

30
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" Z A R A G O Z A "**

**ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDAD
DE CHAGAS EN AHUEHUETZINGO. MORELOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

JOSE LUIS MARTINEZ PEREZ



MEXICO, D. F.

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE:

	PAGINA
I.- INTRODUCCION	1
I.1.- GENERALIDADES	1
I.2.- AGENTE ETIOLOGICO	3
I.3.- MORFOLOGIA	4
I.4.- CICLO BIOLÓGICO	6
I.5.- TRANSMISORES	8
I.6.- RESERVORIOS	10
I.7.- MECANISMO DE TRANSMISION	11
I.8.- PATOLOGIA Y PATOGENIA	13
I.9.- METODOS DE DIAGNOSTICO SEGUN LA FASE DE LA ENFERMEDAD	15
II.- ANTECEDENTES	21
III.- FUNDAMENTACION DEL TEMA	22
IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
V.- OBJETIVOS	24
VI.- HIPOTESIS	25
VII.- MATERIAL, METODOS Y REACTIVOS	26
VIII.- RESULTADOS	37
IX.- DISCUSION	51
X.- CONCLUSIONES	53
XI.- PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	54
XII.- RESUMEN	55
XIII.- ANEXOS	56
XIV.- BIBLIOGRAFIA	58

I. INTRODUCCION

I.1. GENERALIDADES

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una enfermedad infecciosa causada por *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de diversos géneros pertenecientes a la familia Reduviidae. Afecta al hombre y otros mamíferos.

Existen diversos géneros de tripanosomátidos; unos son parásitos de vertebrados, otros son parásitos de vegetales y otros de artrópodos, es decir los géneros de este suborden se diferencian por el tipo de huesped que infectan y su variación morfológica.

Existen dos géneros causantes de parasitosis al hombre.

Leishmania y *Trypanosoma*

El género *Trypanosoma* tiene cuatro especies parásitas del hombre *T. gambiense*, *T. rhodesiense*, *T. cruzi* y *T. rangeli* siendo patógenas para el hombre las tres primeras especies (5).

Las dos primeras son los agentes etiológicos de la tripanosomiasis africana o mal del sueño, mientras que *Trypanosoma cruzi* lo es de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas fué descubierta en 1909, por el investigador brasileño Carlos Chagas en el Valle Do Río das Velhas, Estado de Minas Gerais en Brasil. Este investigador encargado de realizar la campaña antipalúdica en la construcción del ferrocarril central de aquella región, encontró en el tubo digestivo de algunos reduvidos numerosos protozoarios flagelados, en forma de epimastigotes (15) (24) (63) (5).

Estos reduvidos infectados abundan en las habitaciones rurales donde existía una infección que atacaba principalmente a niños y se caracterizaba por fiebre, anemia hepatoesplenomegalia y adenitis.

Posteriormente, Oswaldo Cruz hizo que picaran estos reduvidos a monos, en los que después de 20 a 30 días mostró la presencia del agente causal en sangre periférica (15) (24); Carlos Chagas aseguró entonces que era una infección producida por esos tripanosomas, a los cuales les dió el nombre de *Schyzotrypanum cruzi* en homenaje a su maestro Oswaldo Cruz.

Desde entonces a la fecha se ha encontrado al parásito en muchos países del hemisferio; en algunos de los cuales se presentó en forma de epidemia, constituyendo problemas de salud pública de primer orden en: Argentina, Brasil, Chile, Venezuela, Colombia, etc. (63) (65) (35).

Los vectores que transmiten la enfermedad se encuentran distribuidos en una zona que se extiende desde los 43° latitud norte hasta los 49° latitud sur, es decir del sur de los Estados Unidos de Norteamérica al sur de Argentina (9) (32).

Se estima que según cálculos de las Organizaciones OMS-OPS, en 1981 existían 24 000 000 de enfermos y 65 000 000 en riesgo de adquirirla, o sea de los 330 millones de individuos que habitan el territorio continental latinoamericano, es padecida por un 7% y un 19% se encuentra en riesgo de contraerla.

En México llama la atención la escasez de informes sobre este padecimiento a pesar de: La similitud ecológica y socioeconómica con los países donde constituye un problema de salud pública; la presencia de millones de individuos susceptibles que viven en condiciones favorables para su desarrollo; la existencia de vectores (domiciliarios y peridomiciliarios) infectados, pertenecientes a 32 especies de triatóminos. No se conoce con exactitud las cifras de enfermos ni de expuestos a riesgo, sin embargo, se han realizado estudios y/o reportado casos humanos en algunos estados del país tales como: Chiapas (26), Guerrero (6), Jalisco (74) (18), Oaxaca (25) (28), Michoacán (64), Veracruz (31), Tabasco (73), Yucatán (51), Sonora (49), Puebla (3), Estado de México (4), Morelos (29), Zacatecas (75), Nayarit (65), Sinaloa (42), San Luis Potosí (13), Querétaro e Hidalgo (73), en los que existen condiciones ecológicas y geográficas para el desarrollo de la enfermedad; la ausencia de esta parasitosis en otras entidades federativas se debe a la falta de estudios.

En México se consideraba, hasta hace poco, como área endémica probable, todo el territorio ubicado entre los 0 metros y 1800 metros sobre el nivel del mar (63).

1.2. AGENTE ETIOLOGICO

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es *Trypanosoma cruzi*.

CLASIFICACION

Reino	:	Protista
Phylum	:	Protozoa
Subphylum	:	Sarcomastigophora
Superclase	:	Mastigophora
Clase	:	Zoomastigophora
Orden	:	Kinetoplastida
Familia	:	Tripanosomatidae
Género	:	<i>Trypanosoma</i>
Especie	:	<i>cruzi</i>

I.3. MORFOLOGIA

Este parásito mide entre 5 y 25 micras de largo, por 3 a 5 micras de diámetro dependiendo del estadio. posee una mitocondria única que recorre todo el citoplasma y que presenta una zona definida denominada cinetoplasto el cual contiene DNA (7). Este DNA citoplasmático está constituido por mini y maxi círculos dispuestos en forma de "8" distribuidos en dos hileras en los epimastigotes y en cuatro en los tripomastigotes siendo su función aun desconocida (61). Adyacente al cinetoplasto se encuentra al nacimiento del flagelo libre y su posición y ausencia del flagelo libre y su posición en relación al núcleo configura la denominación del estadio.

TRIPOMASTIGOTE. Es un flagelado con cuerpo fusiforme que mide de 20 a 25 micras de longitud por 2 a 4 micras de ancho, con citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un cinetoplasto subterminal, posterior al núcleo del cual emerge una membrana ondulante que recorre completamente el parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior. Se encuentra en la sangre de los mamíferos dándosele el nombre de tripomastigote sanguíneo, y en el intestino posterior de los triatóminos, denominándose tripomastigote metacíclico, son iguales morfológicamente pero el número de mini y maxi círculos del DNA de su cinetoplasto es diferente.

No se multiplica pero constituye la forma infectante para los mamíferos y los triatóminos. Dentro de los mamíferos es el diseminador de la infección por vía sanguínea. (figura No.1)

PROMASTIGOTE. Es alargado y grácil, con un núcleo central, un cinetoplasto con axonema de localización anterior y un flagelo que sobresale de su extremo anterior. (figura No.2)

EPIMASTIGOTE. Es similar al promastigote, pero el cinetoplasto se encuentra más próximo al núcleo y tiene una pequeña membrana ondulante con axonema y después el flagelo. Es la forma de multiplicación del parásito en el intestino del triatómino y la predominante en los medios de cultivo libres de células (figura No.3)

AMASTIGOTE. Es un elemento redondo de unas 2 micras de diámetro, aflagelado, en el cual se distinguen núcleo y cinetoplasto. Es la forma de multiplicación del parásito en el interior de las células del mamífero, principalmente en el músculo estriado y liso. En músculo (especialmente en corazón) se agrupan en racimos formados por divisiones sucesivas de un espécimen a estas agrupaciones se les conoce como pseudoquistes o nidos de amastigotes (figura No.4)

AMASTIGOTE



Fig. 4

TRIPOMASTIGOTE

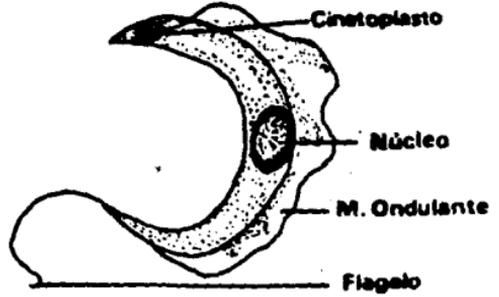


Fig. 1

EPIMASTIGOTE

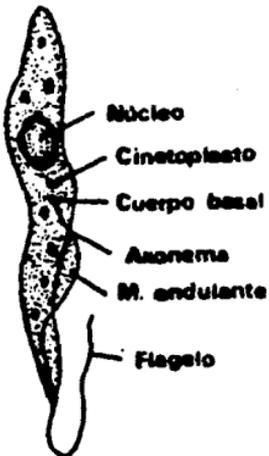


Fig. 3

PROMASTIGOTE

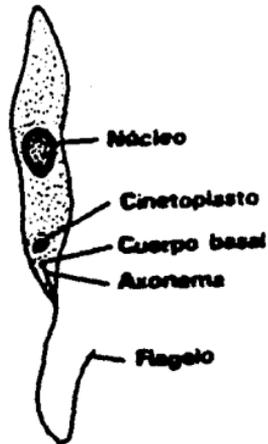


Fig. 2

1.4. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo biológico del parásito se inicia cuando un triatómino pica a un mamífero e ingiere sangre que contiene tripomastigotes sanguíneos los cuales se establecen en la luz del tracto digestivo del insecto.

En el lumen del intestino medio del insecto los tripomastigotes se transforman en epimastigotes que se multiplican muy activamente por división binaria longitudinal y al cabo de 15 a 30 días, se desarrollan en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatómino. Cuando el insecto infectado pica al mamífero para su alimentación emite deyecciones con tripomastigotes metacíclicos los cuales son capaces de penetrar a través de mucosas y piel escoriada e indemnes.

Una vez dentro del mamífero los tripomastigotes metacíclicos, se transforman en tripomastigotes sanguíneos, estos penetran células (macrófagos, células del sistema retículo endotelial) y adquieren la forma de amastigotes. Los amastigotes se multiplican por división binaria, repletan la célula, que termina por romperse, y salen los parásitos a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes sanguíneos, viajan por todo el organismo, aunque estos no se reproducen, si presentan histotropismo por ciertos órganos y tejidos, cualidad ésta, que depende de la cepa del parásito. La mayor parte de las cepas tienen afinidad por las células musculares cardíacas; pero otras invaden hígado, sistema nervioso o glándulas de secreción interna.

Estos tripomastigotes penetran en nuevas células, se transforman en amastigotes para su reproducción se rompen células repletas de parásitos y estos vuelven a circular como tripomastigotes, repitiendo muchas veces este ciclo.

El ciclo biológico se completa cuando algún triatómino libre de infección pica e ingiere sangre con tripomastigotes sanguíneos (8)(66) (figura No.5).

