de Investigación en Enfermedades Endémicas. 1977-1983. Ministerio de Educación y Justicia. Secretaría de Ciencia y Técnica: 51.

107.- BITTENCOURT A.L. 1975. Aspectos anátomo-patológicos da pele na enfermidade de Chagas congénita. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 17: 135-139.

108.- AZOGUE E., LA FUENTE C. & DARRAS CH. 1985. Congenital Chagas' disease in Bolivia: Epidemiological aspects and pathological findings. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg. 79: 176-180.

109.- ZUNA H., RECACOCHECHA M., BERMUDEZ H., DE MUYNCH A. y CARDOSO L. 1979. Infección chagásica en trabajadores agrícolas temporales y sus familias. Proyecto ABAPQ-IZOZOG. Bol. Inform. GENETROP 5, 16-21.

110.- MAYER H.E. 1961. Infección experimental con T.cruzi por vía digestiva. Ann. Inst. Medic. Regional 5 (3): 43-48.

111.- DIAZ UNGRIA, C. 1968. Estudio experimental del Trypanosoma cruzi en el perro y otros vertebrados. El problema de la transmisión. Kasmira 3 (1) : 77-88.

112. GUIMARAES N., SILVA N.N., CLAUSELL D.T., and MELLO A.L. 1968. Microepidemia de Doença de Chagas com provável contaminação oral. O'Hospital 73: 73-11.

113.- ALCANTARA F.G. 1966. Transmissão experimental do Trypanosoma cruzi a camundongos pelo pernilongo Culex fatigans. O. Hospital. 69 (1): 27-30.

114.- CHOCAIR P.R., SABBAGA E., AMADO NETO V., SHUROMA M., y GOES S.M. de . 1981. Transplante de rim, nova modalidade de transmissão da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 23: 28-282.

115.- RIASTE A., CANTAROVICH M., SINAGRA A., ALVAREZ M., DEL PRADO C., TIZADO J., CASTRO L., CANTAROVICH F y SEGURA E.L. 1990. Reactivación de la Enfermedad de Chagas y transplante renal. A propósito de un caso. Resumen C10. III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. Ciudad Universitaria. Pabellón II. Buenos Aires. Argentina.

116.- DIAS J.C.F., BRENER Z. and MACEDO M.A. 1984. Rev. Soc. Bras. med. trop. 17 (Supl.): 17.

117.- BRENER Z. 1984. Laboratory acquired Chagas' Disease among parasitologists? In Genes and Antigens of Parasites. 1.1. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Ed. C.M. Morel. Fundação Osw. Cruz. Rio de Janeiro, Brasil, NNDF/WORLD BANK/WHO. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. FINEP. CNPq. FIDCRUZ.

118.- DIAS DE AVILA-PIRES, F. 1975. Ecology of small mammals in relation to sylvan and domestic transmission cycles. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. 301- Proceedings of an International Symposium. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 18-21 march. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Sc. Publ. Nº 318.

119.- WISNIVESKY-COLLI C. 1982. Dinámica de la transmisión de la Enfermedad de Chagas en la vivienda rural. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales (UBA). Dto. de Ciencias Biológicas.

120.- MARSDEN, P.D., VIRGENS D., MAGALHAES I., TAVARES-NETO J., FERRERA R., COSTA G.H., CASTRO C.N., MACEDO V. and PRATA A. 1982. Ecología doméstica de Triatoma infestans em Mambai, Goiás-Brasil. Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo 24 (6): 364-370.

121. RAADI, P.de. 1975. Improvement of rural housing as a means of control of Chagas' Disease. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. p 323-. Proceedings of an International Symposium. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 18-21 march. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Sc.Publ.Nº 318.

122.- PINCHIN R., FANARA D.M., CASTLETON C.W., and OLIVEIRA FILHO A.M. 1981. Comparison of techniques for detection of domestic infestations with T.infestans in Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., vol.75 (5):691-694.

123.- WISNIVESKY-COLLI C., PAULONE I., CHUIT R., PEREZ A. and SEGURA E.L. 1988. A new method for the detection of reinfested households during surveillance activities of control programmes of Chagas' disease. Rev. Arg. de Microbiol. 20 (Supl.): 96-102. ISSN 0325-7541.

124.- RUNDEROS R.A., SCHINACK J.A., GHILINI J.M. y SPINELLI G.R. 1981. Estudio ecológico sobre una población domiciliar de Triatoma infestans Klug de la provincia biogeográfica chaqueña. ECOSUR (Argentina) 8 (15): 1-24.

125.- TELFORD S.R.Jr., TONN R.J., GONZALEZ J.J., y BETTANCOURT P. 1981. Dinámica de las infecciones tripanosómicas entre la comunidad de los bosques secos en los valles altos de Venezuela. Bol. Dirección Malariología y Saneamiento Ambiental XXI (3-4).

126.- GIOJALAS L., MONTENEGRO S.C., ASIN S. and GORLA D. Seasonal changes on infectivity of domestic populations of T.cruzi (en prensa).

127.- BURKHOLDER J.E., ALLISON T.C. and KELLY V.P. 1980. Trypanosoma cruzi (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir, and human hosts of the lower Rio Grande Valley of Texas. J. Parasitol. 66 (2): 305-311.

128.- STROUT R.G. 1962. A method for concentrating hemoflagellates. J. Parasitol., 48 (1): 100.

