

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMIASIS AMERICANA
EN 11 JURISDICCIONES DEL ESTADO DE VERACRUZ
UTILIZANDO ANTIGENOS DE ORIGEN MEXICANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :
BIOL. YOLANDA GUEVARA GOMEZ

DIRECTORA DE TESIS: **DR. ANA MARIA SALAZAR SCHEITINO**

MEXICO, D. F.



COORDINACIÓN

MARZO DEL 2005

m341845



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Autorevisión a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM y México en tener el documento y el grado el cual se le da el título de maestría.

NOMBRE: YOLANDA GUEVARA GÓMEZ
FECHA: 8 MARZO 2005
FIRMA: [Firma]

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Guevara Gómez Yolanda con número de cuenta 80197360 y número de expediente 3991087, con la tesis titulada: "Seroprevalencia de Tripanosomiasis Americana en 11 Jurisdicciones del Estado de Veracruz, utilizando antígenos de origen mexicano", bajo la dirección del(a) Dra. Paz María Salazar Schettino.

- Presidente: Dra. Martha Legorreta Herrera
- Vocal: Dr. Juan José Calva Mercado
- Secretario: Dra. Paz María Salazar Schettino
- Suplente: M. en C. Martha Bucio Torres
- Suplente: Dr. Edgar A. Zenteno Galindo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a, 23 de febrero del 2005

[Firma]
Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología de Parásitos. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Apoyos para realizar este trabajo:

Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Secretaria de Salud del Estado de Veracruz

OMS/OPS. TDR Proyecto 970854

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Paz María Salazar Schettino

Dra. Martha Legorreta Herrera

Dr. Edgar A. Zenteno Galindo

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Paz María Salazar Schettino, con cariño y admiración gracias por todo su apoyo y por confiar en mí, no sólo en la realización de este trabajo, sino en el curso de mi vida profesional . Gracias por todas sus enseñanzas.

A la M. en C. Martha I. Bucio Torres gracias por su coasesoría y apoyo incondicional en cada etapa de este trabajo y sobretodo por tu amistad en todo momento.

A la M. en C. Margarita Cabrera Bravo gracias por todos tus acertados comentarios para enriquecer este trabajo y por tu apoyo de siempre.

A la M. en C. Gloria Rojas Wastavino gracias por todos tus consejos y apoyo desinteresado, no sólo en el aspecto profesional sino también en el personal.

A la M.C. Adela Ruiz Hernández, gracias por tu apoyo a lo largo del proyecto y por tu alegría que hace que cada día de trabajo sea de lo más divertido.

A la Dra. Guadalupe García de la Torre por todos tus comentarios y apoyo en la parte estadística de este trabajo, además de su amistad por supuesto.

Al personal de los Servicios de Salud del estado de Veracruz.

Especialmente gracias a todos los miembros del jurado que con sus correcciones y experiencia enriquecieron el contenido de esta tesis.

Gracias a todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología de Parásitos, por todas sus aportaciones en cada etapa de este trabajo, pero sobretodo por su cariño y amistad. (Lorena, Nelia, Laura, Elia, Celeste, Citlali, Alicia, Hugo, Santiago, Mauro, Vicente, Evita y Chabe)

*Un reconocimiento especial a Evita por todo su apoyo en la elución de sueros y preparación de material y soluciones.

A mis hermanos por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, por su inmenso amor y confianza. La palabra gracias no alcanza para decirles todo lo que siento.

Quiero expresar mi agradecimiento a unas grandes mujeres, que me han enseñado que la vida es bella y que se debe luchar por lo que anhelamos. Gracias Isa, Esthela , Cristy, Lola, Xóchitl, Estrella y Titi.

Cristy – Xo gracias por darle alegría a mi vida con esas preciosa bebas.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	AGENTE ETIOLÓGICO y Ubicación taxonómica	3
2.1	Bioquímica del parásito	4
2.2	Ciclo de vida	4
2.3	Mecanismos de infección	6
2.4	Cuadro clínico	6
2.5	Patogenia y Patología	9
2.6	Inmunología	11
2.7	Diagnóstico de la enfermedad	13
2.8	Antígenos en el diagnóstico	19
3.	TRANSMISOR y Ubicación taxonómica	22
4.	JUSTIFICACIÓN	24
5.	HIPÓTESIS	25
6.	OBJETIVOS	25
7.	METODOLOGÍA	26
7.1	Tipo de estudio	26
7.2	Tamaño de la muestra	26
7.3	Criterios de selección, inclusión y eliminación	28
7.4	Obtención de información (encuesta) y muestras de sangre	28
7.5	Extracción de antígeno	29
7.5.1	Adaptación y expansión de parásitos en medios de cultivo	29
7.5.2	Cosecha de parásitos y extracción antigénica	29
7.5.3	Caracterización inmunoquímica del extracto antigénico	29
7.5.3.1	Cuantificación de proteínas y carbohidratos totales	29
7.5.3.2	Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares	30
7.5.3.3	Electroinmunotransferencia de componentes del extracto antigénico	30
7.6	Estandarización de la técnica de Hemaglutinación indirecta en microplaca	31
7.6.1	Sensibilización de eritrocitos con el extracto antigénico	31
7.6.2	Validación del antígeno	32
7.6.3	Estandarización de la técnica con eluidos séricos	34
7.6.3.1	Determinación de título de corte	34
7.6.3.2	Evaluación de la estandarización de la técnica	34
7.6.3.3	Procesamiento de muestras	35
7.6.3.4	Reacción de Hemaglutinación indirecta e interpretación	36
8.	RESULTADOS	39
9.	DISCUSIÓN	56
10.	CONCLUSIONES	63
11.	BIBLIOGRAFÍA	64
12.	PERSPECTIVAS	79
13.	ANEXOS	80

LISTA DE TABLAS, GRAFICOS, CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS.