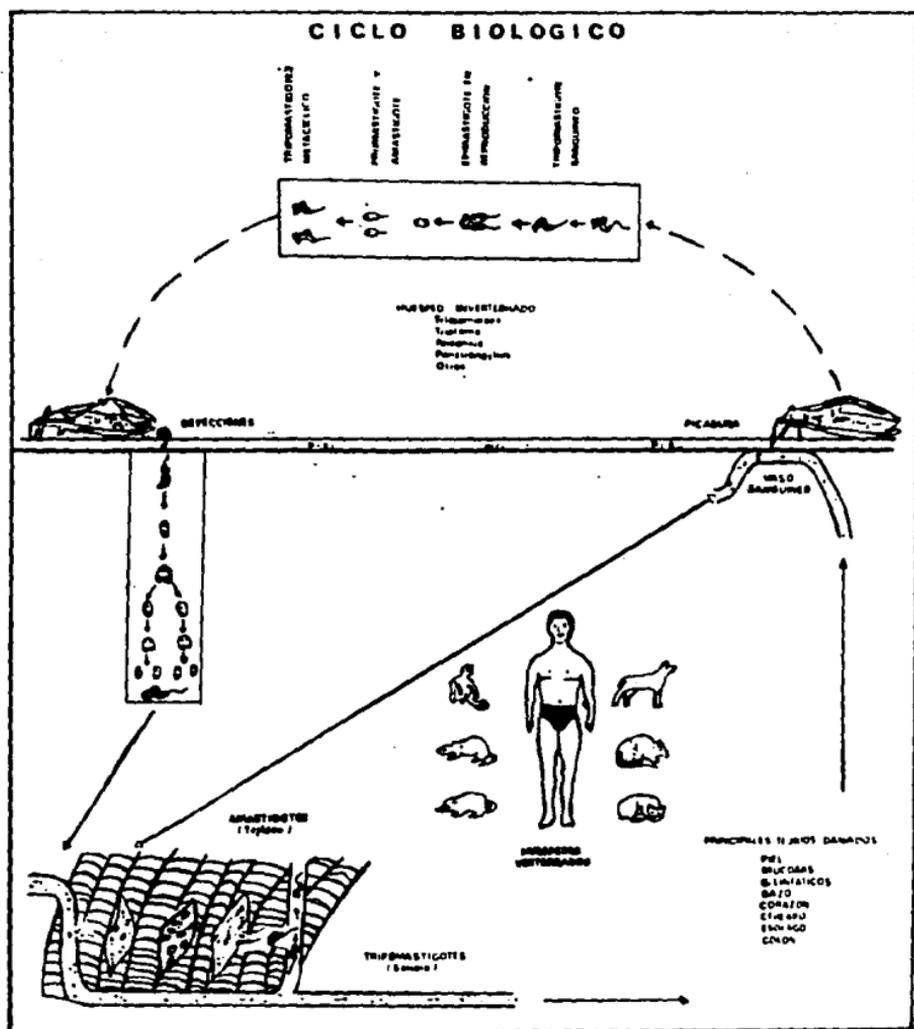


Fig. 5

1.5. TRANSMISORES

1. Se han encontrado triatóminos infectados con *Trypanosoma cruzi* en todos los Estados de la República Mexicana (36)(55).

Clasificación de los triatóminos vectores, según Lent(1979).

Phylum	:	Arthropoda
Subphylum	:	Antennata
Clase	:	Insecta
Orden	:	Hemiptera
Superfamilia	:	Reduvidoidea
Familia	:	Reduviidae
Subfamilia	:	Triatominae
Géneros	:	<i>Alberprosenia, Belminus, Bolbodera, Caverniola, Dipetalogaster, Eratyus, Linshcosteus, Microtriatoma, Panstrongylus, Parabelminus, Paratriatoma, Rhodnius, Triatoma.</i>

Se les conoce con multitud de nombres, dependiendo del Estado de la República, así por ejemplo se les puede llamar "pick", chinche de compostela, telaje, chinche hocicona, voladora (aunque la mayoría no vuela, a excepción de unas cuantas), besucona, etc., presenta dimensiones variables pero en general miden de 1.5 a 3.5 cm., tienen hábitos principalmente nocturnos, aunque algunas especies pican en plena luz del sol (63)(22).

2. El clima seco o cálido es preferido por éstos.

Se han descrito al menos 29 especies y subespecies del género Triatóma, una especie de cada uno de los géneros son los siguientes: *Rhodnius (R. prolixus)*, *Dipetalogaster (D. maximus)*, *Paratriatoma (P. hirsuta)*, *Belminus (B. costarricensis)*, *Panstrongylus (P. rufotuberculatus)*, y dos especies del

género *Eratyrus* (*E. cuspidatus*) y (*E. micronatus*) (63)(70).

Este número de géneros y especies hacen que México, junto con Brasil, tengan el primer sitio de diversidad de transmisores potenciales de enfermedad de Chagas.

1.6. RESERVORIOS

Se han realizado muy pocos estudios en nuestro país sobre los reservorios de *Trypanosoma cruzi*. El primer reservorio infectado reportado fué *Didelphys marsupialis* (tacuache) descrito en 1945 por Mazzetti; posteriormente se reportan como reservorios naturales *Dasyus novemcinctus* (armadillo), *Canis familiaris* (perro), *Rattus norvegicus* (rata), *Mus musculus* (ratón), *Sciurus vulgaris* (ardilla), *Neotoma sp.* (rata de campo) (36) (53) (65) (67) (71). Recientemente por xenodiagnóstico se logró aislar *T. cruzi* de *Bos taurus* (vaca) en la ciudad de Cuernavaca(71).

1.7. MECANISMOS DE TRANSMISION

Además de la vía clásica de transmisión por el triatómino, *T. cruzi*, puede ser transmitido por transfusión sanguínea, por vía transplacentaria y por vía digestiva. Existen otras formas de transmisión pero carecen de significación por lo insignificantes.

VIA CONTAMINATIVA O ESTERCOLARIA

La forma habitual en que *T. cruzi* infecta al hombre en áreas endémicas es por medio del hematófago infectado (triatómino) que después de alimentarse, deja sobre la piel o mucosas sus deyecciones conteniendo los parásitos. Estos parásitos atraviesan la piel herida o penetran por las mucosas por alguna solución de continuidad o inclusive la piel indemne, invadiendo las células adyacentes.

TRANSMISION POR TRANSFUSION SANGUINEA.

El segundo mecanismo de transmisión más importante para el hombre. Cerisola y cols. (16), verificaron que el riesgo de transmisión aumenta proporcionalmente con el número de transfusiones. Estos mismos autores comprobaron que el parásito puede permanecer viable hasta por lo menos 18 días en las condiciones en que habitualmente se conserva la sangre.

En México se han realizado estudios esporádicos en bancos de sangre con el propósito de encontrar portadores de la enfermedad de Chagas, hasta 1985 se habían realizado tres estudios, el primero en Oaxaca en 1978 realizado por Goldsmith y cols. encontrando que el 4% de los donadores de sangre estaban infectados por *T. cruzi* (27), el segundo en Puebla en 1984 realizado por el grupo de Velasco y cols. detectando el 17.5% de 200 hemodonadores del banco de sangre del Hospital Universitario (3) y, recientemente el 20% de los hemodonadores de la ciudad de Acapulco estaban infectados (72). Este mecanismo ha permitido la instalación del padecimiento en zonas libres de triatóminos ha éste fenómeno se le llama urbanización de la enfermedad de Chagas.

TRANSMISION TRANSPLACENTARIA

Durante la segunda mitad de gestación, los tripomastigotes sanguíneos de la madre pueden atravesar la barrera placentaria e infectar al producto, éste es a la vez capaz de responder a tal estímulo desde el punto de vista inmunológico sintetizando inmunoglobulinas del tipo IgM e IgG, hecho que se utiliza para el diagnóstico (72) (60) (43). Actualmente en la literatura Brasileña existen más de 100 casos de esta modalidad de transmisión y la misma no parece tener importancia epidemiológica equivalente a los anteriores mecanismos (73). En México no se conocen cifras.

TRANSMISION ACCIDENTAL

Ocurre en los centro de investigación a través de la mala manipulación de los cultivos, por inoculación de sangre de animales infectados, o de sangre de casos humanos agudos.

Cabe señalar una vigilancia ostensible y un rigor técnico bastante severo sobre el material y procedimientos para con el personal directamente vinculado con el parásito (2) (50). La contaminación oral aunque sospechada en algunos casos oscuros en la literatura, nunca fué confirmada para el hombre, no obstante su frecuencia entre carnívoros del ciclo silvestre. Esto no solo ocurre para la ingestión de mamíferos menores parasitados con *T. cruzi*, si no también por el hecho habitual de que algunos reservorios comen triatóminos infectados vivos.

TRANSMISION POR LECHE MATERNA

T. cruzi puede ser eventualmente aislado de leche materna, al respecto solo se ha reportado un caso en el que Mazza aisló el parásito de la leche materna (63).

TRANSMISION POR TRANSPLANTE DE ORGANOS

Una forma de transmisión que ha comenzado ha preocupar es la ligada al transplante de órganos. En este caso, si el donador está infectado los parásitos podrían originar una infección aguda en el receptor inmunosuprimido.

1.8. PATOLOGIA Y PATOGENIA

Posteriormente de que el *trypanosoma* ha penetrado al organismo a través de erociones de la piel, mucosas o a través de la piel indemne en condiciones favorables va ha invadir células del tejido subcutáneo y/o fibras musculares situadas bajo del lugar de inoculación.

Durante unos días los parásitos se multiplican en forma de amastigotes formando pseudoquistes, hacia el cuarto o quinto día se rompen las células parasitadas produciendo infiltración de polimorfonucleares, monocitos y linfocitos, con proliferación de histiocitos regionales sobre todo en ganglios linfáticos contiguos. Este foco inflamatorio se continúa ocupando, al centro de los histiocitos y los leucocitos alrededor, con encapsulación fibrótica eventualmente formandose la lesión primaria denominada CHAGOMA, el cual bloquea a los capilares linfáticos y produce edema local. Durante el proceso de multiplicación previo a la ruptura de la pared celular, los amastigotes se transforman en tripomastigotes, los cuales se distribuyen posteriormente a través de vasos sanguíneos y linfáticos llegando a ganglios linfáticos, bazo, hígado, médula ósea, ganglios mesentéricos, órganos huecos especialmente el tubo digestivo y el corazón.

La duración mínima del periodo de incubación en el hombre fluctúa entre 7 y 14 días, transcurriendo este tiempo da comienzo el desarrollo de la enfermedad en el que se distinguen los periodos: agudo, latente o indeterminado y crónico.

El periodo agudo tiene una duración menor de cuatro meses, generalmente es asintomático o solo aproximadamente el 5% de casos presentan cuadro clínico. La sintomatología más eruberante se presenta entre los 3 y 5 primeros años de vida, pero en general cursa asintomáticamente en grupos etáreos de más edad. Los casos agudos aparentes presentan: fiebre (como sintoma principal), hepatomegalia, esplenomegalia y adenopatías. Además se ha visto miocarditis difusa e intensa con amastigotes en franca multiplicación entre las miofibrillas. La meningoencefalitis se presenta particularmente en niños de corta edad.

El periodo latente o indeterminado, se presenta cuando ha transcurrido el periodo agudo, es decir, cuando desaparece la sintomatología. Se caracteriza por una multiplicación intracelular lenta de los parásitos y oligoparasitemia sin signos clínicos. Este periodo puede durar toda la vida o pasar a la forma crónica de la enfermedad.

El periodo crónico aparece después de diez o más años de la primo infección caracterizado por daños irreversibles de algunos parenquimas sobre todo corazón y órganos huecos. En esta etapa se establece un equilibrio dinámico entre el parásito (en nidos intracelulares) y las defensas del huésped, se caracteriza por una baja parasitemia en contraposición con un elevado y persistente nivel de anticuerpos.

Una alteración muy importante es la denominada cardiopatía chagásica crónica, forma más importante de alteración e incapacitación para el paciente chagásico y sobre todo la principal causa de muerte.

Entre sus componentes sídrómicos se consideran:

- a) Insuficiencia cardíaca congestiva.
- b) Arritmias y trastornos de conducción, etc..

Se presentan áreas eléctricamente fibróticas. Se presentan también formas digestivas, aunque su frecuencia en México es aparentemente baja. Se desarrollan trastornos digestivos que terminan con formación de megaesófago y megacolon. Son escasos los informes de la observación de megas chagásicos de otros órganos huecos (megauréter, megavejiga, etc.).

Los trastornos a nivel de motilidad del esófago provocan regurgitaciones y dolor epigástrico. En el megacolon, el signo cardinal es la constipación pertinaz y progresiva que provoca retención de material fecal durante quince o más días con un desarrollo enorme del abdomen (50)(9)(57)(23).

Tratando de explicarse la causa de la lesión tisular en la fase crónica de la enfermedad. Teixeira sugiere un mecanismo de hipersensibilidad retardada que podría producir lesiones cardíacas (69). Se ha revelado que fracciones subcelulares de células cardíacas y homogeneizado de *T. cruzi* contiene antígenos de reacción cruzada. Estos antígenos producen una reacción inmunitaria intensa de base celular y es causante de la interacción citotóxica.