129.- FREILIJ H., MULLER L. and GONZALEZ CAPPA S.M. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. Journal Clin Microbiol. 18 (2): 327-330.

130.- ROSENBAUM M.E., ALVAREZ A.J. 1955. The electrocardiogram in Chronic chagasic myocarditis. Am. Heart Journal 50 (4): 492-527.

- 131.- MAGUIRE J.H., MOTT K.E., SOUZA J.A.A., CARVALHO ALMEIDA E., POPPER RAMOS N. and GUIMARAES A.C. Clasificación de electrocardiogramas y sistema abreviado de derivaciones para encuestas de poblaciones en relación con la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 93 (2): 102-109.
- 132.- CHIALE P.A., PRZYKYLSKI J., LAINO R.A., HALPERN M.S., SANCHEZ R.A., GABRIELI A., ELIZARI M.B. and ROSENBAUM MB. 1982. Electrocardiographic changes evoked by ajmaline in chronic Chagas' Disease with manifest myocarditis. Am. J. Cardiol. 49 (1): 14-20.
- 133.- MINTER D.M. 1975. Effects of transmission to man of the presence of domestic animals in infested households. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. p 330-. Proceedings of an International Symposium. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. 18-21 march. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Sc.Publ.Nº 318.
- 134.- TELFORD S.R.Jr. and TONN R.J. 1982. Dinámica de Trypanosoma cruzi en poblaciones de un reservorio primario Didelphis marsupialis, en los llanos altos de Venezuela. Bol. Of. Sanit. Panam. 93 (4): 341-348.
- 135.- ALENCAR J.E.de 1965. Estudos sobre epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. III Região do Baixo Jaguaribe. Rev. Bras. malariol. Doenças trop. 17: 149-158.
- 136.- EDGECOMB J.H. and JOHNSON C.M. 1970. Natural infection of Rattus rattus by Trypanosoma cruzi in Panamá. Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 767-769.
- 137.- HOARE C.A. 1972. The trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edimburgh 749.
- 138.-RIBEIRO ALBURQUERQUE R.D.and PEREIRA BARRETTO. 1968. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do "Trypanosoma cruzi". XXX: Infecção natural do cachorro-do-mato, "Cerdocyon thous azarae" (Wied, 1824) pelo T.cruzi. Rev. Bras. Biol. 23 (4): 457-469.
- 139.-MINTER-GOODBLOED and CROON J.J.A.B. 1981. The insusceptibility of chickens to Trypanosoma (Schizotrypanum)cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75 (3): 350-353.
- 140.- RUIZ A.M., WISNIVESKY-COLLI C., GÜRTLER R., LAZZARI J., BUJAS M.A. and SEGURA E.L. 1985. Infección por Trypanosoma cruzi en humanos, perros y cabras en áreas rurales de la provincia de Córdoba. Medicina (Buenos Aires)45: 539-546.

141.- MAZZA S. 1926. Observación de infección espontanea del perro por el Schizotrypanum cruzi (Nota preliminar). Rev. Soc. Arg. Biol. 2: 33-41.

142.- MAZZA S. 1934. Frecuencia e importancia de la infección natural de perros y gatos por S.cruzi y cuestión de la herencia del mismo en los primeros animales. MEFRA. 112: 412-417.

143.- MOTT K.E., LEHMAN J.S., HOFF R., MORROW R.H., MUNIZ T.M., SHERLOCK I., DRAPER C., PUGLIESE C. and GUIMARAES A.C. 1976. The epidemiology and household distribution of seroreactivity to T.cruzi in a rural community in northeast Brazil. Am. J. Trop. med. Hyg. 25 (4): 552-561.

144.- GURTLER R., SOLARZ N.D., LAURICELLA M.A., HAEDO A.S., PIETROKOVSKI S.M., ALBERTI A.A. and WISNIVESKY-COLLI C. 1986. Dynamics of transmission of Trypanosoma cruzi in a rural area of Argentina. III. Persistence of T.cruzi parasitemia among canine reservoirs in a two-year follow-up. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 28 (4): 213-219.

•

145.- GURTLER R., WISNIVESKY-COLLI C., SOLARZ N.D., LAURICELLA M.A. and BUJAS M.A. 1987. Dynamics of transmission of Trypanosoma cruzi in a rural area of Argentina: II. Household infection patterns among children and dogs relative to the density of infected Triatoma infestans. PAHO Bulletin 21 (3): 280-292.

146.- MAZZA, S. 1934. Hallazgo del gato como portador natural del Schizotrypanum cruzi en la provincia de Jujuy. 12-14. En: Misión de estudios de Patología Regional Argentina. Nº 17.

147.- WISNIVESKY-COLLI C., GURTLER R.E., SOLARZ N.D., LAURICELLA M.A. and SEGURA E.L. 1985. Epidemiological role of humans, dogs and cats in the transmission of T.cruzi in a central area of Argentina. Rev. inst. Med. Trop. Sao Paulo 27 : 346- 352.

148.- WILLIAMS P.D., ADAM R.G., YAEGER R.G., MC GRATH K., READ W.K. & BILDERBACK W.R. 1977. Naturally occurring Trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. JAVMA 171 (2): 171-175.

149.- GORODNER O.L.Z., MENDIVIL G.T., RISSO A., RISSO J.J., PETRAGLIA G., DE FRANCESCO C., Y BUSTAMANTE A. 1985. Enfermedad de Chagas natural en perros. Estudios serológicos, anatómopatológicos y electrocardiográficos de la fase indeterminada de la infección. Medicina (Buenos Aires) 45 (5): 535-538.