Tabla 1	Distribución de seropositivos y seronegativos a <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tabla 2	Seroprevalencia a <i>Trypanosoma cruzi</i> por jurisdicción sanitaria a tres diluciones
Tabla 3	Distribución porcentual por sexo en individuos seropositivos
Tabla 4	Distribución porcentual por sexo en individuos seronegativos
Tabla 5 -6	Distribución porcentual seropositivos por grupos de edad
Tablas 7	Relación de proteínas y carbohidratos totales
Tablas 8-11	Resultados pruebas intraensayo e interensayo
Gráfica 1	Distribución de seropositivos y seronegativos a <i>Trypanosoma cruzi</i>
Gráfica 2	Seroprevalencia a <i>Trypanosoma cruzi</i> por jurisdicción sanitaria a tres diluciones
Gráfica 3	Distribución porcentual por sexo en individuos seropositivos
Gráfica 4	Distribución porcentual por sexo en individuos seronegativos
Gráficas 5-6	Distribución porcentual seropositivos por grupos de edad
Cuadro 1	Métodos serológicos y Moleculares para el diagnóstico de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Cuadro 2	Muestras requeridas y procesadas en el estudio
Figura 1	Fases de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Figura 2	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Figura 3	Cuadro clínico: Signo de Romaña
Figura 4	Cuadro clínico: Cardiomegalia, megaesófago y megacolon
Figura 5	Patología: Nido de amastigotes en músculo cardiaco, corazón chagastico
Figura 6	Diagnóstico: Gota gruesa, frotis y xenodiagnóstico
Figura 7	Transmisores de <i>Trypanosoma cruzi</i>
Figura 8	Metodología: Toma de muestra sanguínea en papel filtro
Figura 9	Metodología: Procesamiento de muestras con la prueba de Hemaglutinación
Figura 10	Metodología: Interpretación de la prueba
Figura 11	Fundamento de Hemaglutinación indirecta
Figura 12	Mapa del estado de Veracruz mostrando las zonas de estudio
Figura 13	Electroforésis del extracto antigénico de <i>Trypanosoma cruzi</i> al 10%
Figura 14	Electroforésis del extracto antigénico de <i>Trypanosoma cruzi</i> al 12.5%
Figura 15	Electroinmunotransferencia del extracto antigénico con sueros positivos a <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania mexicana</i> y normales

Anexo 1	Descripción física del estado de Veracruz
Anexo 2	Encuesta
Anexo 3	Fórmulas y reactivos empleados
Anexo 4	Reactividad entre eluidos séricos y sueros: Concordancia

ABREVIACIONES

Ag	Antígeno
T. c	<i>Trypanosoma cruzi</i>
HAI	Hemaglutinación indirecta
L. m.	<i>Leishmania mexicana</i>
SDS -PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Wb	Western blot
TQ	Tequesquitengo
MPM	Marcador de peso molecular
K	Kaleidoscopio (marcador peso molecular preteñido)
T (-)	Testigo negativo
kDa	kilodaltons

RESUMEN

En México aún cuando existen los factores epidemiológicos para la transmisión de la Enfermedad de Chagas no ha sido reconocida como un problema de salud pública quizás por su aparente baja prevalencia; la OMS en 1991 estimó que en América Latina 16 –18 millones de personas estaban infectadas y 100 millones en riesgo de infección.

El Serodiagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi* se basa en tres pruebas serológicas Hemaglutinación, ELISA e Inmunofluorescencia indirectas, las cuales han sido estandarizadas bajo diversos criterios en distintos centros de investigación. En México la mayor parte de estos estudios se han realizado con antígenos de origen extranjero. El principal objetivo de este trabajo fue obtener un extracto antigénico de una cepa mexicana y determinar la seroprevalencia del estado de Veracruz por medio de una prueba de tamizaje como la hemaglutinación indirecta; se realizó la estandarización de la prueba con muestras sanguíneas en papel filtro; el extracto antigénico se validó con un panel de sueros de origen argentino obteniendo una sensibilidad y especificidad aceptable para su empleo en el diagnóstico. La seroprevalencia obtenida fue 2.4%.

Al extracto antigénico se determinó proteínas y carbohidratos totales, separación proteica por electroforesis en geles de poliacrilamida, electroinmunotransferencia y pruebas de reacción cruzada con sueros de pacientes positivos a *Leishmania mexicana*. El análisis electroforético mostró 18 componentes entre 25 y 110 kDa y el de electroinmunotransferencia 16 entre 16 y 210 kDa; 9 fueron específicos para *T. cruzi* y 7 para *L. mexicana*; lo anterior tiene relevancia al no observarse reacción cruzada con *L. mexicana* por lo cual se propone este antígeno como buen candidato en el serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

1. INTRODUCCION

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, fue descrita por primera vez en 1909 por Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil¹. En 2000 Schofield refirió que en México existe una seroprevalencia de 540 000 casos, con 10,854 nuevos por año²; por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en 1991 en América que de 16 a 18 millones de personas estaban infectadas y que 100 millones se encontraban en riesgo de adquirir la infección³.