1.9. METODOS DE DIAGNOSTICO SEGUN LA FASE DE LA ENFERMEDAD.

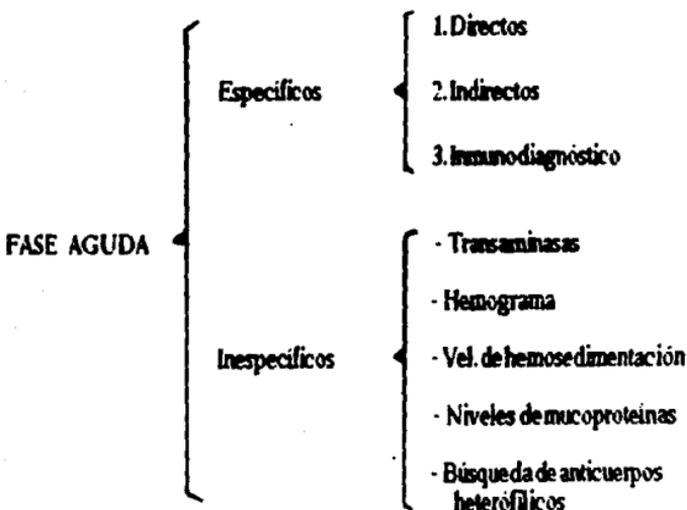
Debido a que la enfermedad de Chagas presenta características típicas en cada una de sus etapas, una orientación práctica para el diagnóstico en el laboratorio podría resumirse de la siguiente manera:

A). FASE AGUDA: Alta parasitemia, presencia de anticuerpos (IgM e IgG); Buscar en forma directa o indirecta al parásito, además de la detección precoz y seguimiento de la curva de anticuerpos específicos (IgM).

B). FASE INDETERMINADA: Baja parasitemia, presencia de anticuerpos (IgG e IgM) con títulos estables. Realizar xenodiagnóstico y serología (en esta fase, como se mencionó previamente el individuo es asintomático).

C). FASE CRONICA: Bajísima parasitemia, presencia de niveles de anticuerpos específicos. Realizar serología y si fuera necesario el xenodiagnóstico y otro método parasitológico indirecto.

CLASIFICACION DE LOS METODOS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA FASE AGUDA:



1.- METODOS ESPECIFICOS DIRECTOS

1.1.- EXAMEN EN FRESCO:

Es el procedimiento más utilizado, por su simplicidad, con una buena sensibilidad en la fase inicial (50-80% en el primer examen). Se debe obtener sangre del pulpejo de un dedo de la mano, preferentemente, el anular y examinar al microscopio entre un porta y un cubreobjetos, con objetivo de 40 aumentos, conviene recorrer todos los campos, especialmente los de la periferia del cubreobjetos.

1.2.- GOTA GRUESA:

Es una técnica preferida por algunos autores, por ser un poco más sensible al examen fresco. Una gota de sangre bastante luminosa, se deja secar sobre un portaobjetos bien limpio, sin fijación previa. Luego se cubre con una solución fuerte de Giemsa, para colorearla durante una hora. En seguida se lava delicadamente con agua y se examina con objetivo de inmersión.

1.3.- METODO DE STROUT:

Esté método alcanza el 95% de positividad en casos agudos. Consiste en extraer de 5 a 10 ml. de sangre por punción venosa y dejarla coagular. Inmediatamente después de la retracción del coágulo, éste se descarta y se centrifuga el suero a más o menos 3000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se centrifuga nuevamente más o menos a 4000 rpm durante 5 minutos se retira el suero y se observa el sedimento entre porta y cubreobjetos con el objetivo de 40 aumentos(56)(44).

1.4.- EXTENDIDO SANGUINEO COLOREADO:

No es una buena técnica ya que su sensibilidad es baja, puesto como se extiende la gota de sangre sobre el porta objetos se diluyen los parásitos y es más difícil encontrarlos.

2.- METODOS ESPECIFICOS INDIRECTOS

Son métodos de laboratorio indicados para la fase aguda, puesto que poseen alta sensibilidad, o para fines de evaluación preterapéutica en pacientes crónicos. Una desventaja es la demora (10 a 60 días) con la que se obtienen resultados.

2.1.- XENODIAGNOSTICO DIRECTO:

Consiste en la reproducción artificial del ciclo natural del parásito, a través de triatóminos sabidamente negativos, que chupan la sangre del paciente sospechoso (11), se utilizan 40 triatóminos, distribuidos en dos cajas (20 por caja), para su aplicación

en la cara ventral del antebrazo. Los triatóminos deben haber sido criados en el laboratorio debiendo ser alimentados solamente con sangre de ave, con ayuno previo de dos semanas como mínimo, antes de su utilización en el "xenodiagnóstico". El estadio dependerá de la especie que se selecciona. Así tenemos por ejemplo: para *T. infestans* el estadio de elección será el cuarto o quinto, para *T. pallidipennis* tercero o cuarto y para *D. maximus* el ideal será el primero (19). La selección de la especie depende del área geográfica de procedencia del individuo en estudio, ya que la sensibilidad del estudio suele ser mayor cuando se emplea la especie correspondiente a dicha región (54).

La realización del "Xenodiagnóstico" consiste en dejar que los insectos chupen la sangre durante 20 a 30 minutos. Después de retirar las cajas se deben limpiar preferentemente la piel con alcohol y aplicar una pomada con corticoides. Las cajas se deben dejar en un lugar oscuro, a temperatura entre 25 y 30°C. El examen de los insectos se hará luego de 30 a 60 días en pacientes crónicos y luego de 10 a 30 días en pacientes agudos. Se puede comprimir el abdomen de los triatóminos y obtener una gota de heces en solución salina para examinar con objetivo de 40 aumentos o se puede optar por desecar al insecto y estudiar el homogenizado del tubo digestivo.

El xenodiagnóstico es el método parasitológico más sensible para el reconocimiento de la enfermedad de Chagas aguda (95-100% de sensibilidad) aventajando a todos los demás métodos directos (59). En la etapa crónica sólo permite detectar parasitológicamente el 50% de los infectados lo que hace necesario su iteración (xenodiagnóstico seriado) a fin de aumentar la sensibilidad.

2.2.- XENODIAGNOSTICO INDIRECTO

Consiste en alimentar ninfas de *Rhodnius prolixus* con sangre heparinizada o citrada a través de una membrana artificial; se usan 10 ninfas en el cuarto estado a las que se han mantenido libres de parásitos y sin alimentar durante cuatro semanas, como mínimo, con lo que respecta a la membrana artificial se usa preservativo lubricado, tripa de ganado vacuno y papel parafinado.

El procedimiento consiste que para cada xenodiagnóstico se usan 5 ml. de sangre venosa humana, extraída en cantidades de 10 ml. del mismo paciente, para preparar de manera simultánea dos xenodiagnósticos. Inmediatamente después de la extracción se vierte en la membrana artificial con la ayuda de un tubo de plástico. Los xenodiagnósticos así preparados se ponen en contacto con los triatóminos; se dejan así a temperatura ambiente para que estos se alimenten; posteriormente se sacrifican a los 10-15 y 20 días después de la alimentación y se busca el parásito en las heces de estas.

2.3.-HEMOCULTIVO:

Es una técnica más sencilla que el xenodiagnóstico. La sensibilidad en los casos agudos y en congénitos se superpone a la del xenodiagnóstico. En casos crónicos. Chiari, Dias y Luna han demostrado una sensibilidad del 55%, contra el 30% en xenodiagnóstico practicados simultáneamente. El medio de cultivo más eficaz fué el LIT, pero da magníficos resultados el NNN (Novy, Nicolle y Mc Neal), triptosa, etc.(21).

2.4.-INOCULACION EN ANIMALES DE LABORATORIO:

Se usa preferentemente para casos agudos y trabajos experimentales (aislamiento de cepas). Se usan ratones albinos juvenes (10 a 15 g), o hámster. Conviene controlar diariamente la parasitemia de los animales luego de 7 a 8 días.

3.- METODOS ESPECIFICOS "INMUNODIAGNOSTICO"

Son útiles las reacciones comunes de detección de IgM: Hemaglutinación indirecta, Aglutinación directa, (cuanti y cualitativas), Inmunofluorescencia y ELISA. con muestras seriadas.

METODOS DE DIAGNOSTICO PARA LA FASE CRONICA:

El diagnóstico de laboratorio de infección chagásica crónica se determina por lo menos con dos reacciones serológicas positivas normalizadas y no se invalida por la ausencia del parásito en sangre, por los métodos usuales: xenodiagnóstico, hemocultivo.

Las combinaciones de las pruebas serológicas que pueden realizarse son (46).

- a).- Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Hemaglutinación indirecta (HAI)
- b).- IFI y aglutinación directa con 2-mercaptoetanol (AD-2-ME).
- c).- IFI y ensayo inmunoenzimático con peroxidasa (ELISA)
- d).- HAI y ELISA
- e).- HAI y AD-2-ME
- f).- ELISA y AD-2-ME.

PRUEBAS INMUNOLOGICAS.

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos generalmente formados cuando el parásito o cualquier microorganismo al introducirse se multiplican en el organismo humano.

T. cruzi puede ser considerado uno de los protozoarios antigénicamente más ricos (45) una infección de este determina, en el organismo del hospedero la aparición de varios tipos de anticuerpos. Este fenómeno da origen a los diversos métodos serológicos aplicados al diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Las diferentes formas evolutivas del *Trypanosoma cruzi* y las diversas formas de elaboración del antígeno frecuentemente dan como resultado grandes variaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad de las distintas pruebas serológicas, ésto se soluciona con la estandarización de la misma (12)(14)(76).

Las reacciones serológicas para la demostración de un anticuerpo frente a *T. cruzi* son bastante específicas, no se observan regularmente reacciones cruzadas derivadas de otras enfermedades infecciosas, parasitarias o de otra naturaleza, con excepción tanto de los sueros de leishmaniasis como de otras infecciones por tripanosomas (*T. gambiense* y *T. rhodesiense*)(47)(34)(33).

Las pruebas inmunológicas tienen indicación mayor en la fase crónica de la enfermedad y tienen los objetivos siguientes: Realizar diagnósticos individuales, conocer niveles de endemidad y seleccionar donadores de sangre.

La recolección de sangre para todas estas técnicas es simple. En general 8 ml. de sangre total es suficiente dejandola en reposo para la separación del suero este debe acondicionarse en pequeños frascos estériles y mantenerse en refrigeración. La conservación a largo plazo es mejor en congelador a 4°C y con la protección de un sobrenadante de glicerina. Hacen decrecer los títulos: La liofilización, los sucesivos procedimientos de inactivación, así como los congelamientos y descongelamientos y recongelamientos.

Los estudios serológicos se han llevado a cabo en sueros obtenidos de sangre extraída por punción venosa, pero debido a que la enfermedad de Chagas prevalece en áreas serodiagnósticas, las muestras tienen que enviarse a distintos centros de diagnóstico tornandose esto complicado. Para superar esta dificultad desde el año 1932 se publicaron trabajos donde la colección de sangre para el diagnóstico serológico de algunas enfermedades infecciosas, se efectuaba en papel filtro (20).

La colección de sangre sobre papel filtro ofrece una alternativa para la obtención de material para reacciones inmunodiagnósticas, especialmente en estudios

seroepidemiológicos de campo. Las muestras se pueden obtener fácilmente (dedo, lóbulo de la oreja o talón), los papeles secan con facilidad, no se necesitan preservativos, se pueden mantener a la temperatura ambiente y su transporte se realiza con facilidad (33) (1) (17). La utilidad del papel filtro ha sido demostrada en estudios seroepidemiológicos de diversas enfermedades tales como sífilis (Chediak, 1932; Zimmermann, 1939; Canfax y col, 1932), para leishmaniasis (Fellegrino y Brener, 1958), esquistosomiasis (Anderson Sedun y Williams, 1961), amibiasis (Mathews y col., 1980) y para tripanosomiasis ((Maekelt, 1960; Sedun, 1963 Souza y Camargo, 1966; Neal-Miles, 1970; Alvares, Rissio en 1971, Goldsmith-Kagan, 1974 y Contreras-Rojas en 1984).

En cuanto a la sensibilidad, algunos estudios realizados comparando los resultados obtenidos con sueros de muestras de sangre extraídas por punción venosa y con el eluido de papel filtro de muestras obtenidas por punción capilar, utilizando las diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se ha llegado a la conclusión que existe una concordancia de aproximadamente del 93% entre estos casos (47) (17) (37) (52) (58) (38) y (62). Las técnicas más apropiadas para la determinación de anticuerpos anti *T. cruzi*, en eluidos de sangre de papel filtro son la inmunofluorescencia y la hemaglutinación indirecta.