150.- PIFANO F. 1973. La dinámica epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en el Valle de los Naranjos, Estado Carabobo, Venezuela. Arch. Venez. Med. Trop. y parasitol. Med. 2: 31-45.

151.- GAMBOA C.J. 1967. Evaluación de las medidas antitriatominas por medio de la prevalencia de S.cruzi en perros. Boletín Informativo de la Dirección de Malariaología y Saneamiento Ambiental (Maracay, Venezuela) 7: 321-325.

152.- MAZZA S. y CHACON R.V. 1943. Primeros animales domésticos y seres humanos con Schizotrypanum cruzi comprobados en Bolivia. Prensa Médica Argentina 30 (9) : 365-367.

153.- NAVIN T.R., ROBERTO R.R., JURANEK D.D., KHANCHIT L., MORTENSON E.W., CLOVER J.R., YESCOTT R.E., TAGLINDO C., STEURER F. and ALAN D. 1985. Human and sylvatic T.cruzi infection in California. Am. J. Public. Health 75 : 366-369.

154.- PEDREIRA DE FREITAS J.L., ROCHA U.F., ZAPATEL VAZQUEZ J.A. e NOVITCKY A.T. 1952. Inquérito preliminar sobre a infeçao pelo Trypanosoma cruzi (Chagas 1909) entre cães e gatos domésticos no municipio de Campo Florido (Triangulo Mineiro), Minas Gerais, Brazil. Rev. Fac. Med. Vet. Sao Paulo 4 (4): 545-551.

155.- DIAS E. 1940. Xenodiagnósticos seriados em cães infectados com amostras venezuelanas de Sch. cruzi Bras. Med. 54: 859-61.

156.- LUCENA D.T. de. 1957. Reaçao de Guerreiro Machado em caes do Municipio de Timbaubá. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. 9 (4): 447-450.

157.- SERRAVALLE A. 1963. Reações de Guerreiro e Machado e de Haemaglutinação em caes. An. Congr. Int. Doença Chagas 4: 1499-1503.

158.- SIQUEIRA A.F. 1960. Estudos sobre reação da precipitina aplicada a identificação de sangue ingerido por triatomíneos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2 : 41-53.

159.- CORREA V., BRICERO J., ZUNIGA J., ARANDA J.C., VALDES J., CONTRERAS M. del C., SCHENONE H., VILLARROEL F. and ROJAS A. 1982. Trypanosoma cruzi infection in domestic animals in rural sections of the IV Region, Chile. Bol. Chileno Parasitol. 37(1-2): 27-28.

160.- TOMLINSON M.J., CHAPMAN W.L., HANSON W.L. and GOSSER H.S. 1981. Occurrence of antibodies to T.cruzi in dogs in the south eastern United States. Am. J. Vet. Res. 42 (8): 1444-1446.

161.- PERALTA J.M., MASALHAES T.C.R., ABREU L., MANIGOT D., LUQUETTI A. and DIAS J.C.P. 1981. The direct agglutination test for chronic Chagas' disease. The effect of pre-treatment of test samples with 2-mercaptoethanol. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75(5): 695-698.

162.- GÜRTLER R.E., LAURICELLA M.a., SOLARZ N.D., BUJAS M.A. and WISNIVESKY-COLLI C. 1986. Dynamics of transmission of Trypanosoma cruzi in a rural area of Argentina. I- The dog reservoir: an epidemiological profile. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 28 (1): 28-35.

163.- D'ALESSANDRO A. y BARRETTO P. 1985. Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas. Tomo II. Parásitos-Reservorios- Control. Situación Regional. Cap XXXIII. Colombia.

164.- CHUIT R., SUBIAS E., PEREZ A.C., PAULONE I., WISNIVESKY-COLLI C. and SEGURA E.L. 1989. Usefulness of serology for the evaluation of T.cruzi transmission in endemic areas of Chagas' Disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 22 (3): 119-124.

165.- SCHOFIELD C.J., APT W. & MILES M.A. 1982. The ecology of Chagas' disease in Chile. Ecology of disease. 1 (2-3) : 117-129.

166.- SCHENONE H., CHRISTENSEN H.A., VAZQUEZ A.M.de, GONZALEZ C., MENDEZ E., ROJAS A. and VILLARROEL F. 1985. Fuentes de alimentación de triatomas domésticos y su implicancia epidemiológica en relación a enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. Bol. Chil. Parasitol. 40 :34-38.

167.- DIAS, J.C.P. 1984-A. Enfermedad de Chagas en la región urbana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Confer. Reunión Enferm. Chagas. Córdoba. Argentina.

168.- SEGURA E.L., ESTEVA M., QUINTANS C., MONTORO L.S. y WEISSENbacher M.C. 1981. Infección con T.cruzi en ratones congénitamente atímicos. Medicina (Buenos Aires) 41: 328-332.

169.- GONZALEZ CAPPA S.M., CHIALE P., DEL PRADO C.E., KATZIN A.M., DE MARTINI G.W.de, DE ISOLA E.D., ABRAMO ORREGO L., y SEGURA E.L. 1980. Aislamiento de una cepa de T.cruzi de un paciente con miocardiopatía chagásica crónica y su caracterización biológica. Medicina (Buenos Aires) 40 (1): 63-68.