En la República Mexicana, Carlos Hoffman en 1928 hizo el primer reporte del transmisor en el estado de Veracruz con un ejemplar de *Triatoma dimidiata*⁴; Luis Mazzotti en 1936 notificó por primera vez triatóminos naturalmente infectados (*Triatoma pallidipennis* y *Triatoma dimidiata*) en Tututepec, Oaxaca y posteriormente en siete estados más, motivo por el cual dirigió sus investigaciones para la búsqueda de casos humanos⁵, en 1940 informó los dos primeros casos humanos en fase aguda diagnosticados por xenodiagnóstico y de los dos primeros vertebrados infectados, un perro en el estado de Oaxaca y un armadillo en el estado de Colima⁶. Herr y Brumpt en 1939 refirieron la adquisición accidental de la enfermedad en el laboratorio con una cepa de origen mexicano proveniente de un transmisor naturalmente infectado⁷; Dias, Perrin y Brenes en 1947 realizaron la primera encuesta serológica en el país⁸; Biagi y Arce en 1965 diagnosticaron los dos primeros casos de miocardiopatía chagásica comprobados por la presencia de amastigotes en cortes histológicos de miocardio en autopsia⁹ y Tellaeché en 1976 comunicó 74 casos agudos encontrados en frotis sanguíneos por la Campaña Nacional para la Erradicación del Paludismo¹⁰. Salazar-Schettino en 1979 informó el primer caso de miocardiopatía chagásica crónica, referido como tercer caso comprobado parasitológicamente¹¹ y en 1984, el primer megaesófago en Oaxaca¹². Tay en 1986 reportó el primero de megacolon también en Oaxaca¹³ y en 1989 Salazar-Schettino el primero de transmisión por transfusión sanguínea en la Ciudad de México¹⁴ y Guzmán el primero de transmisión congénita¹⁵.

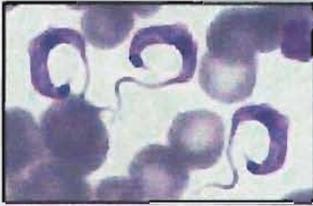
En México, aun cuando no existen suficientes estudios epidemiológicos, existen todos los factores para que la cadena epidemiológica se lleve a cabo tal como la presencia del transmisor naturalmente infectado en todos los estados y a todas las altitudes^{16,17} las

condiciones de vivienda en las zonas rurales, óptimas para la convivencia con triatóminos y reservorios; así como la presencia de cepas de *Trypanosoma cruzi* que al haber sido caracterizadas han mostrado virulencias y tropismos muy variados; sin embargo, aún no es reconocido como un problema de salud pública, debido principalmente al desconocimiento tanto de la población como del personal de salud y por la falta sistemática de comprobación serológica en laboratorios clínicos y bancos de sangre del país. En algunas regiones, existen estrategias de control y vigilancia epidemiológica con base en encuestas epidemiológicas previas, las cuales se han realizado con diferentes metodologías, lo cual no siempre permite comparar resultados^{9,11-13,16-22}.

Actualmente, la tendencia de la OMS/OPS es interrumpir la transmisión natural en zonas rurales y la urbana en Bancos de Sangre como parte de las acciones planteadas en las Iniciativas Multinacionales de Erradicación. Desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, han sido utilizados numerosos métodos parasitológicos e inmunológicos para el diagnóstico, algunos de los cuales a través del tiempo han mostrado sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptable^{23,24}.

Los métodos serológicos sirven para detectar la infección por *Trypanosoma cruzi*, y aunados a la presencia de signos y síntomas, establecen el diagnóstico de enfermedad. Por otra parte, desde el punto de vista epidemiológico la serología es útil para establecer medidas terapéuticas y en el monitoreo de programas sanitarios de vigilancia y control del padecimiento. Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la OPS/OMS recomienda especialmente el uso de las técnicas de hemaglutinación, ELISA e inmunofluorescencia indirectas; así mismo, para la confirmación diagnóstica, define demostrar reactividad en dos pruebas de diferente principio, la positividad con una sola prueba no constituye un criterio de diagnóstico suficiente²⁵. En la confirmación serológica se deben emplear dos pruebas realizadas de preferencia simultáneamente, con lo que la certeza diagnóstica estará entre el 98 y 99.5%²⁶⁻²⁸. Por otro lado, es importante determinar la presencia de reacciones cruzadas especialmente por la infección por *Leishmania* sp, la cual puede ser coendémica en algunas regiones del país.

2. AGENTE ETIOLÓGICO



Ubicación taxonómica (Levine, 1989²⁹)

Reino Protista

Subreino Protozoa

Phylum Sarcomastigophora

Subphylum Mastigophora

Clase Zoomastigophorea

Orden Kinetoplastida

Familia Trypanosomatidae

Género *Trypanosoma*

Especie *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909¹)

Trypanosoma cruzi presenta principalmente tres estadios morfológicos: tripomastigote, epimastigote y amastigote; las diferentes formas se distinguen entre sí por la posición del kinetoplasto respecto al núcleo y por la presencia o ausencia de flagelo y membrana ondulante. La fase de tripomastigote tiene cuerpo alargado en forma de "S" o "C", un núcleo muy aparente en la parte media del cuerpo, una membrana ondulante y el kinetoplasto localizado posterior al núcleo, mide de 18-21 μ m y puede ser sanguíneo cuando se encuentra en el torrente circulatorio del vertebrado y metacíclico que es la fase infectante y se encuentra en la ampolla rectal y heces del transmisor. Del kinetoplasto emerge la membrana ondulante que recorre al parásito a lo largo del cuerpo saliendo libre en la porción anterior para moverse activamente como un látigo. El epimastigote presenta aspecto fusiforme mide 16-20 μ m de longitud, el kinetoplasto se encuentra ubicado en la porción anterior del núcleo, el flagelo emerge del kinetoplasto y forma una pequeña membrana ondulante antes de salir por la parte anterior del parásito. Este estadio morfológico corresponde al estadio replicativo en el vector por lo cual se multiplica profusamente en el intestino medio del triatomino para dar lugar a la fase de tripomastigote metacíclico; también puede observarse en los medios de cultivo convencionales.