II. ANTECEDENTES

Los antecedentes muestran a través de los estudios de investigación realizados, que el Estado de Morelos es por sus características geográficas y socioeconómicas, una zona endémica para la enfermedad de Chagas y por lo tanto tiene todos los factores para que exista la posibilidad de transmisión.

Posteriormente al descubrimiento de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana en 1909 por Carlos Chagas en Brasil, se diagnosticó por Miller en 1913 en el Salvador, a partir de 1919 en Venezuela y Perú, en 1931 en Panamá en esa misma época en el resto de los países sudamericanos, convirtiéndose en poco tiempo un grave problema médico-social en países como Brasil, Argentina y Venezuela.

En México en 1940, Mazzotti publicó los dos primeros casos autóctonos de la enfermedad de Chagas en la población de Tejomulco, en el Estado de Oaxaca (41), Palomo (Mazzotti y Diaz en 1949), informó dos casos en Mérida Yucatán (39), Biagi confirmó en 1958 el quinto caso mexicano de enfermedad de Chagas aguda en Tutuapan, Edo. de Méx. (4). Posteriormente varios autores refirieron casos humanos agudos comprobados parasitológicamente en varias localidades: Palencia y Montaña en 1959 en Guaymas Edo. de Sonora (65), Tay y col. en Tuxpan, Edo. de Michoacán (64), en 1969 Cuartero y col. informaron de cinco casos humanos en el Edo. de Jalisco y Zacatecas (18) Biagi y Tay (1964) en Tetitlán, Edo. de Guerrero (6).

En cuanto a encuestas seroepidemiológicas la primera fue realizada en 1946 por Díaz en Apatzingán Michoacán; (42). Así se han continuado los reportes esporádicos de casos y/o encuestas seroepidemiológicas y para 1984 existían tres casos crónicos confirmados parasitológicamente notificados.

En el Edo. de Morelos el último estudio seroepidemiológico fue realizado por Guzmán Bracho Carmen en Progreso Jiutepec, en 1985.

En 1985, se habían reportado aproximadamente 360 casos diagnosticados por reacciones serológicas y/o xenodiagnóstico, la mayoría por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (I.S.E.T.).

III. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Debido a que habitantes de Ahuehuetzingo Morelos reportaron la presencia de triatóminos (chinchas) al laboratorio de Tripanosomátidos del I.S.E.T.; éstas al ser analizadas se encontró que estaban infectadas con *Trypanosoma cruzi* por lo que el jefe del laboratorio Dr. Oscar Velasco Castrejón junto con la Subjefe del laboratorio la Q.F.B. Carmen Guzmán Bracho proponen el tema de Tesis: **ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS EN AHUEHUETZINGO MORELOS.**

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida en la República Mexicana, ya que se han encontrado casos humanos confirmados en 17 Edos. (73), además de especies de triatóminos excelentes vectores como: *T. barberi*, *T. pallidipenis*, *T. dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (65)(48)(40).

Este padecimiento ha sido escasamente estudiado en nuestro país debido a la falta de conocimiento por el personal médico y paramédico y a la carencia de estudios epidemiológicos que nos permiten conocer: su distribución geográfica (localización de zonas endémicas) tasas de seropositividad, presencia de vectores infectados, estudios de reservorios y condiciones ecológicas favorables.

Estudios todos ellos que llegan a establecer el riesgo al que se encuentra expuesta la población y permiten en un momento dado crear programas de control convenientes. Teniendo en cuenta que el Edo. de Morelos es considerado zona endémica y la localidad a estudiar (Ahuehuetzingo Morelos), es una zona rural con condiciones ecológicas, geográficas y económicas propicias para la supervivencia del transmisor.

V.OBJETIVOS

1.- Determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en individuos residentes de Ahuehuetzingo Morelos.

2.- Determinar la prevalencia de la infección en individuos residentes de dicho poblado através de dos técnicas inmunológicas:

- Hemaglutinación indirecta (HAI)
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

3.- Conocer las características de vivienda y demográficas de los individuos de Ahuehuetzingo que favorecen la transmisión de la enfermedad de Chagas.

4.- Determinar la relación que existe entre la seropositividad y algunos factores demográficos y de vivienda de los individuos estudiados.

VL HIPOTESIS

Considerando al Edo. de Morelos y en lo particular al poblado de Ahuehuetzingo que reúne las condiciones adecuadas para contraer la enfermedad de Chagas, suponemos que existe gente parasitada con *T. cruzi* el cual puede identificarse mediante las técnicas de Hemaglutinación indirecta e Inmunofluorescencia indirecta que detectan anticuerpos contra dicha enfermedad.

VII.-MATERIAL METODOS Y REACTIVOS

a).- Material para la colecta de muestras

Mapa del poblado de Ahuehuetzingo Morelos
 Tubos de ensayo de 13 x 100 mm. estériles
 Geringas estériles de plástico de 5 ml.
 Torundas con alcohol al 70%
 Ligaduras
 Tela adhesiva para la identificación de muestras
 Gradillas
 Cuestionarios
 Lápices y bolígrafos
 Ejemplares de triatóminos (chinches)

b).- Material y equipo utilizado en el laboratorio de tripanosomátidos

Pipetas Pasteur estériles
 Placas de microtitulación (Marca Nuncion) de 96 pozos para realizar Hemaglutinación indirecta
 Algodón absorbente
 Aplicadores de madera
 Cámara húmeda (caja para 25 preparaciones color negro con acondicionamiento de papel filtro húmedo)
 Portaobjetos de 26 x 72 con 12 compartimentos para diluciones seriadas
 Cubreobjetos de 22 x 22
 Soporte para la lectura de placas de microtitulación
 Termómetro
 Centrifuga clínica
 Campana de flujo laminar (Marca VECO sin luz ultravioleta)
 Microscópio de epifluorescencia (Marca ZEISS)
 Refrigerador para la conservación de muestras a 4° C
 Baño María (56° C)

METODOLOGIA

A).- RECOLECCION DE MUESTRAS

Se realizó un mapa de Ahuehuetzingo Morelos.

Se sorteó todas las viviendas existentes.

Se localizó en el mapa las viviendas seleccionadas.

Mediante una breve plática se trató de convencer a la gente para que nos donará un poco de su sangre explicándole que está va a ser analizada para saber si está o no infectada con el parásito (*T. cruzi*).

Al mismo tiempo de la toma de muestra se realizó un levantamiento de encuesta donde se obtuvieron datos de identificación de cada individuo, así como las condiciones de vivienda que habitan.

Se tomó de 3 a 4 ml. de sangre a cada paciente y se etiquetó con su respectivo nombre.

Una vez obtenidas y reunidas todas las muestras, fueron trasladadas al laboratorio de tripanosomátidos para procesarlas.

B).- EN EL LABORATORIO

Se registraron todas las muestras en la libreta control del laboratorio.

Se removió suavemente el coágulo con un aplicador para evitar la hemólisis.

Se centrifugan las muestras durante 10 min. a 3000 rpm.

Se transfirió el suero con pipetas Pasteur estériles a tubos de ensayo de 12 x 75 mm. en condiciones de esterilidad.

Inactivar al suero a 56° C durante 30 min.

Determinación de anticuerpos anti- *T. cruzi* por los métodos de hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta.

C).-PRUEBA DE MICROHEMAGLUTINACION INDIRECTA

FUNDAMENTO:

El antígeno de *T. cruzi* en solución se adhiere a la superficie de los eritrocitos tratados con ácido tánico, mediante adsorción inespecífica. En la segunda parte se requiere de anticuerpos específicos ya que la reacción antígeno-anticuerpo provoca aglutinación evidente de los eritrocitos portadores.

Aunque el mecanismo de acción aún no ha sido esclarecido, el ácido tánico actúa sobre la membrana de los eritrocitos de tal modo que aumenta la adsorción de los antígenos; sin embargo se ha demostrado que las células rojas sin tratar adsorben tales antígenos y llegan a ser aglutinables sin el proceso de tñado, pero su sensibilidad es menor (10).

En estudios posteriores se ha establecido que la función del ácido tánico es aumentar la aglutinación de las células rojas sensibilizadas por lo que es necesario balancear este efecto aglutinable con un estabilizador como lo es el suero normal de conejo (30).

La sensibilización se lleva a cabo por simple adsorción del antígeno con los eritrocitos tratados con ácido tánico.

Las células así tratadas son capaces de aglutinarse en presencia de pequeñas cantidades de su anticuerpo específico.

MATERIAL:

Placas de microtitulación marca Nunclon de 96 pozos para realizar hemaglutinación indirecta.

Micropipetas graduadas de 20 µl, 100 µl, 1000 µl.

Microdilutores de 25 µl.

Soporte para la lectura de placas de microtitulación

REACTIVOS:

Antígeno de referencia proveniente del Instituto Nacional de Diagnóstico "Dr. Mario Fatala Chaben" Buenos Aires, Argentina.

Sueros control positivo y negativo

Sueros problema

Solución salina amortiguadora con fosfatos pH 7.2 (PBS 7.2) Solución madre.

TECNICA

A).-En una placa colocar en cada pocillo 25 μ l de PBS pH 7.2 con las micropipetas.

B).-Con los microdilutores de (25 μ l) tomar una muestra de sueros problemas a investigar.

C).-Colocar los microdilutores cargados en la fila A del pozo No.1 al No.12, rotando los mismos no menos de 15 veces y pasandolos progresivamente efectuando cada vez el mismo número de rotaciones en las filas subsiguientes B,C,D, etc. completando así las diluciones correspondientes (es necesario controlar en un papel absorbente las cargas y descargas del dilutor).

D).-Es imprescindible el uso de un testigo positivo y negativo de título conocido, cada vez que se evalúe sueros con esta técnica, procesandolos de la misma forma que los sueros problema.

E).-Efectuando los dos puntos anteriores colocar con una micropipeta 25 μ l de la suspensión antigénica en cada pocillo agitando luego con suaves golpes en los bordes de la placa.

F).-Tapar la placa y dejarla en reposo durante 30 min. y al termino de estos leerla.

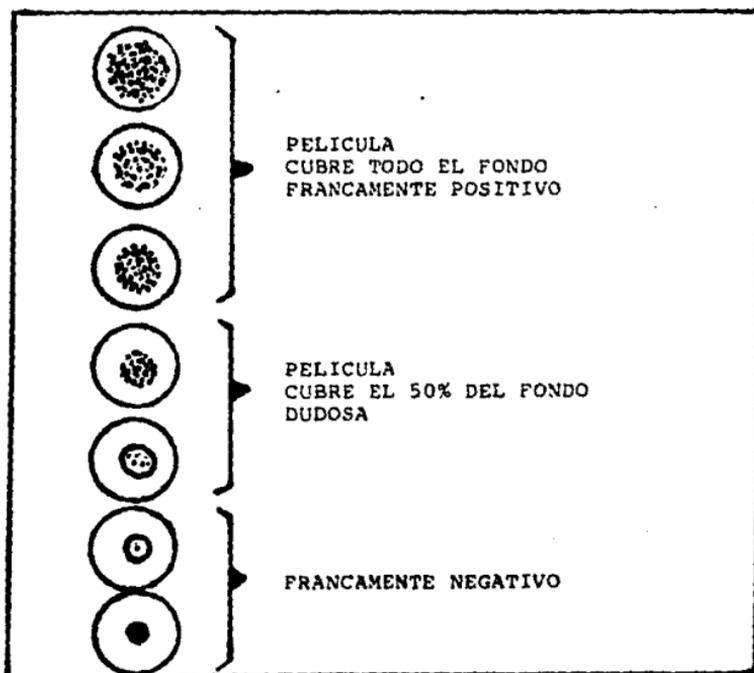
LECTURA DE LA REACCION

a).-La reactividad del suero se manifiesta por la formación de un manto que cubre el fondo del pocillo.

b).-La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón pequeño anillo en el borde regular.

c).-Se considera imágenes positivas a aquellas en las que el manto o película formada cubre el fondo del pocillo en su totalidad o hasta un 50% del mismo presentando bordes irregulares.

LA DILUCION MAS ALTA DEL SUERO QUE DETERMINA UNA CLARA HEMAGLUTINACION, SE CONSIDERA COMO PUNTO FINAL DE LA REACCION Y REPRESENTA EL TITULO DE ANTICUERPOS.