170.- PIZZI PIZZI T. 1945. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas experimental. (Comunicación preliminar). Biológica, Santiago 3: 53-65.

171.- DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. 1984. Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente. Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. M. Fatala Chabén".

172.- SEGURA E.L., CURA E., FAULONE I., VAZQUEZ C. y CERISOLA J.A. 1974. Antigenic make-up of subcellular fractions of T.cruzi. J. Protozool., 21(4): 571-574.

173.- VOLLER A., BIDWELL D.E., BARTLETT A. 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories. Alexandria. VA, EEUU.

174.- PEREZ A.C., CURA ., SUBIAS E., LANSETTI J.C. y SEGURA E.L. 1990. Long term preservation of blood samples for diagnosis in T.cruzi infection. Trop. Med. Parasit. 41: 75-76.

175.- LUNA L.G. 1960. Manual of Histological Staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. American Registry of Pathology. Mc. Graw-Hill. Luna Ed.

176.- NORMAS TECNICAS Y DE PROCEDIMIENTOS PARA LA LUCHA QUIMICA CONTRA EL VECTOR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. 1983. Buenos Aires. Publicación del Servicio Nacional de Chagas de la República Argentina. Ministerio de Salud Pública y Medio Ambiente 1 (1): 29-34. Oct.

177.- SOSA ESTANI, S. 1990. Prevalencia y morbilidad de la infección chagásica en una población rural de la provincia de Santiago del Estero, República Argentina. Tesis de Maestrado en Salud Pública. Escala Nacionales de Saúde Pública. Fundação O.Cruz. NDP/WORLD BANK/WHO. Río de Janeiro. Brasil.

178.- SOKAL R.R. & ROHLF F.J. 1962. Introducción a la Bioestadística. Ed. Reverte S.A. 1980. Barcelona .España.

179.- SIEGEL S. Estadística nao Paramétrica. 1982. Editora Mc. Graw-Hill do Brasil Ltda.: 107-114.

180.- MULLER L.A., GONZALEZ CAPPAS.M. 1987. Immunogenicity of T. cruzi strains determined by neutralization test. Rev. Arg. Microbiol. 19 (3): 101-106.

181.- SEGURA E.L., VAZQUEZ C., BRONZINA A., CAMPOS J.M., CERISOLA J.A., and GONZALEZ CAPPAS.M. 1977. Antigens of the subcellular fractions of T.cruzi. II. Flagellar and membrane fraction. J. Protozool. 24: 540-543.

182.- GONZALEZ CAPPAS.M., PESCE U.J., CANTARELLA A.I., SCHMURIS G.A. 1977. T.cruzi: Acción de inmunoseros de conejo sobre el cultivo de epimastigotes en medios bifásicos. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 19 (4): 221-231.

183.- ENGEL J.C., DVORAK J.A., SEGURA E.L., and CRANE M.ST.J. 1982. T.cruzi: Biological Characterization of 19 clones derived from two Chronic Chagasic Patients. I. Growth Kinetics in Liquid Medium. J. Protozool. 29 (4): 555-560.

184.- RIÑAS C. B., RUIZ A.M. y SEGURA E.L. 1987. Diferencias entre clones y cepas de T.cruzi en su capacidad de expresar antígenos de superficie reconocidos por un anticuerpo monoclonal contra la fracción flagelar de epimastigotes de la cepa Tulahuén. II Congreso Argentino de Protozoología. Resumen B 12. 26-30 oct. La Falda. Pcia de Córdoba. República Argentina.

185.- ANDRADE S.G., FIGUEIRA R.M., ANDRADE Z.A. 1968. Influencia de infecciones repetidas no cuadro histopatológico da Doença de Chagas Experimental. Gaz. Med. Bahia 68: 115.

186.- PEREIRA M.E.S., KRETTLI A.U. 1990. The effect of reinoculation with trypomastigotes on the level of protective antibodies in mice chronically infected with T.cruzi. Brazilian J. Med. Biol. Res. 23: 283-292.

187.- CABEZA MECKERT P., LAGUENS R.P. 1981. Chronic Chagas Disease in the mouse: III. Absence of concomitant immunity after repeated infections. Medicina (Buenos Aires) 41(5): 543-548.

188.- BASOMBRIO M.A., ARREDES H.R. 1987-b. Long term immunological response induced by attenuated T.cruzi in mice. Journal of parasitol. 73: 236-238.

189.- PEDREIRA DE FREITAS J.L. 1950. Observações sobre xenodiagnósticos praticados em reservatórios domésticos e silvestres do T.cruzi em uma localidade endêmica da Moléstia de Chagas no estado de Sao Paulo. O. Hospital. XXXVIII(4):521-529.

190.- PETERSEN R., RUBEL D., CEDERE M.C., SCHWIGMANN N., CARLOMAGNO M., LAURICELLA M., GURTNER R. 1990. Influencia del estado nutricional sobre la parasitemia y la respuesta inmune en perros naturalmente infectados con T.cruzi. Soc. Arg. Protozool. III Congr. Arg. Protozool. y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. 17-21 Nov. Ciudad Univ. Pab II. Buenos Aires. Argentina. Resumen EP 27.

191.- ZELEDON R., DIAZ J.C.P, BRITTA ZALAZAR A., REZENDE J.M., VARGAS L., URBINA A. 1988. Does spontaneous cure for Chagas' Disease exists? Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 21:15-20.

