

Infeción por *Trypanosoma cruzi* en caninos de Acambuco (Salta, Argentina)

Simón, M.L.¹; González, P.G.²; Mora, M.C.³; Barrio, A.B.²; Sánchez Negrette, O.^{4*}

¹Facult. Cs. Exact., Quim. & Nat., Univ. Nac. Misiones, Posadas, Argentina. ²Facult. Cs. Salud, Univ. Nac. Salta, Argentina. ³Institut. Patol. Exp. CONICET, Univ. Nac. Salta, Arg. ⁴Facult. Cs. Exact., Univ. Nac. Salta, Argentina. ⁵Fac. Cs. Agr. & Vet., Univ. Catól. Salta, Argentina.
E-mail: osanchez@ucasal.edu.ar

Resumen

Simón, M.L.; González, P.G.; Mora, M.C.; Barrio, A.B.; Sánchez Negrette, O.: Infeción por *Trypanosoma cruzi* en caninos de Acambuco (Salta, Argentina). *Rev. Vet. 33: 2, 223-229, 2022.* La infección por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es una zoonosis compleja. En el ciclo biológico de *T. cruzi* intervienen mamíferos como el hombre y animales domésticos (ciclo doméstico y peridoméstico) o silvestres como roedores y carnívoros (ciclo selvático). Desde el punto de vista epidemiológico el perro es el reservorio más importante. El objetivo fue diagnosticar la infección por *T. cruzi* en caninos residentes del Valle de Acambuco, Provincia de Salta, Argentina. El estudio se llevó a cabo en la localidad de Acambuco, Salta, Argentina. Se analizaron 24 caninos domésticos por métodos serológicos: HAI y ELISA, parasitológicos: hemocultivos y moleculares: PCR. Resultados: tres muestras caninas fueron positivas por ambas pruebas serológicas y una de éstas por PCR. Ninguna de éstas resultaron positivas por hemocultivo. En conclusión, los resultados demostraron que en la localidad de Acambuco hay presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en los perros, indicando infección parasitaria en un pasado reciente.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, perros, ELISA, HAI, PCR.

Abstract

Simón, M.L.; González, P.G.; Mora, M.C.; Barrio, A.B.; Sánchez Negrette, O.: *Trypanosoma cruzi* infection in domestic canines from the town of Acambuco (Salta, Argentina). *Rev. Vet. 33: 2, 223-229, 2022.* The infection by *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease, is a complex zoonosis. Mammals such as man and domestic animals (domestic and peri-domestic cycle) or wild animals such as rodents and carnivores (wild cycle) intervene in the biological cycle of *T. cruzi*. From an epidemiological point of view, the dog is the main reservoir. Objective: to detect *T. cruzi* infection in dogs from Valle de Acambuco, province of Salta, Argentina. Materials and methods. The study was carried out in the district of Acambuco, Salta, Argentina. A total of 24 domestic dogs were analyzed by serological, parasitological, and molecular methods including HAI and ELISA, blood cultures and PCR, respectively. Results: three samples were positive by both serological tests and one of these by PCR. None of these samples were positive by blood culture. Conclusions: the results indicate the presence of antibodies against *T. cruzi* in dogs from Acambuco suggesting the presence of this parasitic infection in the recent past.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, dogs, ELISA, HAI, PCR

INTRODUCCIÓN

La infección por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es una zoonosis compleja, transmitida por varias especies de triatomíneos hematófagos^{20,30}. El vector endémico del Cono Sur es *Triatoma infestans*, ampliamente distribuido en Argentina, Chile, Uruguay, Paraguay, Brasil, Bolivia, Perú y Ecuador. La especie es casi exclusivamente doméstica y se la conoce como vinchuca¹⁹.

En Argentina, según cifras oficiales, se estima que existen -al menos- 1.600.000 personas infectadas por *T. cruzi*, cifra que representa casi el 4% de la población total del país³. En el ciclo biológico de *T. cruzi* intervienen mamíferos como el hombre y animales domésticos (ciclo doméstico y peridoméstico) o silvestres como roedores y carnívoros (ciclo selvático).