El amastigote es la forma tisular intracelular del mamífero; en él se reproduce por fisión binaria longitudinal, se presenta como una estructura esférica de 2-4 μ m, no presenta flagelo libre, el núcleo es muy aparente y el kinetoplasto tiene forma de bastoncillo³⁰⁻³².

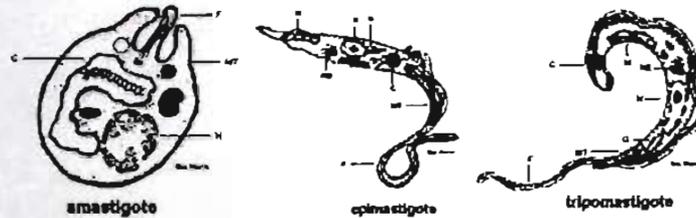


Fig.1 Fases de *Trypanosoma cruzi*

C - cinetoplasto M - mitocondria RE - retículo endoplásmico N – núcleo
G - aparato de Golgi MT – microtúbulos F- flagelo

2.1 BIOQUÍMICA DEL PARÁSITO. El contenido en proteínas del epimastigote es del 43-53% referido a peso seco. Los lípidos constituyen hasta un 20% del peso seco de los epimastigotes de cultivo y se han demostrado glicéridos esteroides, glucolípidos y fosfolípidos, siendo los ácidos no saturados los predominantes. *Trypanosoma cruzi* metaboliza diversos carbohidratos, principalmente la glucosa; esta fermentación aeróbica produce CO₂ con liberación de acetato y succinato, entre otros. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos existe por lo menos en epimastigotes y tripomastigotes³³⁻³⁵. A igual que otros tripanosomatidos, *T. cruzi* carece de actividades de catalasa y de glutatión peroxidasa, enzimas directamente relacionadas en el metabolismo de radicales tóxicos; así mismo, no es capaz de sintetizar ácido neuramínico, el cual incorpora a sus glucoconjugados del medio, utilizando la neuraminidasa que expresa sobre su superficie celular³³⁻³⁵

2.2 CICLO DE VIDA. En el ciclo biológico natural de *Trypanosoma cruzi* están involucrados el hombre, el transmisor y gran variedad de mamíferos naturalmente infectados que se desempeñan como reservorios en la naturaleza^{33,36}. En condiciones naturales, un triatómino se alimenta de sangre de un mamífero infectado, el parásito se multiplica activamente en el intestino medio del insecto y al cabo de 15 a 30 días en el intestino posterior del mismo, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos que

son las formas infectantes; el triatómino, al picar a un huésped sano, defeca sobre él y a través de piel o mucosa sana o escoriada, o por el mismo sitio de la picadura, penetran las formas infectantes (junto con las heces del parásito); o bien, estas mismas pueden ser llevadas hacia la conjuntiva del ojo ocasionando el característico signo de Romaña. Las formas infectantes también pueden penetrar al torrente sanguíneo por otras vías como son heridas cutáneas o por vía oral³⁶⁻⁴⁰. Dentro del mamífero, las formas infectantes, inicialmente se introducen en las células del tejido linfoide transformándose en amastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria hasta lisis la célula huésped y transformarse en tripomastigotes sanguíneos para diseminarse por el torrente circulatorio; éstos penetran a nuevas células del tejido linfoide o muscular para iniciar nuevamente el ciclo, el cual se completa cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por otro transmisor³⁷⁻³⁹.

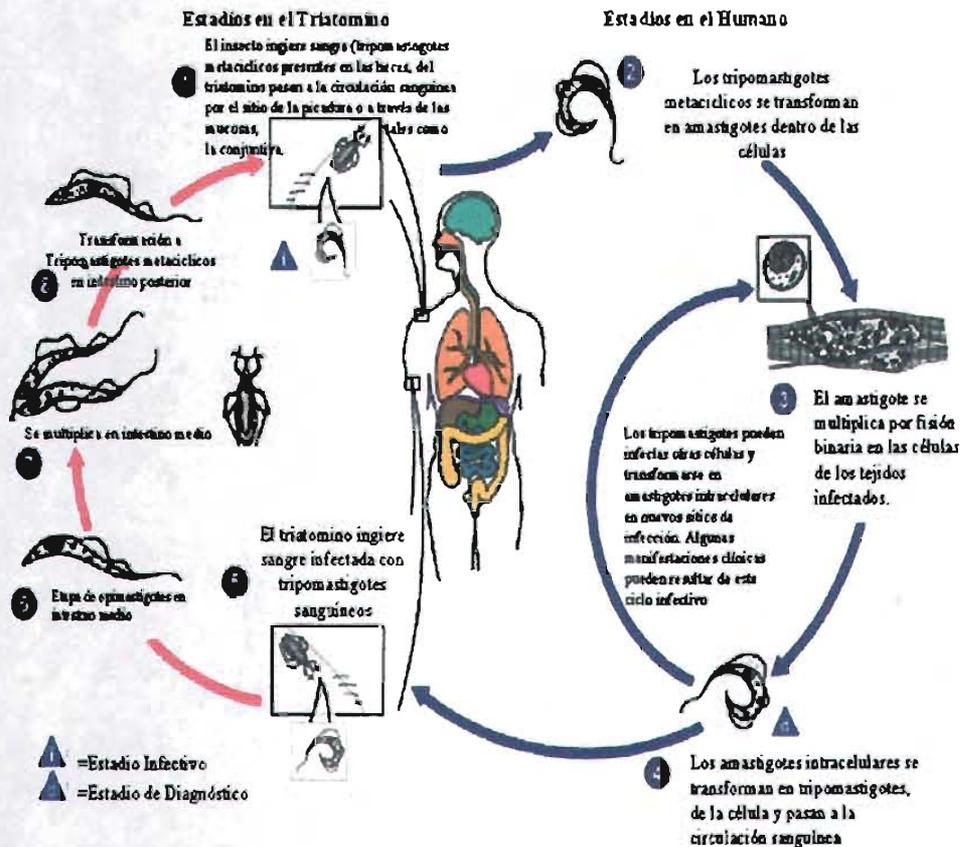


Fig.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Tomado de Atlas de Parasitología.CDC Atlanta