192.- ANDRADE S.G, ANDRADE Z.A., SADIGURSKY M. 1981. Combined treatment with nitrofuracin and a corticoid in experimental Chagas' Disease in the dog. Am. J. Trop. Med. Hyg.

193.- LARANJA F.S., PELLEGRINO I. y DIAS E. 1948. Experimental Chagas, Heart Disease. Third Inter-american Cardiological Congress, Chicago. Am. Heart Journal 37 (4): 646. 1949.

194.- KAGAN I.G. 1972. Serodiagnosis in Parasitic Diseases. Ciba Geigy Foundation. Chapter 78.

195.- VATTUNE N.H., y YANOVSKY F.L. 1971. T. cruzi agglutination activity of enzyme-treated epimastigotes. Exp. Parasitol. 30: 349.

196.- BOMBACI L., VATTUONE N.H., SANTAMARIA H., GARAY C.G. 1976. Reacción de Aglutinación directa para Chagas. Análisis de su sensibilidad y especificidad cuando se lo emplea en un área no endémica.

197.- CERISOLA J.A. FATALA CHABEN & LAZZARI J.A. 1962. Test de Hemaglutinación para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Prensa Médica Argentina 49 (34): 1761-1767.

198.- FIFE E.H. 1971. Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. Exp. Parasitol. 30: 132-163.

199.- CAMARGO M.E., SEGURA E.L., KAGAN I.G., PACHECO SOUZA J.M., ROCHA CARVALHEIRO J.da, YANOVSKY J.F. and GUIMARAES M.C. 1986. PAHO Bulletin, 20 (3):133-244.

200.- HART G. 1983. Predictive value of Serologic Tests. AJPH 73 (11): 1283-1293.

201.- BRENNIERE S.F., CARRASCO R., MIGUEZ H., LEMESRE J.L. & CARLIER Y. 1984. Comparissons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas Disease in bolivian patients. Trop. Geogr. Med., 37: 231-238.

202.- GÜRTLER R., KRAVETZ F.O., PETERSEN R.M., LAURICELLA M., & WISNIVESKY-COLLI C. 1990. The prevalence of T. cruzi and the demography of dogs populations after insecticidal spraying of houses: a predictive model. Annals of Trop. Med. & Parasitol. 84 (0-0): 1-11.

203.- YANOVSKY J. 1990. El papel de la empresa privada en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias. Soc. Arg. Protozool. III Congreso Argentino de Protozoología y Reunión sobre Enfermedad de Chagas. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Buenos Aires. República Argentina.

204.- SEGURA E., MARLETTA J., VOTTERA A., MORENO L. y LANSETTI J.C. 1982. Estudio de una técnica inmunoenzimática en Enfermedad de Chagas. INDIECH.

205.- DE TITTO E.H., MORENO M., BRAUN M. y SEGURA E.L. 1987. Chagas' disease: humoral response to subcellular fractions of T.cruzi in symptomatic and asymptomatic patients. Trop. Med. Parasit. 38: 163-166.

206.- MAZZA S. 1935. 9ª Reunión Argentina Soc. Arg. Patol. Reg. (Mendoza) 1-4 oct: 412-417. 1936.

207.- MAZZA S. 1936. MEPRA 27: 3-47.

208.- MAYER H.F., y ALCARAZ I. 1954. Investigaciones sobre esquizotripanosis en perros y gatos de la zona suburbana de Resistencia. An. Inst. Med. Reg. Tucumán 4 (1): 7-17.

209.- HAUSCHKA T.S. 1947. Sex of host as a factor in Chagas' disease. J. Parasitol. 33: 399.

210.- PIESMAN J., SHERLOCK I.A., MOTA E., TODD C.W., HOFF R. and WELLER T.H. 1985. Association between household triatomine density and incidence of T.cruzi infection during a nine year study in Castro Alves, Bahia, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34 (5): 866-869.

211.- RABINOVICH J.E. y ROSELL D. 1975. Mathematical models and ecology of Chagas' disease. In New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Scientific Publication Nº 318: 359-369.

212.- ZELEDON R. and VARGAS L.G., 1984. The role of dirt floors and of firehood in rural dwellings in the epidemiology of Chagas' disease in Costa Rica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33 (2): 232-235.

APENDICE

1.- Grado de infestación triatomina basal domiciliaria de las viviendas seleccionadas para las áreas rural (Tabla I), intermedia (Tabla II) y periurbana (Tabla III) respectivamente:

TABLA I

Niveles individuales de infestación triatomina basal en 23 viviendas típicas del área rural.

Número de vivienda	tipo	Infestación domiciliaria#	Nº de perros
2	1	113	4
3	2	15	1
23	2	19	2
36	1	9	2
39	2	18	6
43	2	10	3
50	2	29	2
51	2	32	4
67	2	21	3
70	2	64	3
71	2	32	4
75	1	12	1
84	2	30	8
86	1	52	3
91	2	16	3
97	2	S.I.	3
98	1	S.I.	3
99	2	42	4
110	2	23	4
113	2	29	3
119	2	43	4
134	2	11	2
135	2	21	2

Total		707	74

S.I.= sin información. (#) = en dormitorios.

TABLA II

Niveles individuales de infestación triatomina basal en 49 viviendas tipificadas del área intermedia.