Para el caso de las comunidades rurales del noroeste argentino y gran parte del Gran Chaco donde el principal o único vector doméstico es *T. infestans*, los principales actores domésticos además de los humanos son los perros, los gatos y las gallinas. Los perros actúan como una de las principales fuentes de sangre para los *T. infestans* y presentan elevados niveles de prevalencia de infección en ausencia de medidas de control vectorial^{6,15,16,18}.

Más aún, estudios en comunidades tratadas con insecticidas residuales mostraron que los perros y gatos siguieron siendo los principales reservorios domésticos del parásito a largo plazo^{5,6}. Los perros se infectan de la misma forma que los humanos, por heces de los vectores contaminados con el parásito, el cual penetra a través de las mucosas y conjuntivas del animal. Igualmente, los perros ingieren los vectores, lo que constituye otro mecanismo de transmisión por vía oral, la cual ha demostrado ser muy efectiva en infección experimental y adjudicada en casos clínicos^{4,29}.

Desde el punto de vista epidemiológico el perro es el reservorio más importante, debido en gran parte, a su relación estrecha con el hombre, ya que la mayoría de las veces convive en el mismo domicilio¹⁰.

Las vinchucas pican a los perros y al hombre, convirtiendo a los canes en una fuente de infección constante para el humano ya que son 14 veces más efectivos que los humanos para diseminar el protozoo causante de la enfermedad hacia sus vectores, promoviendo el mantenimiento del ciclo y la replicación del parásito. Ello lleva al establecimiento y diseminación de focos latentes de infección que perjudican tanto a las personas como a los pacientes animales²⁶.

En el medio rural la prevalencia de perros con *T. cruzi* está en el rango del 8 a 50% y a menudo

excede las prevalencias encontradas en las respectivas poblaciones humanas. Además, pueden desempeñar un papel en el reinicio de la transmisión en áreas previamente rociadas, sirviendo como indicadores de transmisión re-emergente^{8,14,24}.

Por todo lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue diagnosticar la infección por *T. cruzi* en caninos residentes del Valle de Acambuco, Provincia de Salta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de Estudio

El estudio se llevó a cabo en la localidad de Acambuco, Salta, Argentina. Acambuco es un valle que pertenece al municipio de Agüaray, departamento General José de San Martín (Figura 1). El valle de Acambuco, (22°10'2.53''S; 63°54'38.22''O) fue declarado Reserva Provincial de Flora y Fauna (Ley 5360/39) y suma una superficie aproximada de 8.266 hectáreas. En la zona del Valle de Acambuco existen dos comunidades rurales, Acambuco y El Chorrillo¹.

Selección de Individuos

Previo autorización y colaboración de los propietarios para la realización de la extracción de sangre, se analizaron 24 caninos domésticos, 22 correspondientes a vecinos del Paraje Acambuco y 2 de El Chorrillo. Los caninos pertenecían a viviendas con antecedentes de infestación domiciliaria y fumigaciones posteriores.

Toma de muestra de sangre

Para la toma de muestras de sangre de los canes, se realizaron visitas domiciliarias donde se solicitó autorización a los propietarios y se les explicó la importancia de conocer el estado de infección de su mascota. Las extracciones las llevó a cabo un médico veterinario local. Se realizó por punción de la vena cefálica anti-braquial, extrayéndose entre 3 y 5 ml de sangre; dejándose retraer el coágulo, se obtuvo el suero de las mismas, conservándose a -20°C hasta su utilización en el procesamiento serológico; otros ml de sangre se colocaron en tubos con EDTA, para el diagnóstico con PCR.

Datos epidemiológicos

Durante el proceso de toma de muestras, se realizó un breve interrogatorio al propietario de cada animal, consignando en una ficha: número de muestra, nombre y apellido del dueño, domicilio (nombre del paraje correspondiente ya que al ser pocas casas no están numeradas), nombre del animal, sexo, tamaño, color del pelaje y/o signos particulares, edad, presencia

de vinchucas, fecha del último rociado de la casa y presencia de cabras y/o gallinas. El estudio implicó dos instancias de muestreo en julio de 2016 y julio de 2017 en ambos parajes del Valle de Acambuco. Se llevó a cabo un muestreo aleatorio simple.