2.3 MECANISMOS DE INFECCIÓN. La infección en el humano puede ser adquirida por diversos mecanismos; el más frecuente se lleva a cabo en forma natural, con participación del transmisor, como ya fue descrito en el ciclo de vida, a este mecanismo actualmente se le ha denominado Chagas rural.

Otros mecanismos, si bien menos frecuentes, pero con características que impactan a ciertos núcleos poblacionales, son aquellos que se llevan a cabo en áreas urbanas y que se relacionan con transfusiones de sangre y sus componentes^{14,41-46}, con transplantes de órganos, principalmente renal o cardíaco⁴⁷⁻⁵² denominado Chagas urbano y las vías transplacentaria, neonatal y raramente por ingestión de leche materna (Chagas connatal)
53-59

Otros mecanismos poco frecuentes, han sido los accidentes de laboratorio^{7,39,59}, la ingestión de artrópodos infectados, así como de carne cruda o insuficientemente cocida de reservorios y de alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal, orina y secreciones de las glándulas anales de marsupiales^{60,61}.

2.4 CUADRO CLÍNICO. Tradicionalmente, la enfermedad de Chagas presenta 3 fases:

Fase aguda. Después de la infección natural, los primeros síntomas aparecen en 4 a 12 días (período de incubación). Esta fase se caracteriza por la presencia del parásito en sangre periférica y por las manifestaciones muco-cutáneas ocasionadas por la entrada del parásito al organismo y tiene una duración de 2 a 3 semanas aunque puede prolongarse hasta 2 meses³⁶. Después de la picadura del artrópodo, en el sitio de inoculación aparece un nódulo subcutáneo e indoloro, denominado chagoma de inoculación; cuando la vía de entrada es la conjuntiva ocular, se presenta un edema bipalpebral unilateral, duro de color violáceo e indoloro con duración de 2 a 4 semanas y que se conoce como Signo de Romaña, además del crecimiento de los ganglios linfáticos preauriculares y cervicales, constituyendo ambos el complejo oftalmoganglionar.



Fig. 3 Signo de Romaña

Atlas de Parasitología CDC. Atlanta

De los casos en niños que se infectan durante el primer año de vida, aproximadamente el 36% presenta la fase crónica después de 10 a 20 años de la primoinfección⁴⁵.

El parásito puede invadir cualquier célula del organismo, siendo los órganos más afectados, corazón, músculo cardiaco, esquelético, aparato digestivo y sistema nervioso central.

En individuos que adquieren la infección por transfusión sanguínea, los síntomas aparecen entre 20 y 40 días después de la misma; particularmente en los casos inmunocomprometidos, esta fase puede ser fulminante con afección cardíaca y de sistema nervioso central⁶⁰.

La infección puede ser transmitida de la madre al producto y manifestarse como aborto espontáneo, muerte intrauterina o infección aguda, la cual puede detectarse al momento de nacer o bien, semanas después. La infección connatal se caracteriza por presentar fiebre, ictericia, anemia y hepatoesplenomegalia, así como lesiones cutáneas^{1,62-64}.

Fase indeterminada. Se presenta después de la fase aguda y se caracteriza por tener una duración de 10 a 20 años, sin manifestaciones clínicas y los parásitos en sangre suelen ser escasos; el trazo electrocardiográfico (ECG) es normal. La infección se detecta únicamente por serología positiva, ocasionalmente por xenodiagnóstico o cultivo^{63,64}.

Se estima que aproximadamente el 30% de estos individuos, sufrirán posteriormente daño cardiaco, digestivo o neurológico al evolucionar hacia la fase crónica de la enfermedad⁴⁵.

Fase crónica. Se caracteriza principalmente por el desarrollo de una cardiopatía de evolución lenta, progresiva e irreversible, que se expresa clínicamente con insuficiencia cardíaca y cardiomegalia. Los signos y síntomas mas frecuentes son dificultad para respirar (disnea), palpitaciones, dolor precordial e incluso muerte súbita¹¹. Las afecciones digestivas, representan el 6% de los casos crónicos y se manifiestan principalmente en esófago y colon con dilatación de los mismos (*megaesófago* y *megacolon*); raramente ha sido descrito también, afección en duodeno, estómago, vesícula, uréter y vejiga, entre otros. Estos megas son debidos a lesiones tanto del sistema nervioso periférico que inerva estos órganos, así como de las células musculares lisas. Los megas son raros en México a diferencia de Brasil y Chile^{12,63-68}.

En México, al igual que en Argentina la forma más común es la cardíaca⁴¹.



Fig.4 A- cardiomegalia B.- megaesófago C- megacolon

Cortesía: Dras. Salazar Schettino/ Bucio. Facultad de Medicina, UNAM

2.5 PATOGENIA Y PATOLOGÍA

Patogenia. Los mecanismos patogénicos por los cuales *Trypanosoma cruzi* produce lesión son muy variados y determinan la evolución de la infección; éstos factores están relacionados básicamente con las características tanto del parásito como del huésped y la interacción entre ambos⁶⁴.