Número de vivienda	*tipo	Infestación domiciliaria #	Nº de perros
152	2	7	2
155	3	10	3
157	2	21	4
159	2	5	3
162	2	7	2
163	2	23	3
181	1	5	3
182	3	15	2
186	1	41*	5
195	2	45	4
199	1	14	3
200	3	28*	3
206	2	161	2
218	2	11	2
227	3	26	4
232	2	14	5
233	1	22	4
234	2	26	3
235	3	19	3
237	1	29	5
238	2	36	2
246	2	5	1
247	1	27	4
251	2	16	5
255	2	10	4
256	2	10	4
259	2	78	2
265	2	0	2
268	2	23*	4
269	2	13*	3
275	2	6*	2
277	2	28*	3

(*) entre 1 y 5 vinchucas detectadas en la evaluación post-rociado (#) = en dormitorios.

TABLA II (cont.)

Número de vivienda	tipo	Infestación domiciliaria #	Nº de perros
278	2	15	4
282	2	8	4
287	2	28	5
296	2	26	4
306	3	13	2
318	2	132	4
321	2	10	4
327	2	9	5
330	1	11	2
338	2	25	6
341	2	60	5
344	3	85*	1
353	3	17	2
358	2	25*	6
628	3	S.I.*	4
629	2	S.I.*	3
630	3	S.I.	3

Total		1220	164

(*) entre 1 y 5 vinchucas encontradas en la evaluación post-
rociado.

(#) = en dormitorios. S.I.= sin información.

TABLA III

Niveles individuales de infestación triatomina basal en 29 viviendas tipificadas del área periurbana.

Número de vivienda	tipo	Infestación domiciliaria #	Nº de perros
387	3	35	2
392	3	12*	3
394	2	4**	4
407	3	S. I.*	4
415	3	36	6
417	3	30	4
420	2	18	4
423	3	31	4
431	3	24*	6
439	3	24	3
441	2	16	2
455	3	11	3
460	3	6	12
505	2	33	1
519	3	10	4
527	3	11	1
534	3	1	3
547	3	22	3
549	2	25	4
551	3	S. I.	3
559	3	1	2
566	3	2	5
571	3	15	1
579	3	9	4
588	3	1	5
597	3	3*	4
599	1	40	2
600	1	4	5
612	3	12	5

Total		518	109

(*) entre 1 y 5 vinchucas encontradas en la evaluación post-rociado.

(**) entre 6 y 10 vinchucas encontradas en la evaluación post-rociado.

(#) = en dormitorios. S. I. = sin información.

2.- Datos individuales del estudio epidemiológico del área total seleccionada:

A = casa C = área (1-2 = rural; 3-4 = intermedia; 5-6 = periurbana) E = edad en meses, R = tiempo en meses transcurrido desde que tienen el perro, P = función del perro (1 = guardián, 2 = cazador, 3 = cabrero, 4 = guardián y cazador, 5 = cazador y cabrero), M = si pertenece a familia migrante, S = serología (1 = positiva ; 0 = negativa, 9 = sin efectuar) X = xenodiagnóstico (1 = positiva; 0 = negativa, 9 = sin efectuar).

	A	C	E	R	P	M	S	X
002	1	36	36	4	0	1	1	
002	2	1	1	3	9	0	0	
002	2	4	4	9	9	0	0	
002	2	12	12	1	0	1	0	
003	2	48	48	2	0	0	0	
023	1	24	24	1	0	0	0	
023	1	36	36	1	0	1	1	
036	2	24	24	1	0	0	0	
036	2	24	24	1	0	0	0	
039	2	5	5	9	0	0	0	
039	2	9	9	1	0	0	0	
039	2	9	9	9	0	0	0	
039	2	24	24	4	0	1	0	
039	2	36	46	3	0	0	0	
039	2	60	60	4	0	0	0	
043	1	2	2	9	0	0	0	
043	1	3	3	9	0	0	0	
043	1	24	24	1	0	1	0	
050	1	12	12	1	0	0	0	
050	1	36	36	4	0	0	0	
050	1	36	36	4	0	0	1	
050	1	180	180	4	1	1	1	
051	1	5	5	1	0	0	0	
051	1	36	36	1	0	0	0	
051	1	120	120	1	0	1	0	
067	1	48	48	1	0	0	0	
067	1	132	132	1	1	1	1	
067	1	168	168	1	0	0	0	
070	1	6	6	1	9	0	0	
070	1	10	10	1	9	1	1	
070	1	36	36	1	9	0	0	
071	1	12	12	4	0	0	0	
071	1	24	24	3	0	0	0	
071	1	48	42	1	0	0	0	
071	1	108	108	4	0	0	0	