Pruebas serológicas

Para la detección de los anticuerpos anti *T. cruzi*, se usaron las técnicas de hemaglutinación indirecta (HAI) y enzimo-inmuno-análisis (ELISA). La reacción de HAI se realiza enfrentando el suero del



Figura 1. Área de estudio: A: departamento General José de San Martín, Provincia de Salta, Argentina; B: mapa geo-político donde se destaca el Municipio de Aguaray; C: fotografía del Valle de Acambuco.

paciente con una suspensión de hematíes previamente sensibilizados con antígenos citoplasmáticos. Si en el suero del paciente existen anticuerpos anti *T. cruzi* estos van a producir aglutinación específica. Se analizaron los sueros extraídos de las muestras, según el protocolo del kit comercial HAI CHAGATEST-Wiener Lab (S.A.I.C., Rosario de Santa Fé, Argentina).

Ensayo inmuno-enzimático

Fue un ELISA para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. La reacción de ELISA se basa en la formación de inmuno-complejos entre antígenos inmovilizados en un soporte y los anticuerpos presentes en el suero. Se utilizaron antígenos recombinantes del Kit Wiener Lab ELISA, anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina *canis* conjugados con peroxidasa Sigma-Aldrich, siguiendo el protocolo descrito previamente por Binda y col., 2016³. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro para placas de ELISA MR96A Mindray, método parasitológico (hemocultivo).

Protocolo

Se utilizó el protocolo modificado por Mora y colaboradores²². En un segundo muestreo, se

obtuvieron 5 muestras de sangre, correspondientes a los canes que en el primer muestreo arrojaron resultados serológicos positivos o dudosos.

Método molecular (reacción en cadena de la polimerasa).

Se realizó extracción de ADN de las 24 muestras de sangre entera y de la fracción correspondiente al buffy coat (BC), mezclados previamente en proporción 1:1 con buffer Guanidina-EDTA. Llamamos BC a la interfase de glóbulos blancos, plaquetas y proteínas que se suspende encima de la capa de glóbulos rojos y por debajo del plasma. El ADN se extrajo por duplicado mediante el método de fenol-cloroformo y se dejó precipitando el ADN a -80°C con acetato de sodio-etanol. A partir del ADN extraído de sangre entera y del BC de las 24 muestras, se realizó PCR/Chagas convencional.

Amplificación

Se llevó a cabo en un termociclador Techne 3000 siguiendo los parámetros de ciclado correspondientes al protocolo establecido por Mora y col. (2005), amplificando segmentos de 330 pb de k-ADN utilizando los primers #121 (5'-AAA TAA

TGT ACG GG(T/G) GAG ATG CAT GA-3') y #122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3')²¹. La elección de estos primers se realizó en base al elevado número de copias ($n > 10^4$) de su secuencia target y a la elevada sensibilidad para detectar la infección en estudios de campo^{2, 9, 11, 23}.

Reacciones

En todas las reacciones se usaron controles blanco, positivos y negativos. Como control negativo se usó sangre de canes (*T. cruzi* negativos testeados por serología) y sangre infectada con *Leishmania sp.* Los controles positivos correspondieron a sangre de canes *T. cruzi* positivos, tanto por serología como por PCR, obtenidos de un estudio anterior de nuestro grupo de trabajo³ y para el blanco se utilizó agua estéril apta para PCR.

Corridas electroforéticas

Las corridas electroforéticas de los productos de PCR se realizaron en gel de agarosa al 2% con buffer TBE (Tris Borato-EDTA) y se revelaron con Bromuro de Etidio (5-10 µg/ml). Los geles se fotografiaron en transiluminador UV, Maestrogen MLB-16 Ultrabright y se determinó el tamaño de los amplicones utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb (Biodynamics).

Análisis estadístico

Se realizaron descripciones en cifras absolutas y relativas, elaborándose tablas.

Validez de prueba diagnóstica

Se realizó la validez de la Prueba HAI tomando como prueba de referencia ELISA.

Consideraciones éticas

El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de UCASAL.

RESULTADOS

HAI: lectura de la placa de Hemaglutinación Indirecta. Como se puede observar en la placa (Figura 2), resultaron positivas (con la formación de un manto que cubrió más del 50% del pocillo, para diluciones $\geq 1/16$), las muestras 9, 10 y 14. Y de interpretación dudosa, la muestra 21.