D).- REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

FUNDAMENTO:

El principio del método de anticuerpos fluorescentes (Coons 1942), denominado también como prueba del doble anticuerpo consiste en la unión del anticuerpo específico no marcado con el antígeno de superficie correspondiente. En la segunda parte de la reacción, se fija la antigamaglobulina fluorescente al anticuerpo (anti *T. cruzi*) revelando la primera reacción Ag-Ac, mediante el uso de un microscopio adaptado con lámpara de luz ultravioleta o de longitud de onda menor y filtros adecuados. La luz llega al anticuerpo fluorescente, es absorbida por el fluorocromo y posteriormente emitida como luz visible, observándose fluorescencia (luz amarillo-verdosa) en el contorno del parásito.

MATERIAL:

Microscopio: Se puede usar cualquier microscopio común con óptica de buena calidad equipo con un condensador ultravioleta. La fuente luminosa debe contar con filtros excitadores que dejan pasar selectivamente la luz azul, además se debe contar con un filtro barrera que impida el paso del exceso de luz no absorbida por el objeto hacia el ojo del observador. El microscopio utilizado es Marca ZEISS con lámpara para epifluorescencia.

Estufa a 37 °C

Refrigerador a 4 °C

Secador de aire caliente (Marca Braun)

Cámara húmeda

Portaobjetos de 26 x 72 con 12 compartimentos para diluciones seriadas

Cubreobjetos de 24 x 50

Matraces aforados de 1000 ml.

Pipetas graduadas de 0.2, 1.0 y 10 ml.

Frasco gotero pequeño de poliestireno, para líquido de montaje

Aceite de inmersión de baja fluorescencia, no secante

Papel filtro.

REACTIVOS:

Antígeno para inmunofluorescencia indirecta

Azul de Evans

Antigamaglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína

Líquido de montaje

Sueros controles

Sueros problema

TECNICA

1).- Sacar del congelador las laminillas antigénicas y dejarlas a temperatura ambiente durante más o menos 15 a 20 min.

2).- Colocar en gradillas tubos de 12 x 75

3).- Hacer diluciones de los sueros problema, control negativo y positivo a partir de una dilución de 1:2 hasta 1:2048.

4).- Agregar 10 μ l de suero diluido a los pocillos de las laminillas antigénicas. Este paso es para cada una de las diluciones realizadas.

5).- Hacer el paso anterior para los controles positivo y negativo.

6).- Incubar las laminillas con los sueros controles y problema en cámara húmeda durante 30 min. a 37 °C.

7).- Lavar las laminillas transcurrido este tiempo con PBS-IFI y secarlas a temperatura ambiente.

8).- Preparar el volumen necesario a ocupar de antigammaglobulina humana marcada y de azul de evans de acuerdo a los títulos de estos.

NOTA: La preparación de la mezcla anterior no debe de usarse después de dos horas.

9).- Colocar 10 μ l de la solución anterior a cada pocillo de las laminillas en las diluciones realizadas. Incubar a 37 °C en cámara húmeda por 30 min.

10).- Lavar de igual forma que en el inciso 7.

11).- Secar a temperatura ambiente.

12).- Colocar los cubreobjetos con una gota de líquido de montar.

13).- Leer en microscopio de inmunofluorescencia.

LECTURA DE LA REACCION

1).- Proceder a la lectura de los testigos previamente a la de los problemas.

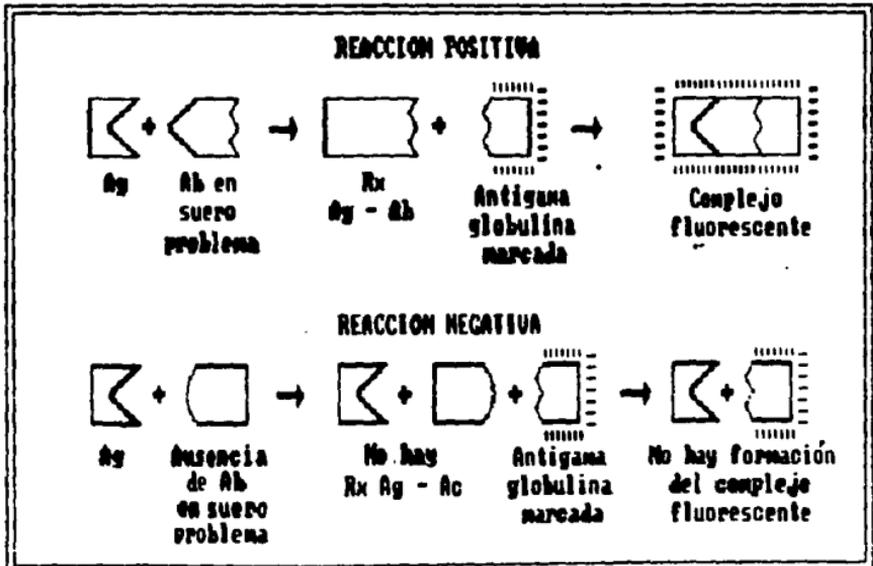
2).- Testigo de inmunofluorescencia inespecifica: está constituido por la suspensión antigénica incubada en PBS-IFI durante los primeros 30 min. de fijación. Al microscopio los parásitos deberán presentar una coloración rojiza y no mostrar fluorescencia.

3).- Testigo negativo: el suero negativo debe presentar el mismo aspecto que el testigo anterior.

4).- Testigo positivo: el suero control positivo debe presentar los parásitos teñidos con el fluorocromo, o sea de un color fluorescente. La fluorescencia es particularmente intensa en la membrana y en el flagelo del parásito.

5).- Las lecturas positivas deben ser observables hasta la dilución reactiva del suero positivo que se utiliza.

REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA



E).-REACTIVOS UTILIZADOS EN HAI E IFI**I.- BUFFER DE FOSFATOS SALINO pH 7.2 (PBS-IFI)**

a).- Fosfato disódico monohidrogenado 0.1 M

Na₂HPO₄ ————— 14.2 g

Agua destilada ————— 1000 ml

b).- Fosfato de sodio dihidrogenado 0.1 M

NaH₂PO₄ ————— 13.8 g

Agua destilada ————— 1000 ml

c).- Solución salina 0.85%

NaCl ————— 8.5 g

Agua destilada ————— 1000 ml

De las soluciones a) y b) colocar las siguientes cantidades en un matraz volumetrico y aforar con la solución c).

Na₂HPO₄ ————— 71.5 mlNaH₂PO₄ ————— 28.5 ml

NaCl 0.85% ————— 900 ml

Mezclar completamente y ajustar a pH 7.2

II.- BOFFER DE FOSFATOS SALINOS pH 7.2 (PBS-HAI)

a).- Fosfato disódico monohidrogenado 0.15 M

Na₂HPO₄ ————— 21.3 g

Agua destilada ————— 1000 ml

b).- Fosfato monopotásico dihidrogenado 0.15 M

KH₂PO₄ ————— 20.4 g

Agua destilada ————— 1000 ml

SOLUCION FINAL:

Tomar 72 ml de la solución a)

Tomar 28 ml de la solución b)

Poner 8.5 g de NaCl

Y todo esto aforar a 1000 ml con agua destilada

pH de la solución final 7.2

III.- ANTIGENO PARA HEMAGLUTINACION INDIRECTA

Se utilizó antígeno de referencia proporcionado por el Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas " Dr. Mario Fatala Chaben " Buenos Aires Argentina. Este antígeno se reconstituye con la cantidad de PBS-HAI indicada en la etiqueta.

IV.- ANTIGENO PARA REACCION DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

PREPARACION: El antígeno está constituido por epimastigotes de *T. cruzi* tratados con formol.

Obtener los parásitos de cultivo en medios bifásicos sin sangre. Es importante que sean en la fase de crecimiento exponencial para que los parásitos esten aislados y no formen rosetas.

Filtrar por capa fina de algodón (para eliminar agar).

Centrifugar durante 10-20 min a 5000 rpm.

Decantar y lavar el sedimento dos veces con SSI, en iguales condiciones que en el paso anterior.

Después del último lavado, suspender en solución salina isotónica con formol al 1%.

Agregar lentamente y agitar bien para homogenizar.

Dejar a temperatura ambiente durante 24 hrs., agitando varias veces.

Conservar en el refrigerador a 4 °C hasta el momento de su uso.

V.- PREPARACION DE AZUL DE EVANS

Se preparó una solución de azul de evans al 1% en PBS-IFI

VI.- PREPARACION DE LIQUIDO DE MONTAJE

Glicerina bidestilada neutra ————— 9 partes
PBS-IFI pH 7.2 ————— 1 partes

VII.- ANTIGLAMAGLOBULINA HUMANA MARCADA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEINA.

(CONJUGADO): Existen en el comercio diversas marcas de este reactivo. Los preparados comerciales son de muy variada calidad, por lo que es necesario controlar cada lote y titular cuidadosamente. Determinar el título de la antigamaglobulina marcada para cada equipo microscópico, pues éste depende de la fuente de iluminación y del sistema óptico a utilizar.

VIII.- SUEROS CONTROLES

Se utilizó un suero control positivo y negativo con títulos conocidos, proporcionado por el Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales SSA.

IX.- SUEROS PROBLEMA

Se inactivaron previamente a 56 °C durante 30 min.

VIII.-RESULTADOS

Los resultados que a continuación se presentan ofrecen un panorama acerca de ciertas características demográficas y de vivienda de los individuos encuestados.

En el cuadro No.1 se presentan las distribuciones porcentuales por grupo de edad de la población estudiada. Observándose que se trata de una población heterogénea (ver gráfica No.1).

En el cuadro No.2 se muestran las distribuciones por sexo de la muestra estudiada: el 74.54% correspondió al sexo femenino y el 25.45% correspondió al sexo masculino. Esta marcada diferencia es debido a que cuando se realizó la visita domiciliaria para la toma de muestra, se encontraba en su mayoría las madres y los escolares.

En cuanto al tipo de vivienda que habitan los individuos estudiados se observó un mayor porcentaje de personas que habitan viviendas precarias (38.18%) (cuadro No.3) (clasificación hecha en base al tipo de material utilizado en la construcción de su vivienda).

En el cuadro No.4 muestra el índice de hacinamiento y tipo de vivienda, donde se presenta el número de cuartos empleados como dormitorio por vivienda y personas que lo utilizan, así como la cantidad de encuestados que viven en esas condiciones.

Se obtuvieron en total 55 muestras; de las cuales 6 resultaron positivas a ambas pruebas (HAI e IFI).

MUESTRA	HAI	IFI
	TITULO	
8838	1:16	1:32
8839	1:16	1:32
8844	1:128	1:256
8845	1:32	1:64
8856	1:8	1:32
8863	1:8	1:32

La prevalencia de anticuerpos antichagásicos en Ahuehuetzingo Morelos fué del 10.90% (6/55) (cuadro No.5)

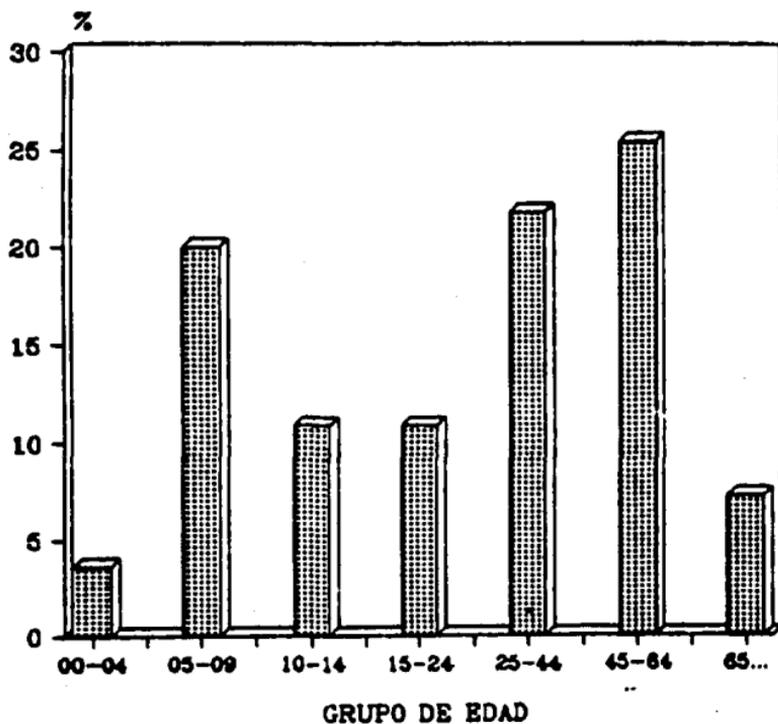
La seropositividad se observó más elevada en el tercer grupo etáreo (10-14 años) y en el último (mayor o igual a 65 años). El porcentaje es relativo.