075	1	36	36	4	0	0	0
084	2	1	1	3	0	0	0
084	2	6	6	3	0	0	0
084	2	8	8	1	0	0	0
084	2	8	8	1	9	1	1
084	2	9	9	3	0	0	0
084	2	12	12	1	0	0	0
084	2	24	24	1	9	1	1
084	2	36	36	3	0	0	0
084	2	36	36	3	0	0	0
084	2	48	48	1	0	0	0
086	2	3	3	9	9	0	0
086	2	4	4	1	9	0	0
086	2	144	144	9	9	1	0
091	2	12	12	1	0	1	1
091	2	24	24	1	0	1	1
091	2	24	24	1	0	1	1
097	2	9	9	3	1	0	0
097	2	96	96	4	0	1	0
098	2	60	60	4	0	0	0
099	2	60	60	1	9	1	1
099	2	84	84	4	0	1	1
110	2	3	3	9	0	0	0
110	2	10	10	1	0	0	1
110	2	12	12	1	0	1	0
110	2	48	48	1	0	1	1
113	2	9	9	1	0	1	1
113	2	24	24	4	0	1	1
113	2	48	48	2	0	0	0
119	2	7	7	1	1	0	0
119	2	12	12	1	0	0	0
119	2	24	24	1	0	0	0
134	2	48	48	1	1	1	1
135	2	24	24	1	0	1	1
135	2	36	36	1	0	0	0
152	3	24	24	1	1	1	0
152	3	60	60	1	1	1	1
154	2	48	48	1	1	1	1
155	3	8	7	1	1	1	0
155	3	60	54	9	1	1	1
155	3	120	120	1	1	1	1
157	3	4	4	9	0	0	0
157	3	35	35	4	0	1	0
157	3	48	48	4	0	1	0
157	3	72	72	4	0	1	1
159	3	12	12	1	0	0	0
159	3	18	18	1	0	0	0
159	3	108	108	1	0	1	0
162	3	60	60	1	0	0	0
162	3	60	60	1	0	1	1

163	3	4	4	1	1	0	0
163	3	24	24	4	1	0	0
163	3	48	48	4	1	1	1
181	3	1	1	9	0	9	0
181	3	24	24	4	0	1	0
182	3	12	10	1	0	0	0
182	3	24	24	1	0	0	0
186	3	12	12	1	0	0	0
186	3	12	12	1	0	0	0
186	3	12	12	9	0	0	0
186	3	24	24	1	0	0	0
186	3	72	72	4	0	1	0
195	3	3	3	9	0	0	0
195	3	12	12	1	0	0	0
195	3	48	48	1	0	0	0
195	3	60	60	1	0	1	0
199	3	4	3	9	0	0	0
199	3	35	35	1	0	0	0
199	3	72	72	9	0	1	0
200	3	4	4	9	0	0	0
200	3	12	12	1	0	0	0
206	3	3	3	9	0	0	0
206	3	24	12	1	0	1	0
218	3	36	36	1	0	1	0
218	3	72	72	1	0	1	0
227	3	2	2	9	1	0	0
227	3	24	24	1	1	0	0
227	3	24	24	1	1	0	0
227	3	30	30	1	1	1	0
232	3	4	3	9	0	0	0
232	3	7	7	1	0	0	0
232	3	9	1	1	0	0	0
232	3	18	2	1	0	0	0
232	3	30	24	1	0	1	0
234	3	2	2	9	0	0	0
234	3	18	18	1	0	0	0
234	3	30	30	1	0	0	0
235	3	18	18	1	1	0	0
235	3	24	24	1	1	0	0
235	3	120	120	1	1	1	1
237	3	9	9	4	0	0	0
237	3	24	24	1	0	0	0
237	3	35	35	1	0	1	1
237	3	60	60	1	0	0	0
237	3	60	60	1	0	0	0
238	3	8	8	1	1	0	0
238	3	18	18	1	1	0	0
246	3	12	12	1	2	0	0
247	3	3	3	9	0	0	0
247	3	3	3	9	0	0	0
247	3	12	9	1	1	0	0

251	3	18	18	1	0	0	0
251	3	48	48	1	1	0	0
251	3	60	60	1	0	1	1
251	3	96	96	1	0	1	0
253	3	6	6	1	0	0	0
255	4	7	7	1	1	0	0
255	4	12	12	1	1	0	0
255	4	24	6	1	1	0	0
255	4	36	36	1	1	9	0
256	4	5	5	1	0	1	1
256	4	12	12	4	0	1	1
256	4	60	60	4	0	1	1
259	4	48	48	1	0	1	0
259	4	84	60	1	0	1	0
265	4	18	18	1	0	0	0
265	4	24	24	1	0	0	0
268	4	3	3	9	0	0	0
268	4	12	12	1	0	1	1
269	4	48	48	1	0	1	0
269	4	12	12	9	9	0	0
269	4	60	60	1	9	0	0
269	4	156	150	9	9	1	1
275	4	36	36	1	9	0	0
277	4	9	6	1	1	0	0
277	4	36	36	1	1	0	0
277	4	108	108	4	1	0	0
278	4	2	2	9	0	1	1
278	4	24	24	4	0	1	1
278	4	36	36	4	0	1	0
278	4	36	36	4	0	1	1
282	4	6	6	1	0	0	0
282	4	18	18	1	0	0	0
282	4	36	24	1	0	0	0
282	4	60	54	1	0	0	0
287	4	2	2	1	0	0	0
287	4	4	4	9	0	0	0
287	4	7	7	1	0	0	1
287	4	18	18	1	1	1	1
287	4	24	24	1	1	0	0
296	4	18	1	1	0	0	0
296	4	18	12	1	0	0	0
296	4	24	24	1	0	1	1
296	4	48	48	1	1	0	0
306	4	4	4	9	0	0	0
306	4	6	5	9	0	0	0
318	4	3	2	1	0	0	0
318	4	12	12	1	0	0	0
318	4	24	24	4	0	0	0
318	4	36	36	4	0	9	0
321	4	4	4	9	9	0	0
321	4	6	6	9	0	0	1
321	4	24	24	4	0	1	0
321	4	36	36	4	0	1	0