Figura 2. Lectura de la policubeta de HAI con las 24 muestras caninas.

ELISA: puede observarse la Figura 3, resultando positivas las muestras 9, 10 y 14.

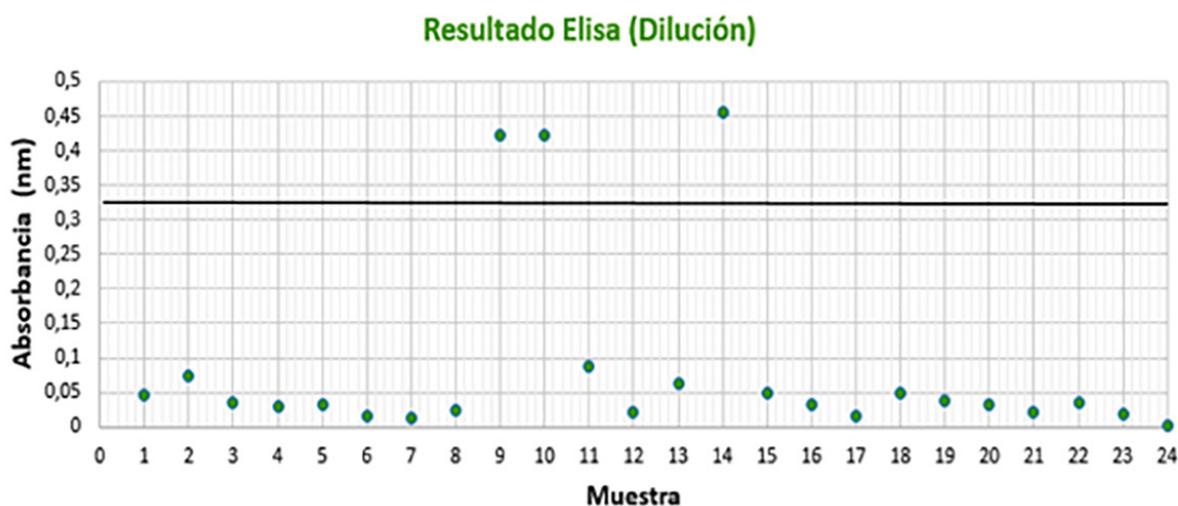


Figura 3. Gráfica del *cut-off* (línea negra) para la dilución 1:10000 del conjugado *anti-DogIgG*. PCR: en la Figura 4, se observa una única muestra que amplificó la banda de 330 pb. Es la correspondiente al BC de la muestra de sangre del can 14 que resultó *T. cruzi* positivo por serología (HAI y ELISA).

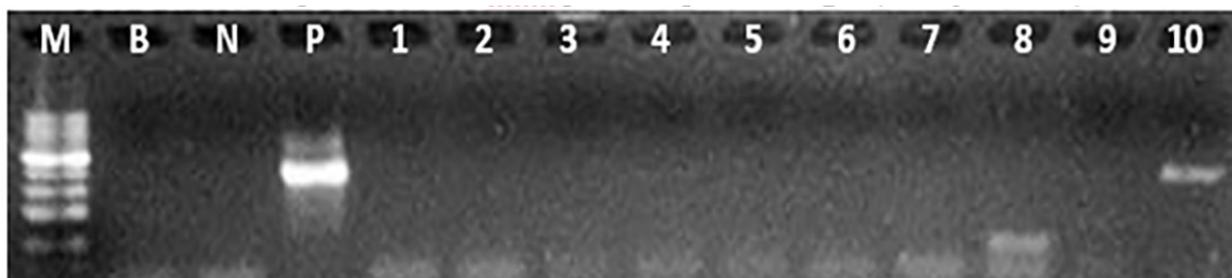


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de PCR de los BC de muestras *T. cruzi* du-dosas y positivas por serología. M: Marcador de peso molecular de 100 pb. B: blanco. N: Control negativo. P: Control positivo. Calle 1 a 10: muestras Calle 10: Muestra 14.

HEMOCULTIVOS: todos los hemocultivos resultaron negativos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: validación de una prueba diagnóstica.