Para el sexo femenino la reactividad positiva fué del 100% (cuadro No.6).

En lo que se refiere al tipo de vivienda se encontró que la seropositividad esta dividida en un 50% para precaria y el otro 50% para la adecuada (cuadro No. 7 y gráfica No.4).

Los datos sobre hacinamiento por vivienda y su relación con la reactividad serológica a *T. cruzi* se resume en el cuadro No.8, donde se observa que es mayor la seropositividad en las viviendas con más de tres personas/dormitorio.

**DISTRIBUCION DE LA POBLACION ESTUDIADA
SEGUN GRUPO DE EDAD
Ahuehuetzingo, Mor., 1989**



GRAFICA No.1

Fuente: Cedula de encuesta

CUADRO No. 1

DISTRIBUCION POR GRUPO DE EDAD DE LA POBLACION ESTUDIADA

ahuchuetzingo, Morelos 1989

Grupo Etareo	Población Estudiada	%
00-04	02	3.63
05-09	11	20.00
10-14	06	10.90
15-24	06	10.90
25-44	12	21.81
45-64	14	25.45
65 -	04	7.27
TOTAL	55	100.00

FUENTE.- Cédula de encuesta.

CUADRO No. 2

DISTRIBUCION DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

Ahuehuetzingo, Morelos 1989

Grupo Etareo	MASCULINO		FEMENINO		TOTAL
	Número	%	Número	%	
00 - 04	02	3.63	00	0.00	02
05 - 09	04	4.27	07	12.72	11
10 - 14	02	3.63	04	7.27	06
15 - 24	00	0.00	05	10.90	05
25 - 44	02	3.63	10	18.18	12
45 - 64	03	5.45	11	20.00	14
65 ...	01	1.81	03	5.45	04
TOTAL	14	25.45	41	74.54	55

FUENTE.- Cálculo de la encuesta

* Por ciento relativo por grupos etareo

CUADRO No.3

DISTRIBUCION DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS SEGUN TIPO DE VIVIENDAS

Abascoztzingo, Morelos 1989

TIPO DE VIVIENDA	NUMERO DE INDIVIDUOS	% TASA
PRECARIA	21	38.18
REGULAR	14	25.45
ADECUADA	20	36.26
TOTAL	55	100.00

FUENTE.- Cédula de encuesta

CUADRO No. 4

INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

Ahuchuatzingo, Morelos 1989

NUMERO DE DORMITORIOS	NUMERO DE HABITANTES POR VIVIENDA							
	1 - 3		4 - 6		7 - 9		TOTAL	
	NUM	%	NUM	%	NUM	%	NUM	%
1	3	5.4	10	18.1	7	12.7	20	36.2
2	14	25.4	8	14.5	8	14.5	30	54.2
3	-	-	-	-	3	5.4	3	5.4
4	-	-	2	3.6	-	-	2	3.6
TOTAL	17	30.8	20	36.2	18	32.6	55	99.6

FUENTE.- Cálculo de la encuesta

* Por ciento relativo por grupos etareo

CUADRO No. 5

INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS SEGUN GRUPO DE EDAD

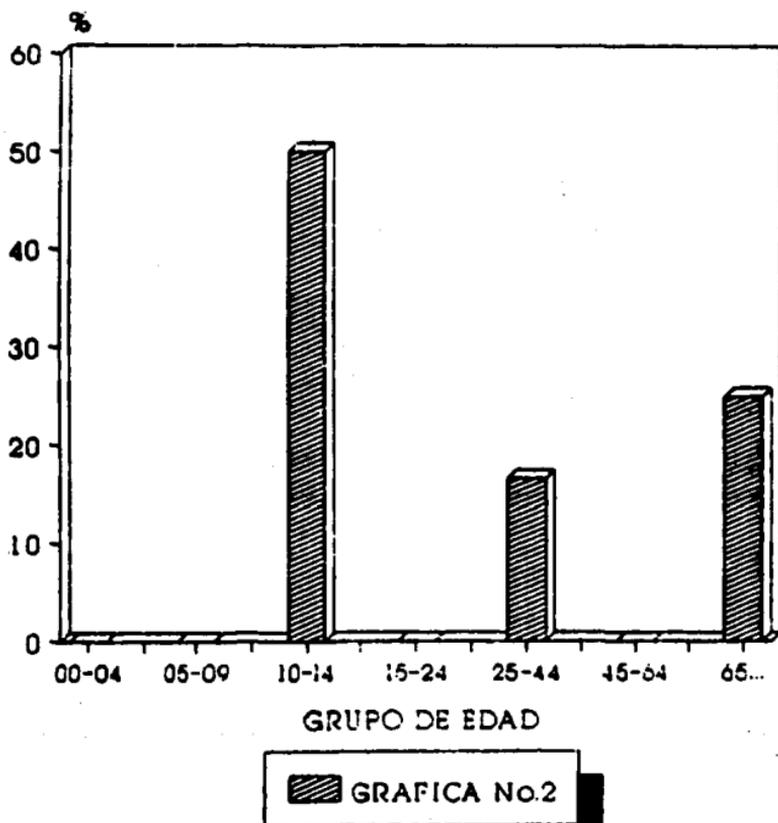
Ahuehuetzingo, Morelos 1989

Grupo Etareo	Individuos estudiados	Individuos positivos	Por ciento de positividad
00 - 04	02	0.0	0.0
05 - 09	11	0.0	0.0
10 - 14	06	3.0	50.0
15 - 24	06	0.0	0.0
25 - 44	12	2.0	16.6
45 - 64	14	0.0	0.0
65 ...	04	1.0	25.0
TOTAL	55	6.0	10.9

FUENTE.- Cálculo de la encuesta

* Por ciento relativo por grupo etareo

**PORCENTAJE DE INDIVIDUOS SEROPOSITIVO
SEGUN GRUPOS DE EDAD
Ahuehuetzingo, Mor., 1989**



Fuente: Cédula de encuesta

CUADRO No. 6

INDIVIDUOS SEROPOSITIVOS POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

Ahuehuetzingo, Morelos 1989

Grupo etareo	MASCULINO		FEMENINO	
	Positivos estudiados	%*	Positivos estudiados	%*
00 - 04	0/2	0.0	0/0	0.0
05 - 09	0/4	0.0	0/7	0.0
10 - 14	0/2	0.0	3/4	75.0
15 - 24	0/0	0.0	0/6	0.0
25 - 44	0/2	0.0	2/10	20.0
45 - 64	0/3	0.0	0/11	0.0
65 ...	0/1	0.0	1/3	33.3
TOTAL	0/14	0.0	6/41	10.9

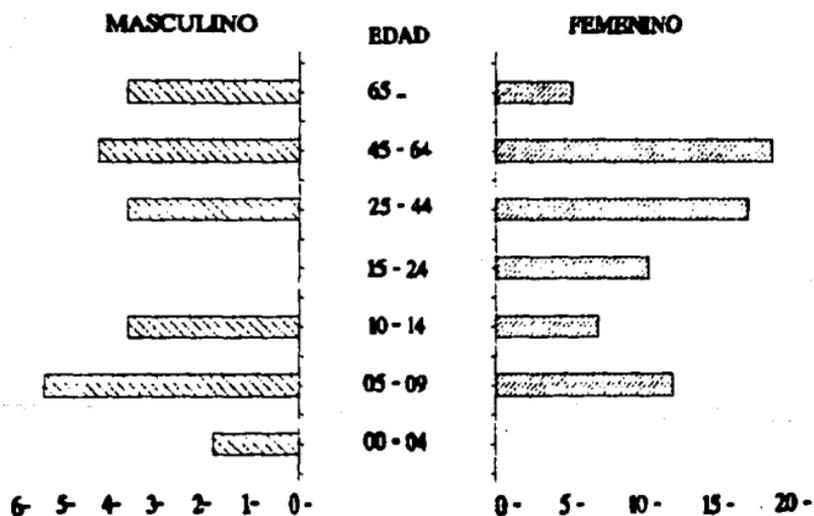
FUENTE.- Cálculo de la encuesta

* Por ciento relativo por grupos etareo

GRAFICA No. 3

DISTRIBUCION DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

Atrahehuatzingo, Morelos 1989



CUADRO No. 7

SEROPOSITIVOS Y TIPO DE VIVIENDA QUE HABITAN LOS INDIVIDUOS

Ahuehuetzingo, Morelos 1989

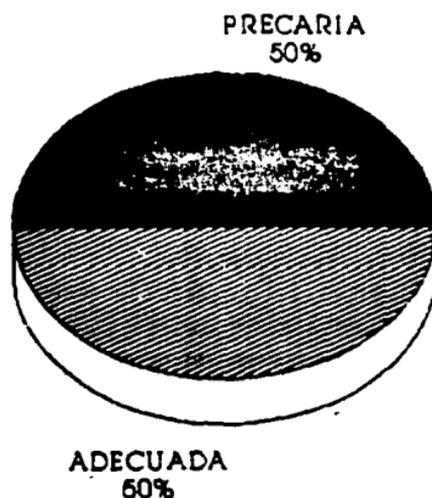
TIPO DE VIVIENDA	NUMERO DE INDIVIDUOS ESTUDIADOS	NUMERO DE INDIVIDUOS POSITIVOS	% TASA
PRECARIA	21	3	14.2
REGULAR	14	-	-
ADECUADA	20	3	15.0
TOTAL	55	6	10.9

FUENTE.- Cédula de encuesta

* Por ciento relativo por tipo de vivienda

**SEROPOSITIVIDAD Y TIPO DE VIVIENDA
QUE HABITAN LOS INDIVIDUOS
Abuehuetzingo, Mor., 1989**

GRAFICA No. 4



6 CASOS ES EL 100 %

Fuente: Cédula de encuesta

CUADRO No. 8

HACINAMIENTO Y SEROPOSITIVIDAD DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Ahuehuetzingo, Morelos 1989

	NUMERO DE INDIVIDUOS ESTUDIADOS	%	NUMERO DE INDIVIDUOS POSITIVOS	%
A	21	45.45	4	66.6
B	14	54.55	2	33.3
TOTAL	55	100.00	6	100.00

FUENTE.- Cédula de encuesta

A: MAS DE TRES PERSONAS POR DORMITORIO POR VIVIENDA.

B: MENOS DE TRES PERSONAS POR DORMITORIO POR VIVIENDA

IX.-DISCUSION

La enfermedad de Chagas es un problema propio de áreas rurales y suburbanas, parece ser que la susceptibilidad es universal no importa la raza, edad o el sexo, no así, el estrato socioeconómico, cuyo estrato más bajo que conlleva; miseria, analfabetismo y desnutrición, es quien lo sufre más.

Poco son los estudios seroepidemiológicos realizados en el país, para tratar de determinar la prevalencia de esta infección y portanto, identificar áreas endémicas.

Con el propósito de contribuir al conocimiento de la distribución de la enfermedad Chagásica en México, se realizó este estudio seroepidemiológico en Ahuehuetzingo Morelos.

Ahora podemos asegurar que esta localidad se encuentra dentro de una zona endémica ya que aunado a las favorables condiciones ecológicas y socioeconómicas que ya se han descrito, el estudio serológico reveló una positividad del 10.90% a Anticuerpos Anti- *T. cruzi*

Respecto a la edad; se observa que es heterogenea como lo muestra la gráfica 1, siendo el sexo femenino el de mayor porcentaje (74.54%), debido a que durante la visita domiciliaria fueron ellas quienes estuvieron en la vivienda, con mayor frecuencia seguida por los escolares.

Considerando el total de la población estudiada, se puede decir que las actividades productivas más frecuentes son la de estudiante y ama de casa los campesinos posiblemente debido a su trabajo no estuvieron en su vivienda a la hora de la toma de muestra.

Por lo que se refiere al tipo de vivienda y a la cantidad de personas que la habitan por cuarto (hacinamiento), la predominante fué la que de acuerdo a la clasificación empleada corresponde a la categoría precaria; ésto debido a que la localidad de Ahuehuetzingo Morelos es una población suburbana donde existe un alto índice de personas de bajos recursos, lo cual, es un factor de riesgo importante para la enfermedad de Chagas, ya que el desarrollo del trasmisor se favorece con este tipo de vivienda y las posibilidades de que se infecte un número mayor de personas aumenta de manera considerable.