327	4	12	10	1	0	0	0
327	4	12	12	1	0	0	0
327	4	24	18	1	0	0	0
327	4	60	60	1	0	0	0
327	4	96	96	1	0	0	0
330	4	36	24	4	1	0	0
330	4	36	36	4	1	0	0
334	4	18	12	1	1	0	0
338	4	6	6	4	1	0	0
338	4	12	12	4	1	0	0
338	4	12	12	4	1	1	1
338	4	24	24	4	1	0	0
338	4	24	24	4	1	1	0
338	4	36	36	4	1	1	0
341	4	2	2	9	0	0	0
341	4	12	2	1	0	0	0
341	4	24	24	3	0	0	0
341	4	30	30	1	0	0	1
341	4	36	30	1	0	1	1
353	4	24	24	4	1	0	0
353	4	60	60	4	1	0	0
358	4	6	6	1	0	0	0
358	4	12	12	1	0	0	0
358	4	24	24	4	0	0	0
358	4	48	48	1	0	1	1
358	4	84	12	9	0	0	0
358	4	84	84	4	0	1	0
387	5	1	1	1	0	9	0
387	5	8	8	1	1	0	0
392	5	24	24	1	0	0	0
392	5	36	18	1	0	1	0
392	5	96	36	1	0	1	0
394	5	12	12	4	1	0	0
394	5	24	24	4	1	1	1
394	5	36	36	1	1	1	0
394	5	36	36	4	1	0	0
407	5	2	2	1	0	0	0
407	5	24	24	1	0	0	0
407	5	60	60	1	0	1	0
415	5	48	48	1	0	1	0
415	5	54	54	1	0	0	0
415	5	60	60	1	0	0	0
415	5	66	66	1	0	0	0
415	5	72	72	4	0	0	0
415	5	120	120	1	0	0	0
417	5	6	6	1	0	0	0
417	5	9	9	1	0	0	0
417	5	36	36	1	0	0	0
417	5	48	48	1	0	1	1
420	5	7	7	1	0	0	0
420	5	7	7	3	0	1	1
420	5	12	12	4	0	0	0
420	5	48	24	4	0	1	1

423	5	24	12	1	0	.	0
423	5	36	36	4	0	0	0
423	5	60	60	4	0	0	0
431	5	3	2	1	0	0	0
431	5	6	6	1	0	0	0
431	5	12	12	1	0	1	1
431	5	36	36	1	0	1	0
431	5	60	60	1	1	1	0
431	6	10	9	1	0	0	0
439	5	36	36	4	1	0	0
439	5	108	108	4	1	0	0
441	5	12	12	1	0	1	1
441	5	120	120	4	1	1	1
455	5	2	2	4	0	0	0
455	5	6	6	1	1	0	0
455	5	12	12	4	0	0	0
460	5	1	1	3	0	0	0
460	5	3	3	1	0	0	0
460	5	7	3	1	0	0	0
460	5	12	12	1	0	0	0
460	5	12	12	1	0	0	0
460	5	12	12	3	0	0	0
460	5	36	36	1	0	0	0
460	5	48	48	1	0	1	1
460	5	48	48	4	0	0	0
460	5	48	48	6	0	1	0
460	5	72	72	2	0	1	1
505	5	48	48	1	0	1	1
508	6	12	12	1	1	0	0
508	6	18	12	4	1	0	0
508	6	24	24	1	1	0	0
519	6	9	9	1	0	0	0
519	6	12	12	1	0	0	0
519	6	30	30	1	1	0	0
527	6	6	5	1	9	0	0
534	6	2	2	1	0	0	0
534	6	12	12	1	0	1	1
534	6	36	36	1	0	0	0
547	6	2	2	1	0	0	0
547	6	36	36	1	0	0	0
547	6	36	36	1	0	0	0
549	6	8	8	1	0	0	0
549	6	8	8	1	0	0	0
549	6	8	8	1	0	0	0
549	6	24	24	1	0	1	1
551	6	12	12	1	9	0	0
551	6	24	24	1	9	0	0
551	6	48	48	1	9	0	0
559	6	18	18	1	1	0	0
559	6	120	120	1	1	1	1

566	6	1	1	1	1	0	0
566	6	1	1	1	1	9	0
566	6	12	12	1	1	0	0
566	6	36	36	1	1	0	0
566	6	36	36	1	1	1	1
571	6	24	24	1	0	0	0
579	6	1	1	1	1	0	0
579	6	8	8	1	1	0	0
579	6	12	12	1	1	0	0
588	6	7	6	1	0	1	0
588	6	7	7	1	0	0	0
588	6	72	60	1	0	0	0
597	6	1	1	9	9	0	0
597	6	1	1	9	9	9	0
599	6	168	168	1	0	0	0
599	6	216	216	1	0	1	0
600	6	2	2	0	0	0	0
600	6	12	5	1	0	0	0
600	6	48	48	1	0	1	1
600	6	60	60	1	0	0	0
600	6	60	60	1	0	1	0
612	6	5	3	4	0	1	1
612	6	5	5	4	0	9	0
612	6	7	7	4	0	0	0
612	6	15	15	4	0	0	0
613	5	36	24	1	0	0	0
628	4	4	4	1	9	0	0
628	4	10	10	9	9	0	0
628	4	10	10	9	9	0	0
628	4	36	36	1	9	1	0
629	4	24	24	4	9	9	0
629	4	24	24	9	9	0	0
629	4	36	36	4	9	0	0
630	4	12	12	4	9	0	0
630	4	36	36	4	9	1	0