Tabla 1. Validación de la prueba de HAI.

	seropositivo	seronegativo	
prueba positiva	VP = 3	FP = 1	VPP = 75 %
prueba negativa	FN = 0	VN = 20	VPN = 100%
	sensibilidad	especificidad	prevalencia
	100%	95%	12,5%

VP: verdaderos positivos; **FP:** falsos positivos; **FN:** falsos negativos; **VN:** verdaderos negativos.

Se concluye que la prueba de HAI sirve de *screening*, pues al tener alta sensibilidad un resultado negativo excluye la enfermedad

DISCUSIÓN

La transmisión de *T. cruzi* en países endémicos depende de la confluencia de vectores, reservorios, parásitos y huéspedes (tanto personas como animales) en un solo hábitat. Gürtler¹⁴ demostró, en 1993, que cuando los perros infectados permanecen en áreas donde duermen sus dueños, la tasa de infección en insectos es significativamente mayor que cuando no lo hacen¹⁴.

Años más tarde, el mismo investigador encontró que los perros contribuyen casi 3 veces más que los gatos a la transmisión doméstica de *T. cruzi* y que ambos animales (perros y gatos), hospedadores del parásito, contraen la infección unas 10 veces más rápido que los niños con los que cohabitan¹⁶.

En el extenso trabajo de investigación de Castañera *et al.*⁷, llevado a cabo en perros de Amamá y localidades vecinas (Provincia Santiago del Estero) se investigó si el perro podría ser un eficaz centinela

de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en el contexto de la fase de vigilancia. La seroprevalencia global de *T. cruzi* en la población canina disminuyó del 65,0% (54/83) en 1992, antes de un rociado con deltametrina, al 38,5% (70/182) en 1994, y al 15,2% (36/237) en 1996⁷.

Entre marzo de 2005 y junio de 2006 fueron recolectados, en dos barrios carenciados de la ciudad de Buenos Aires, sueros sanguíneos de 424 caninos, para luego ser 52 examinados por IFI y ELISA.

En ningún suero estudiado se detectaron anticuerpos específicos anti *T. cruzi*, hecho que resulta coincidente con la falta de evidencias de infestación y transmisión por triatominos en la zona (aun cuando los barrios se eligieron en base a la presencia de personas y caninos procedentes de áreas endémicas, así como a las características de las viviendas, que por su precariedad favorecían la proliferación de insectos, además de albergar perros y aves de corral en su interior, en estrecha co-habitación con el hombre)²⁵.

En la localidad de La Para, en Córdoba, Graiff *et al.*¹³, determinaron en 2009 una seroprevalencia de 11,1%, con ELISA e IFI, en 10 de 90 perros evaluados; en la provincia de Salta, Binda *et al.*³ realizaron análisis serológicos a 209 perros siendo 22 de la localidad de Rivadavia Banda Sur, 39 canes de San Carlos, 84 de Cafayate y 64 de la localidad de Embarcación, encontrándose anticuerpos anti-*T. cruzi* sólo en los canes de la localidad de San Carlos, 28,2% (11/39).

En Luján de Cuyo, una ciudad de Mendoza, de las 89 muestras tomadas a perros en 2016 y 2017, 12 resultaron positivas (13,5%) por HAI y ELISA¹². En la provincia de Chaco se registra un caso de una perra doméstica, diagnosticada por métodos parasitológicos, serológicos y moleculares²⁷.

En 2018, Ulon *et al.*²⁸ hallaron una prevalencia del 54% (66 sueros positivos) al evaluar serológicamente a 122 caninos de un barrio periférico de la provincia de Corrientes.

En el presente trabajo, por primera vez, se estableció la presencia de caninos seropositivos a *T. cruzi* en la reserva de Acambuco. De los 24 perros examinados, 3 resultaron positivos por ambas pruebas

serológicas, lo cual significa una seroprevalencia de infección del 12,5% (3/24).

Todos los caninos fueron negativos por PCR a partir del ADN extraído de sangre entera. Sin embargo, uno de ellos, fue positivo por PCR de la muestra de ADN obtenida a partir del *buffy coat*. Por otra parte, ninguna de las muestras de los canes que resultaron positivos por los métodos enunciados, permitió visualizar la presencia del parásito, luego de someterlas a cultivo. Estimamos que los perros están cursando la fase crónica de la enfermedad, considerando que se obtuvo serología positiva y PCR convencional negativa. Podría mejorarse la sensibilidad de la PCR obteniendo ADN del *buffy coat*.