Respecto al conocimiento que la población tiene sobre los vectores, la mayoría de los individuos (67.27%) aseguraron conocerlo y sólo el 10.90% citaron haber sido picados por éstos; lo anterior, significa que hay una estrecha convivencia entre las personas y los vectores, aunque no conocían el riesgo que representa ser picado por este trasmisor, además de que por picar durante la noche al estar dormidos no lo notan, no dándole importancia al control de estos insectos.

Se considera, que la población inmigrante no tiene mayor importancia para la prevalencia de la enfermedad de Chagas en la localidad de Ahuehuetzingo Morelos, ya que se observan que en su mayoría es población autóctona y el número de inmigrantes representa un porcentaje mínimo de la población estudiada lo que implica que la inmigración no es un factor importante de riesgo a considerar en el estudio.

De acuerdo a lo que muestra el estudio serológico, podemos decir, que la población estudiada corresponde a una zona endémica para la enfermedad de Chagas. Considerando a la población total estudiada, observamos que el grupo de edad 10-14 años es el que más alto riesgo presenta a la infección siguiéndolo el grupo de 65 o más años. Si a esto, agregamos que la fase aguda de la enfermedad es más frecuente, causando un mayor número de defunciones en niños, la presencia de la enfermedad representa un alto riesgo para esa población en particular, aunado a esto, el desconocimiento de la enfermedad por los médicos tratantes a quienes acuden los pacientes, haciendo más preocupante la situación de la población estudiada.

Se considera que los grupos de edad restantes tienen un peligro potencial de desarrollar las alteraciones que corresponde a la fase crónica de la enfermedad, ya que, como sabemos, esta fase se desarrolla después de diez años o más de haber tenido una primo infección, y que se caracteriza por las lesiones a nivel de músculo cardíaco, hígado, bazo, esófago, colon y sistema nervioso, pudiendo producir hasta la muerte. La cifra de seropositividad nos indica que un alto porcentaje de la población estudiada tiene un gran riesgo de desarrollar la enfermedad.

X.-CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo nos lleva a plantear las siguientes conclusiones.

1.- La enfermedad infecciosa llamada Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas está presente en la localidad de Ahuehuetzingo Morelos, ya que la seropositividad de la población estudiada así lo demuestra.

2.- La prevalencia de los anticuerpos Anti- *T. cruzi* corresponde a un 10.90% para la población total estudiada, lo cual indica que la infección esta presente en un porcentaje importante y posiblemente la enfermedad en alguna de sus fases.

3.- La tasa de infección por edad es mayor en niños que caen dentro del grupo de 10-14 años.

4.- El 100% de infecciones ocurrieron en el sexo femenino, debido a que se muestrearon más mujeres que hombres.

5.- El triatomismo domiciliario y la enfermedad de Chagas provienen de la primitiva construcción de la vivienda humana, del hacinamiento en que estos viven, de la falta de higiene y de la precaria condición cultural, económica y social de sus moradores.

6.- Es importante hacer incapie en que por lo menos deben realizarse dos pruebas serológicas para descubrir a las personas seropositivas.

XI.-PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

1.- Es urgente implantar un programa de control para esta infección en la región, pero antes de realizar cualquier acción profiláctica, es indispensable el adecuado estudio ecológico de la localidad para que en esta forma se precise los biotopos que favorecen la interacción entre triatóminos, el hombre y los reservorio domésticos. Así conocer cuales son los puntos geográficos en que sean necesarias la aplicación de medidas profilácticas.

2.- Mejoría de las casa habitación especialmente en zonas rurales con el objeto de evitar que los insectos encuentren un habitat adecuado para su sobrevivencia.

3.- Recomendar medidas tendientes al control del vector y del área domiciliaria, como lo son sacudir cuadros y enseres domésticos que pudieran servir como alojamiento del insecto.

4.- Eliminación de los vectores a través de insecticidas de acción residual.

5.- Tratamiento a aquellas personas seropositivas en la que compruebe la presencia de la enfermedad a través de estudios clínicos y de gabinete.

XII.-RESUMEN

Se realizó un estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en Ahuehuetzingo Morelos a fin de demostrar la existencia de la infección. Utilizando los métodos inmunológicos de Hemaglutinación Indirecta (HAI) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), para determinar la presencia de anticuerpos Anti- *T. cruzi* y la prevalencia de la infección, así mismo se realizó el estudio de algunos factores demográficos y de vivienda.

El muestreo se hizo siguiendo las recomendaciones generales de la OMS para estudios de zonas rurales, recolectando 55 muestras y obteniéndose de estas 6 muestras positivas lo que representa una tasa de prevalencia serológica de la Tripanosomiasis americana del 10.90% de la población estudiada.

La mayor incidencia de anticuerpos se observó en individuos incluidos en el grupo de edad de 10-14 años.

La condición de hacinamiento, así como la calidad de vivienda y la convivencia con animales domésticos mostraron ser un factor de riesgo a adquirir la infección Chagásica.

Respecto a los transmisores el 67.27% de la población estudiada aseguró conocer al vector y solo el 10.90% afirmó haber sido picado por éstos.

Se demuestra que la enfermedad de Chagas está presente y que la prevalencia de anticuerpos Anti- *T. cruzi* es significativa, además que las condiciones de vivienda tienen relación directa en la presencia de la infección.

XIII.-ANEXO



INSTITUTO DE SALUBRIDAD Y ENFERMEDADES TROPICALES

ENFERMEDAD DE CHAGAS: CUESTIONARIO (INDIVIDUAL)

ESTADO: _____ MUNICIPIO: _____ LOCALIDAD: _____
 No. DE ENCUESTA: _____ ENCUESTO: _____ No. DE MANZANA No. DE CASA EQUIPO FECHA: _____

1.- NOMBRE: _____ APELLIDO PATERNO _____ APELLIDO MATERNO _____ NOMBRE ISB: _____
 2.- EDAD: 0-4 5-9 10-14 15-24 25-44 45-64 65..... 3.- SEXO: M F
 4.- DOMICILIO: _____ CALLE Y NUMERO _____ 5.- SIEMPRE HA VIVIDO AQUI: SI NO
 6.- No. DE AÑOS QUE HA VIVIDO AQUI: _____
 7.- OTROS SITIOS DONDE HA VIVIDO ANTES: _____ 8.- OCUPACION(ES) EN LOS ULTIMOS 5 AÑOS:

LISTA DE OCUPACIONES	POBLACION	MUNICIPIO	ESTADO	TIEMPO (AÑOS)	Ocupaciones en los últimos 5 años	
					1	2
					EMPRESARIO	COMERCIANTE
					PROPIETARIO	ANA DE CASA
					SEM EMPLEADO	ESTUDIANTE
					JORNALERO	OTROS ESPECIFICOS
					OBrero	COMERCIO
					EMPLEADO	
					PROFESIONISTA	

9.- TIPO DE VIVIENDA:

PAREDES	TECHOS	PISOS
BAJARCOE 1	PALAPA 1	TERRA 1
LAMINA 2	LAMINA 1	CEMENTO 2
CARTON 1	TEJA 2	MOSAICO 3
ADobe 1	CONCRETO 3	LOZETA 3
MADERA 1	OTROS ESPECI-	OTROS ESPECI-
PALATA 1	FIGUE _____	FIGUE _____
TAPIQUE 2	_____	_____
CONCRETO 2	_____	_____
OTROS ESPECI-	_____	_____
QUE:	_____	_____

10.- No. DE CUARTOS PARA DORMIR: _____
 11.- No. DE PERSONAS QUE HABITAN LA CASA: _____
 12.- HA VISTO CHINCHES EN SU CASA? NO ? SI
 DONDE:
 - DENTRO DE: CUARTOS DE DORMIR, COCINA, ESTANCIA, ETC. _____
 - AFUERA: ESTABLO, CORRAL, PATIO, ETC. _____
 - OTROS ESPECIFICOS: _____

13.- NOMBRE QUE LES DA A LAS CHINCHES: _____
 14.- LO HAN PICADO A USTED: SI NO ?

15.- TIENE ANIMALES CONVIVIERON CON USTED? (ANOTAR LA CANTIDAD):

ANIMAL	CUANTOS	ANIMAL	CUANTOS	ANIMAL	CUANTOS
1 PERRO	5 VACA				OTROS ESPECIFICOS
2 GATO	7 CERDO				
3 CABALLO	7 CAPIBA				
4 BURRO	8 AVE				

DEFINICION DE VARIABLES.

- SEROPOSITIVIDAD:** Presencia de títulos de anticuerpos anti- *T. cruzi*, iguales o mayores a 1:16 determinados con la microtécnica de Hemaglutinación Indirecta (HAI), y 1:32 según la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando sangre venosa.
- SERONEGATIVIDAD:** Ausencia de anticuerpos anti- *T. cruzi*, titulables por las técnicas de Hemaglutinación Indirecta (HAI) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando sangre venosa.
- CASO:** Se considera como caso a todo individuo que posee títulos de anticuerpos anti- *T. cruzi* iguales o mayores a 1:16, 1:32, por las microtécnicas: HAI e IFI respectivamente y/o con *T. cruzi* en sangre venosa posea o no manifestaciones clínicas de la enfermedad.
- VIVIENDA PRECARIA:** Vivienda con paredes de bajareque, lámina - cartón o adobe y techo de material vegetal o lámina.
- VIVIENDA REGULAR:** Vivienda con paredes de adoba, tabique o colado con techo de teja.
- VIVIENDA ADECUADA:** Vivienda con techo de colado y paredes de tabique, aplanado.

XIV.-BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson R. I., Sedun E. H. and Williams J. A., A technique for the use of minute amount of dried blood in the Fluorescent antibody test for Schistosomiasis. *Exp. Parasit.* 11: 111-116; (1961).
- 2.- Añas Antonia, Neghme Amador. *Parasitología Clínica*. Edit. Interamericana, Buenos Aires Argentina. (1979).
- 3.- Bayona C., Velasco C. O., Ramírez J., Gutiérrez Q. y Guzmán B. C. La enfermedad de Chagas en donadores de sangre del Hospital Universitario de Puebla, México. Aceptado para su publicación en *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* (1985).
- 4.- Biagi F. F., et. al. Enfermedad de Chagas en Toluca Estado de México. *Prensa Médica, Méx.* 23 (11-12), Nov.-Dic.: 463-465; (1958).
- 5.- Biagi F., *Enfermedades Parasitarias*. 2a Ed., 7a reimpression. Edit. Científicas. La Prensa Médica Mexicana. México 132-147; (1982).
- 6.- Biagi F. Tay J., Guzmán F. C. y Fong F. F., Tetitlán Guerrero, Foco endémico de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Fac. Méd. (Méx.)*, 6 (9): 625-631; (1964).
- 7.- Brack C. Elektronmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi* unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Überträger *Rhodnius prolixus* *Acta tropica* (basel) 25: 289-356; (1968).
- 8.- Brener Z., Sigman y Alvarena N. J. life of cycle of *T. cruzi* in the vector. *Pan American Health Organization Tripanosomiasis Research Sc. Pub.* 318: 83-88; (1975).
- 9.- Brener Z., "Simposio sobre nuevos enfoques en la investigación de la tripanosomiasis americana" *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 83/2: 106-116; (1977).
- 10.- Boyden S. V.: The adsorption of protein in erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Méd.* 93: 107-120; (1951).
- 11.- Brumpt E.: De Xenodiagnostique, application au diagnostic de quelques infections parasitaire et en particulier a la Trypanosomose de Chagas. *Bull. Soc. Path. Exot.* 7: 706-710; (1914).
- 12.- Camargo M. E.: Serologic Diagnosis of Chagas Disease. *New Approaches in American Tripanosomiasis. Proceeding of an International Symposium Brasil. PAHO* 206-211; (1975).