Factores dependientes del parásito	Factores dependientes del huésped
Polimorfismo	Constitución genética
Tropismo	Sexo
Virulencia	Edad
Constitución antigénica	Especie
Cantidad de parásitos en el inóculo	Raza
	Infecciones
	Respuesta inmunológica
	Temperatura
	Estado nutricional
	Dieta

En la relación huésped-parásito, a nivel celular, las formas infectantes de *T. cruzi* penetran las células huésped y como amastigotes se reproducen por fisión binaria cada 12 horas; de estas formas aproximadamente el 15% sufre degeneración y el resto induce lisis citoplasmática de la célula parasitada⁶⁴.

Patología. Durante la fase aguda de la infección, el parásito se multiplica rápidamente sin reacción inflamatoria alrededor de las células parasitadas. Los parásitos se diseminan a través de la circulación, pudiendo parasitar cualquier elemento del organismo con marcado tropismo hacia células musculares cardíacas, macrófagos, fibroblastos y neuronas así como células musculares estriadas o lisas. La ruptura de las células parasitadas provoca una intensa respuesta inmune inflamatoria, que en casos severos, genera miocarditis aguda, destrucción de ganglios nerviosos autónomos del tracto digestivo y meningoencefalitis.

Con el desarrollo de la inmunidad humoral y celular, el número de parásitos en sangre y en los tejidos disminuye al grado de no ser detectable con los métodos convencionales de diagnóstico. A pesar de la aparición de la respuesta inmune, el parásito persiste en estos individuos tanto en sangre como en tejidos de por vida. En la mayoría de los casos, el daño tisular se limita a pequeños focos de inflamación y fibrosis con daño limitado a ganglios autónomos y células musculares cardíacas.

Durante la fase crónica, puede haber gran daño celular en ausencia de franca invasión parasitaria.



Fig. 5 A. Nido de amastigotes en músculo cardíaco. B. Corazón chagásico

Cortesía: Dras. Salazar, Cabrera y Bucio. Lab. De Biología de Parásitos. Fac. Medicina. UNAM

En la histopatología se presentan dos condiciones fundamentales, el proceso inflamatorio y la lesión celular, principalmente a nivel neuronal, en ambas la respuesta del huésped, al parecer es una consecuencia directa de la multiplicación del parásito, originando daño por destrucción de las células del huésped y/o por mecanismos de sensibilización; existen también alteraciones degenerativas en células no parasitadas inducidas por el proceso inflamatorio o por fenómenos de autoinmunidad.

Lesiones inflamatorias. En la fase aguda se presenta un infiltrado inflamatorio de neutrófilos y a veces sólo de eosinófilos, al evolucionar el padecimiento, los neutrófilos disminuyen y aumentan gradualmente los linfocitos, células plasmáticas y monocitos; posteriormente estos últimos se transforman en macrófagos que eventualmente se fusionan para formar células gigantes multinucleadas (tipo Langhans), todas estas células forman cúmulos denominados propiamente granulomas. En la fase crónica al incrementarse la cantidad de macrófagos y células gigantes, también se forman granulomas.

Lesiones neuronales. Las lesiones se observan después de la ruptura de las células parasitadas, seguidas por la desintegración de las formas parasitarias remanentes. Las lesiones neuronales pueden consistir en vacuolización, alteración en la relación núcleo-citoplásmica con disminución de las prolongaciones dendríticas, lo que reduce considerablemente los contactos sinápticos, tumefacción, plegamiento, necrosis y desintegración.

En la fase crónica de la enfermedad, las lesiones se caracterizan por la presencia de fibrosis peri e intraganglionar además de disminución en el número de neuronas, estas lesiones son irreversibles⁶⁶⁻⁶⁸. La lesión cardíaca y del tubo digestivo se caracteriza por la presencia de infiltrados linfocitarios difusos con escasos parásitos. La respuesta inmune mediada por linfocitos se desencadena contra el tejido cardíaco y ganglionar del tubo digestivo con el desarrollo de cardiomegalias o megas del tubo digestivo principalmente^{36,37}.

2.6 INMUNOLOGÍA. Frente a la infección parasitaria, el huésped desarrolla una amplia variedad de mecanismos que involucran tanto a la inmunidad humoral como celular. En términos generales, la respuesta humoral se desarrolla cuando los parásitos invaden la circulación, mientras que la celular cuando invaden tejidos; por otra parte, el parásito desarrolla al máximo su capacidad reproductiva para aumentar así, como especie, su sobrevivencia y transmisión en la naturaleza. Una de las características de esta parasitosis es la larga permanencia del parásito en el huésped sin que se vea afectada su viabilidad; para lograr esto, los parásitos han desarrollado eficientes mecanismos de evasión a la respuesta inmune.

Después de la primoinfección, durante las primeras semanas, el huésped no desarrolla una respuesta inmune específica a los antígenos parasitarios. La responsabilidad de la defensa del huésped durante este período es asumida por una serie de reacciones en cascada mediadas por factores humorales y coordinadas por las células fagocíticas. En este proceso son de gran importancia la respuesta inflamatoria, los macrófagos y la cascada del complemento⁶⁹.

Los mecanismos de inmunidad evitan que una eventual reinfección de lugar a una nueva fase aguda; a pesar de esta actividad protectora, el microorganismo no es erradicado y

se establece una relación huésped-parásito condicionada por las características de ambos y por factores ambientales que tienden a llevar la infección aguda a la cronicidad. Ha sido descrita una severa inmunodepresión durante la fase aguda de la infección. En la fase crónica la respuesta inmune se restablece en forma parcial o total⁷⁰.