A pesar de que no podemos concluir cuál es la vía de transmisión de *T. cruzi* en los perros (vectorial, oral o congénita), sí se pone de manifiesto el riesgo que representan los perros positivos a infecciones para *T. cruzi*, ya que actúan como reservorios en los domicilios y peridomicilios.

Al igual que otros autores¹⁷, consideramos que la presencia de estos animales implica una fuente no controlada de parásitos que podrían (re)introducir al patógeno en este lugar, donde el ciclo doméstico se supone controlado o interrumpido. Por lo tanto, los programas de control de la transmisión de *T. cruzi* deberían considerar la incorporación de estrategias que incluyan los perros.

Es recomendable informar a los médicos veterinarios que tomen en cuenta la enfermedad de Chagas como un diagnóstico diferencial en perros, especialmente en esta reserva protegida y continuar con estudios sistemáticos, a nivel de comunidades, para determinar si la infección se encuentra distribuida en todo el departamento y cómo es su impacto en la salud de las personas que habitan el Valle.

Para estos estudios a campo sugerimos utilizar el método HAI como *screening*. Las distintas prevalencias halladas en estudios a nivel nacional sugieren que hay zonas que requieren una acción sanitaria inmediata.

Al mismo tiempo, las estimaciones se basan en situaciones epidemiológicas muy heterogéneas, lo cual enfatiza la importancia de llevar a cabo estudios en profundidad en áreas restringidas y poder así, brindar información adicional que permita una mejor comprensión del estado actual de la enfermedad de Chagas en Argentina.

Agradecimientos

Agradecemos al Médico Veterinario Alejandro Guzmán por la toma de muestras a los canes. Nuestro agradecimiento también a la Fundación Ayre, por la concepción a la Universidad Católica de Salta, del lector de ELISA MR96A Mindray. Además fue parcialmente financiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de

Salta, y por la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Cátedra de Inmunología de la Universidad Católica de Salta. También a Olga Sánchez Negrette <http://orcid.org/0002-3178-2557>.

REFERENCIAS

1. Arguedas MS et al. 2012. Plan integral de manejo y desarrollo del área de Gestión Territorial Integrada, Serranías de Tartagal. *Ministerio de Ambiente y Producción Sustentable de Salta*. <http://y1000394.ferozo.com/wp-pdf>.
2. Barr SC. 2009. Canine chagas disease (*American trypanosomiasis*) in North America. *Veterinary Clinics of North America small animal practice*, N° 39: 6, p.1055-1064.
3. Binda JA, Trova GB, Alonso MJ, Pereyra WR, Sánchez Negrette O. 2016. Presencia de infección por *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* en perros domésticos de localidades rurales en el noroeste argentino. *Rev Pat Trop* Vol. 45: 1, 66-76.
4. Blandenier CA, López ES. 2017. Enfermedad de Chagas canina: presentación de dos casos en perros de raza Huski siberiano con miocarditis chagásica procedentes de Paracotos (Venezuela). *Gac Méd Caracas* 125: 4, 328-336.
5. Cardinal MV et al. 2006. A prospective study of the effects of sustained vector surveillance on *Trypanosoma cruzi* infection of dogs and cats in rural northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 75: 753-761.
6. Cardinal MV et al. 2007. Impact of community-based vector control on house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Chaco, Argentine. *Acta Tropica* 103: 201-211.
7. Castañera MB, Lauricella MA, Chuit R, Gürtler RE. 1998. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of *Trypanosoma cruzi* in a rural area of north-west Argentina. *Ann Trop Med Parasitol* 6: 671-683.
8. Castillo NR. et al. 2015. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. *Prev Vet Med* 120: 349-356.
9. Coronado X et al. 2006. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic chagas disease. *Acta Trop* 98: 314-317.
10. Eloy LJ, Lucchis SB. 2009. Canine trypanosomiasis: etiology of infection and implications for public health. *J Venom Anim Toxins* (incl Trop.Dis.V.15 n.4), p.589-611.