- 13.- Cancado R. J.: Forma aguda da doenca de Chagas no Brasil Rev. Ass. Méd. Brasil. 26: 285-288; (1980).
- 14.- Cappe Stella M., Schumunius G. A., Traversa O. C., Yanovsky, Etcheverry M. E. y Garavelli H. J.: Nueva técnica para la preparación del antígeno del *Trypanosoma cruzi* Rev. Soc. Argent. Bol. 42: 78-85; (1966).
- 15.- Carrada B. T. "Tripanosomiasis americana de Chagas" Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 40/8: 408-416; (1983).
- 16.- Cerisola J. A., Ravinovich A., Alvarez M., Di Carletto C. H., Pruneda J. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. Bol. Of. Sanit. Panam. 73: 203-221; (1972).
- 17.- Contreras María del Carmen, Rojas Antonio, Villarreal F. y Schenone R.: Comparación de sensibilidad de reacción de Hemaglutinación Indirecta para enfermedad de Chagas en muestras de sangre obtenidas por punción venosa y capilar (papel filtro) en pacientes con xenodiagnóstico positivo. Bol. Chile. Parasit. 39: 60-62; (1984).
- 18.- Cuartero C. M., Ponce D., Rocio R.: Cinco nuevos casos de la enfermedad de Chagas en Zacatecas y Jalisco República Mexicana. Rev. Invest. Salud. Públ. Méx. 27: 29-36; (1965).
- 19.- Cuba Cuba C., Alvarenga Nelson J., Barretto Air C., Marsden y Chiarin C.: Nuevos estudios comparativos entre *Dipetalogaster maximus* y *Triatoma infestans* en el xenodiagnóstico de la infección Chagásica crónica humana. Rev. Inst. Méd. Trop. Sao Paulo 20/3: 145-151. Maio-Junho, (1978).
- 20.- Chediak A.: The diagnosis of syphilis practiced in a desiccated and de fibrinated blood dnop. Rev. Méd. Cubana 43: 953-956; (1961).
- 21.- Dr. Felix Pifano C.: El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre gota gruesa, el xenodiagnóstico, hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. Arch. Venezol. Patol. y Parasit. Méd. 111/2: 121-157; (1954).
- 22.- Enfermedad de Chagas en México. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. Conclusiones de un grupo de estudio. Junio 1977 No. 1 Serie Documentos San Cristobal de las Casas. Chiapas, Méx.
- 23.- Faust Ernest C., Russell Paul F., Jung Rodney C. Parasitología Clínica. Edit. Salvat 2ª reimpresión (1975).
- 24.- Faust E. C., Farr R. R., Clifton J. R. "Parasitología Clínica" 1ª Edición, 2ª reimpresión. Salvat Editores, S.A., Barcelona pp. 107-116 (1984).

- 25.- Goldsmith R.S., y Cols. E. epidemiologic studies of Chagas Disease in Oaxaca México. P.A.H.U.A. Bol: 12: 236-250 (1978).
- 26.- Goldsmith R.S., Ortega M., Zaráte R.J., Beltran F., Encuestas seroepidemiológicas de la enfermedad de Chagas en Chiapas, México Arch. Inves. Méd. 14: 43-50 (1982).
- 27.- Goldsmith R.S., Zaráte J.R.: El potencial de la transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea. Hallazgo serológico entre donadores en el Estado de Oaxaca. Salud Públ. Méx. 20: 141-439; (1978).
- 28.- Goldsmith R.S., Zaráte R.J., Zaráte L.G., Kagan I., Jacacobson L.B., Morales G.: Estudios clínicos y epidemilógicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México y un estudio completo de siete años. I. Cerro del aire Bol. of Sanit. Panam. 100(2): 145-167; (1986).
- 29.- Guzmán B.C.: Enfermedad de Chagas en Progreso Jiutepec Morelos. I. Encuesta seroepidemiológica. Tesis de Especialidad. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. S.S.A. México (1985).
- 30.- Herbet W.J.: Passive hemagglutination with especial reference to the tanned cell technique. Hand book of Ex. Immunol. Blackwell Scientific Publications 20(19): 1-20; (1973).
- 31.- Hernandez Lira.: Un nuevo caso de la enfermedad de Chagas en Tierra Blanca Veracruz. Rev. Inst. Salub. Enfer. Trop.
- 32.- Informe de una reunión conjunta OMS/OPS de Investigadores, Aspectos Clínicos de la enfermedad de Chagas Bol. of Sanit. Panamer. 141-157; (1974).
- 33.- Kagan I.G., Goldsmith R.S., Zaráte C.R. y cols.: Evolution of serologic test for studies on Chagas disease Bol. of sanit. Panam. 87(4): 309-318; (1979).
- 34.- Knierim Feliza., Sandoval José y Muñoz Eugenia.: Reacción de hemaglutinación indirecta en la enfermedad de Chagas crónica. Bol. Chile. Parasit. 28: 235-332; (1973).
- 35.- Lorca M., Atías A.: Infección por *Trypanosoma cruzi* en bancos de sangre doce hospitales de Chile. Bol. of Sanit. Panamer. 95(4): 321-325; (1983).
- 36.- Lugones S.H., Bergoglio R.M. Lazzari J.: Enfermedad de Chagas Mazza. Curso Integral de Capacitación, Clase 2a.
- 37.- Mackell G.A.: Die komplementbindungs reaktion der Shagas krankert. zt. Chr. Tropenmed. Parasit. 11: 152-186; (1960).

- 38.- Marinkell Cornelis, Sanchez N., Grooge M.: Recomendaciones para el almacenamiento de sueros obtenidos en papel filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección Chagásica en la prueba de Inmunofluorescencia. Rev. Méd. Trop. Sao Paulo 20(2): 112-114, Marzo-Abril: (1978).
- 39.- Mazzoti L. y Dias E.: Resumen de los casos publicados sobre la enfermedad de Chagas en México. Rev. Soc. Méx. Rist. Nat. 10(1-4): 103-111; (1940).
- 40.- Mazzoti L.: Triatomídeos de México y su infección natural por *T. cruzi* Rev. Fac. Méd. (Méx.) 20: 95-109; (1940).
- 41.- Mazzoti R.: Dos casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac. Méd. Méx. 70: 417-420; (1940).
- 42.- Memorias VII Congreso Nacional de Parasitología Puebla, Pue. Oct. 16-18 (1980).
- 43.- Mendoza J., Longa E., Contreras Ma. c., Sandoval L., Amigo C., Rojas J., Schenone H.: Enfermedad de Chagas en Chile. Sectores Urbanos. III. Frecuencia de la infección Chagásica en madres y recién nacidos del Hospital de Copiagó. Bol. Chile. Parasit. 38: 29-31; (1983).
- 44.- Métodos de diagnóstico de uso común en la enfermedad de Chagas OPS-92 of. Sanit. Panamer., Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de la Organización de la salud, (1984).
- 45.- M.T. Scott D. Snag.: American Trypanosomiasis. Immunology of parasit. Infections. Edit. By Sydney Cohen. Kenneth S. Warren. 2a. ed. Blackwell Scientific Publications 279-283; (1982).
- 46.- Normas para atención médica del infectado chagásico. Ministerios de salud y acción social. Buenos Aires Argentina. (1984).
- 47.- Neal R.A., Miles R.A.; Indirect. Hemagglutination test for Chagas Disease with a simple method for survery work. Rev. inst. Méd. Trop. Sao Paulo 12(5): 253-332; (1970).
- 48.- Ortega M., Beltrán H.F. y Zavala.: Enfermedad de Chagas en Chiapas. Estudios Clínicos Epidemiológicos. Rev. Salud. Públ. (Méx.) 5: 837-843; (1970).
- 49.- Palencia L., Montaña A.E. : Un nuevo caso de Tripanosomiasis en México. Rev. Fac. Méd. (México); 1(11): 737-740; (1959).
- 50.- Pinto Díaz J.C. : Enfermedad de Chagas. Epidemiología Clínica Terapéutica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires Argentina (1984).

- 51.- Quintal Avilés R., Navarrete E.R. : Encuesta serológica en una población del Agro Henequero Yucateco. Rev. Salud Pùbl. Méx. 17(3), May-Jul.; 365-369; (1975).
- 52.- Sadum E.H., Dexbury R.E., Williams J.S. y cols. : Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. J. Parasit. 49(3): 385 - 388; (1963).
- 53.- Sagua H., Araya J.: Seropositividad Chagásica en banco de sangre de zona endémica. Algunos aspectos epidemiológicos de los hemodonantes. Bol. Chil. Parasit. 37: 63-65; (1982).
- 54.- Salazar S.P.M., Haro I. de : Dos nuevas localizaciones de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal. Pub. Méx. 25(1): 77-82 (1983).
- 55.- Salgado Abreu A., : Consideraciones sobre metodología y sensibilidad del Xenodiagnóstico. Bol. Chile. Parasit. 24: 9-13; (1969).
- 56.- Segura Elsa. y cols. Manual de Diagnóstico. Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad Chagas. "Dr. Mario Fatala Chaben". Ministerio de Salud y Acción Social. Septiembre, (1985).
- 57.- Sierra J.: Enfermedad de Chagas. Rev. de Infectología. 287-292; (1982).
- 58.- Souza S.C., Camargo M.E. : The use of filter paper blood sumers in a practical Fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. Rev. Inst. Méd. Trop. Sao Paulo. 8(6): 225-228; (1966).
- 59.- Schenone H., Alfaro E. y Rojas A.: Bases y rendimientos del xenodiagnóstico en la infección Chagásica Humana. Bol. Chile. Parasit. 29: 24-26; (1974).
- 60.- Shmuñis G.A., Szarfman A.: La enfermedad de Chagas Congénita. Medicina (Buenos Aires) 37: 47-53; (1977).
- 61.- Stoppani Andres. O.M. Bioquímica del *Trypanosoma cruzi* Interciencia 8(6): 396-404; (1983).
- 62.- S. Guimaraes., A. Castillo E., J. Celeste B.J., S. Nakabada O. y Amato Netto V.: Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM en papel filtro para uso exclusivo en encuestas seroepidemiológicas de enfermedades parasitarias. Bol. Of. Sanit. Panam. 100(2): 129-143; (1986).
- 63.- Tay Z.J., Velasco C.O., Lara A.R., Gutierrez Q.M.: Parasitología Médica Edit. Francisco Méndez Cervantes: 104-128 (1984).

- 64.- Tay J., Navarrete C.E., Corominos E.R., Biagi F.F.: la enfermedad de Chagas en el municipio de Tuxpan Estado de Michoacán, México. Rev. Fac. Méd. (Méx.) 8(4): 263-270; (1976).
- 65.- Tay J. cols.: La enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Rev. Salud. Pùb. (Méx.) 22: 409-450; (1980).
- 66.- Tay J. cols.: Evolución de *T. cruzi* cepa Mexicana en el huésped vertebrado e invertebrado in vitro.
- 67.- Tay J., Ontiveros D.: Estado actual de los conocimientos sobre infección en vertebrados por la enfermedad de Chagas en México. Bol. Of. Sanit. Panam. 67(4): 310-314; (1969).
- 68.- Tay J., Ortega M., Capin R.: Estado actual de nuestros conocimientos sobre transmisores de enfermedad de Chagas en México. Reporte de nuevas localidades Rev. Fac. Méd. (Méx.) 15(3): 221-226; (1972).
- 69.- Teixeira Antonio R.L.: Autoimmune Mechanisms in Chagas disease. II.A. The parasite and the Host's Response. PAHO.318: 98-108; (1975).
- 70.- Velasco A.L.M., Sepulveda T.I.P.: Búsqueda de anticuerpos contra *T. cruzi* en donadores en banco de sangre registrados en el Centro Nacional de Transfusión Sanguinea de la S.S.A., U.N.A.M., Méx. D.F. (1985).
- 71.- Velasco C.O.: Estado actual de la enfermedad de Chagas en México. Dirección General de Epidemiología S.S.A. México, D.F..
- 72.- Velasco C.O., Gudiño I., Tinoco O. y Guzmán B.C.: Memorias del X Congreso Nacional de Química Clínica. Acapulco Gro. Méx. Abril 25-30 (1987).
- 73.- Velasco C.O., Guzmán B.C.: Importancia de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat-amer 28: 275-283; (1986).
- 74.- Velasco C.O., Tay J., Luna V.A.: La enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco. República Mexicana, presentación de tres nuevos casos humanos. Rev. Invest. Salud. Pùb. (Méx.) 27: 29-36; (1974).
- 75.- Velasco C.O., Romero S.R., Mendiola G.J., Brambila C.A.: Contribución al conocimiento de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Salud. Pùb. (Méx.). Jul-Sep.: 197-204 (1970).
- 76.- Vattuone Norberto H. y Ponce Ulises J.: Evolución de un Antígeno de Aglutinación en epimastigotes de *T. cruzi* Bol. Chile. Parasit. 26: 7-10; (1971).