Trypanosoma cruzi presenta múltiples mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped y algunos de ellos están siendo aún estudiados. Entre los mecanismos de evasión de *T. cruzi* se encuentran los siguientes⁶⁹⁻⁷⁷.

Inmunodepresión. Ha sido observado que se presenta una inmunodepresión durante la fase aguda de la enfermedad en forma inversamente proporcional al pico de la parasitemia.

Localización intracelular. Al ser un parásito que se reproduce intracelularmente, reduce su exposición para ser lisado, al resguardarse infectando células de baja capacidad parasitocida (células musculares y nerviosas) o bien, penetrando células con lisosomas e impedir la fusión de estos con el fagosoma.

Capping. *Trypanosoma cruzi* al igual que otros protozoarios intracelulares, expresa antígenos de superficie similares a los de la célula huésped para interferir con la adherencia de anticuerpos líticos a su membrana.

Autoinmunidad. Ha sido demostrada la formación de anticuerpos con reacción cruzada entre el parásito y antígenos de las células de vertebrados que han sido involucrados en la patogénesis del daño celular y de componentes tisulares en el humano, lo cual genera lisis no solo de las células infectadas sino también de las no infectadas.

Variación antigénica. Dependiendo de la fase de desarrollo del parásito se encontrarán diferencias antigénicas; sin embargo aún sigue en controversia si se presenta en *T. cruzi* a diferencia de *T. brucei* que si la presenta.

Activación de la vía alterna del complemento. Los epimastigotes activan la vía alterna del complemento, por lo cual pueden ser lisados por acción de este, a diferencia de los tripomastigotes que son refractarios a esta lisis mediada por complemento, ya que tienen poca capacidad de unión al componente C3 y por lo tanto son capaces de infectar células del huésped que no presentan este receptor en su superficie.

Inhibición de la producción de IL-2. *T. cruzi* puede inhibir la producción de IL-2 y regula la expresión de los receptores de IL-2 y además de contribuir a la inmunodepresión que acompaña la infección.

La infección por *T. cruzi* durante la fase aguda, estimula una respuesta inmune con expresión humoral específica con niveles altos de anticuerpos del tipo IgM, para incrementarse posteriormente cuando la parasitemia desciende los de la clase IgG e IgA lo cual orienta en el reconocimiento de infecciones recientes o crónicas⁷².

2.7 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD. Desde el descubrimiento de la enfermedad de Chagas, han sido utilizados para el diagnóstico numerosos métodos parasitológicos e inmunológicos; algunos han mostrado a través del tiempo una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptables.

Las medidas de control o de detección de la transmisión no vectorial de *T. cruzi* requieren sistemas de diagnóstico eficientes que permitan detectar la infección en el humano, en los donadores de sangre y donadores y receptores de órganos, así como en mujeres embarazadas y sus productos.

La presencia de formas parasitarias y de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* constituyen los elementos más relevantes para el diagnóstico de laboratorio. Por esta razón, los métodos de diagnóstico se clasifican en parasitológicos e inmunológicos.

Métodos parasitológicos. Estos métodos son capaces de demostrar la presencia del parásito en sangre y son los de elección en la fase aguda de la enfermedad donde la parasitemia es constante y elevada; también son útiles en el diagnóstico de la forma de transmisión connatal o en casos atípicos de difícil diagnóstico, como pueden ser los de origen transfusional o por transplante de órganos.

La observación microscópica de tripomastigotes en sangre puede realizarse por examen directo, gota gruesa, o frote, lo cual permite diagnosticar aproximadamente el 90% de los casos especialmente en fase temprana (primer semana) de la infección, y por métodos de concentración para aumentar la sensibilidad diagnóstica, como es el Strout, con el cual se obtiene una sensibilidad mayor al 95% en casos agudos⁷⁴.

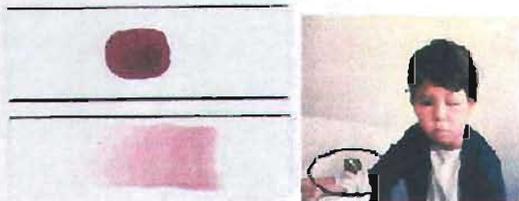


Fig.6 Gota gruesa, Frotis y Xenodiagnostico

Existen otros métodos que se realizan para amplificar el número de microorganismos, como son el xenodiagnóstico en serie, donde triatominos de laboratorio son alimentados con sangre del paciente y su contenido intestinal es examinado 4 semanas después, este método tiene una sensibilidad del 100% en casos agudos y hasta de un 50% en crónicos. Otro método empleado para este fin es el hemocultivo, el cual ofrece buena sensibilidad en casos agudos a diferencia de los crónicos, y al realizarse conjuntamente con el xenodiagnóstico aumenta el porcentaje de casos positivos en la fase crónica. Otros métodos que también pueden emplearse son la inoculación de animales de laboratorio, los cuales podrán ser inoculados tanto con muestras sanguíneas como con macerados tisulares obtenidos por biopsia o en estudios *post-mortem* y el estudio histopatológico con el fin de evidenciar amastigotes^{23,78}.

En años recientes, se está empleando la técnica de PCR, donde se amplifica el ADN del parásito, aún con resultados todavía en controversia debido a que se realiza únicamente en centros de investigación, además del elevado costo para su empleo en el diagnóstico rutinario^{28,35,79}.