11. **Eloy LJ, Lucheis SB.** 2012. Hemoculture and polymerase chain reaction using primers TCZ1/TCZ2 for the diagnosis of canine and feline trypanosomiasis. *ISRN Vet Sci* 12: 419-378.
12. **Giai M, Magaquian MP, Guevara M.** 2018. Prevalencia de seropositividad de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en caninos de Luján de Cuyo, Argentina. *Hig Sanid Ambient* 18: 2, 1611-1615.
13. **Graiff DS et al.** 2009. Seropositividad para *Trypanosoma cruzi* en caninos de la localidad de La Para (Córdoba, Argentina). *Comunicación In Vet.* 11: 1, 11-14.
14. **Gürtler RE, Cecere MC, Petersen RM, Rabel DN, Schweigmann NJ.** 1993. Chagas disease in northwest Argentina: Association between *Trypanosoma cruzi* parasitaemia in dogs and cats and infection rates in domestic *Triatoma infestans*. *Trans R Soc Med Hyg* 87: 12-15.
15. **Gürtler RE et al.** 1996. Probability of infection with *Trypanosoma cruzi* of the vector *Triatoma infestans* fed on infected humans and dogs in Northwest Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 55: 24-31.
16. **Gürtler RE et al.** 2007. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 134: 1, 69-82.
17. **Gürtler RE et al.** 2014. Los hospedadores de animales domésticos influyen fuertemente en las tasas de alimentación humana del vector de la enfermedad de Chagas *Triatoma infestans* en Argentina. *PLoS Negl Trop Dis* 8: 5, e2894.
18. **Lauricella MA, Sinagra AJ, Paulone I, Riarte AR, Segura EL.** 1989. Natural *Trypanosoma cruzi* infection in dogs of endemic areas of the Argentine Republic. *Rev Ins Med Trop Sao Paulo* 31: 63-70.
19. **Lent H, Wygodzinsky P.** 1979. Revision of the *Triatomiane* (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Museum Nat Hist* 163: 136.
20. **Ministerio de Salud de la Nación.** 2018. República Argentina en: Responsabilidad Estatal en las enfermedades endémicas desatendidas. CHAGAS ACIJ Finde Chagas GDC. Acceso: 16 de febrero de 2019.
21. **Mora MC et al.** 2005. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR. *J Parasitol* 91: 6, 1468-1473.
22. **Mora MC, Sánchez O, Ramos F, Fernández C., Basombrío MA.** 2012. Aislamiento de *Trypanosoma cruzi* de madres chagásicas crónicas que no transmitieron la infección congénita a ninguno de sus hijos. *Anales de la Fundación Alberto J. Roemmers, Buenos Aires. Vol. XXIII p.* 291- 306.
23. **Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE.** 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482
24. **Pacheco JP et al.** 2009. Enfermedad de Chagas en perros: descripción de un caso clínico en raza cimarrón y su diagnóstico histopatológico. *Rev Electr Vet* 10: 4.
25. **Postma GC, Lauricella MA.** 2006. *Trypanosoma cruzi* antibodies absence in dogs from poor districts of Buenos Aires City, Argentina. *Rev Vet* 17: 2, 81-83.
26. **Rangel FH et al.** 2001. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* in an Urban Area of Central Mexico: *Am J Trop Med Hyg* 65: 6, 887-895.
27. **Rosas AC, Ojeda GP, Barrios A, Otteo M, Maruñak SL.** 2016. Tripanosomiasis Americana en un canino del nordeste argentino. *Rev Vet* 27: 1, 62-65.
28. **Ulon SN, Zorzo LR, Muzzio NM, Machuca LM, Maruñak SL.** 2018. Seroprevalencia de *T. cruzi* en caninos de distintos tipos de viviendas de un barrio periférico de Corrientes, Argentina. *Rev Vet* 29: 2, 133-136.
29. **Zeledón R, Trejos M, Chinchilla M.** 1977. Experimental infection of mice with blood, culture and insect forms of *Trypanosoma cruzi* by different routes. *Protozoology* 3: 95-105.
30. **Zingales B et al.** 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature. Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 2, 240-253.