Métodos inmunológicos. Además del mecanismo natural para adquirir la infección, actualmente han adquirido relevancia otros mecanismos, especialmente asociados a las áreas urbanas son, la transfusión de sangre o sus componentes y transplantes de órganos y tejidos, sin dejar de mencionar que en áreas rurales es la transmisión connatal, por lo que se requiere de sistemas de diagnóstico eficaces y accesibles que permitan detectar la infección por *Trypanosoma cruzi*.

En las etapas indeterminada y crónica los métodos directos son poco sensibles debido a que la parasitemia circulante es muy baja; por tanto, la detección se realiza con métodos indirectos como es la serología para demostrar la presencia de anticuerpos específicos generados por la infección.

Se han realizado numerosas técnicas serológicas para el reconocimiento de anticuerpos y los avances al respecto han sido considerables desde que Guerreiro y Machado en 1913 emplearon por primera vez un antígeno crudo para la reacción de fijación del complemento; a la fecha, estas pruebas están cada vez más en desuso por su complejidad técnica para su empleo con fines masivos; sin embargo, actualmente existen técnicas como ELISA, HAI e IFI las cuales pueden ser reproducibles en cualquier laboratorio con especificidad y sensibilidad aceptables, además de costos relativamente bajos^{23,63,72,78,80,81}. La técnica de hemaglutinación indirecta tiene una sensibilidad de alrededor del 98% y una especificidad variable, en el caso de la prueba de ELISA esta tiene 98 y 99% respectivamente²³.

El diagnóstico puede establecerse demostrando anticuerpos específicos del tipo IgG o IgM. También pueden utilizarse otros procedimientos como el PCR o de inmunohistoquímica con tinciones especiales de los tejidos afectados; sin embargo, estas técnicas sólo están disponibles en centros de investigación, lo cual limita su uso²⁸.

En términos generales, el inmunodiagnóstico puede establecerse bajo dos criterios:

- I- Cuando se requiere establecer un diagnóstico rápido como es el caso de donadores de sangre u órganos, así como en estudios epidemiológicos; estas pruebas, denominadas de tamizaje o "screening", deben presentar una alta sensibilidad aún cuando la especificidad sea baja como es el caso de la técnica de hemaglutinación indirecta.
- II- Para detecciones precisas o confirmatorias; es decir en casos donde existen antecedentes clínicos y/o epidemiológicos importantes, en estos casos deberán emplearse como mínimo dos pruebas con técnicas de diferente principio realizadas simultáneamente³⁵.

Con la experiencia de diversos centros de diagnóstico e investigación, se ha determinado que algunas pruebas han mostrado sensibilidades y especificidades adecuadas, sin dejar de considerar su reproducibilidad, con lo cual, a la fecha se busca no sólo obtener resultados confiables sino además comparables en los diferentes centros de diagnóstico y/o investigación²³.

Debido a que este parásito comparte antígenos con otros tripanosomátidos, es esencial la identificación y caracterización de antígenos específicos para estudios relacionados con el serodiagnóstico, inmunoprolifaxis y patogénesis. Respecto a esto, en México existe la infección por *Leishmania* spp. cuya distribución puede ser coendémica con *T. cruzi* en ciertas regiones.

Los métodos serológicos empleados para estos fines, si son valorados con base en su nivel de reactividad, son considerados los de más alta calidad, aquellos capaces de detectar concentraciones muy bajas de anticuerpos como es el caso del inmunoensayo enzimático (ELISA indirecta); pruebas de reactividad intermedia como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI); y pruebas consideradas con baja reactividad como es la reacción de fijación del complemento. La OPS/OMS recomienda especialmente el uso de las siguientes pruebas: Hemaglutinación indirecta, ELISA indirecta e Inmunofluorescencia indirecta²³⁻²⁵.

Cuadro 1

**Métodos Serológicos y Moleculares para el Diagnóstico de la
Infección por *Trypanosoma cruzi*²⁵**

SITUACIÓN*	CONVENCIONALES			NO CONVENCIONALES	
	ELISA	IFI	HAI	Antígenos recombinantes	PCR
Confirmación de caso clínico (Se recomiendan dos pruebas) ¹	X	X	X	X	
Control de sangre a transfundir (Se recomienda una prueba) ¹	X		X		
Detección de infección congénita (Se recomiendan dos pruebas)	X	X		X	X
Investigación epidemiológica (Se recomiendan dos pruebas) ²	X	X	X		
Seguimiento a paciente tratado (Se recomiendan dos pruebas) ¹	X	X	X	X	X

1. Únicamente cuando un programa de control de calidad con componentes interno y externo haya sido instalado.
2. Toma de muestra en papel de filtro.

Para la confirmación serológica se deben seleccionar las pruebas tomando en consideración los antígenos empleados, así como el tipo de anticuerpos que se desean demostrar. Si se realizan dos pruebas simultáneamente, la certeza diagnóstica estará entre el 98 y 99.5%. Sueros con reactividades discordantes deberán ser sometidos a una tercera evaluación con otra técnica y en caso de repetirse la discordancia realizar nuevamente el procedimiento con nueva muestra. Por otro lado, es importante determinar para cada zona geográfica los títulos reactivos específicos en cada prueba para evitar reacciones cruzadas por la presencia de anticuerpos afines generados por otras infecciones.

La conservación y toma de la muestra son de suma importancia para la obtención de resultados confiables; tradicionalmente el serodiagnóstico se ha realizado con muestras sanguíneas obtenidas por punción venosa, lo que dificulta y encarece su manejo en campo, con riesgo de disminuir la calidad de estos productos al llegar a los centros de diagnóstico. Para evitar estas dificultades, desde 1932 existen trabajos, donde para evitar la punción venosa, se realizan tomas de muestras sanguíneas en papeles absorbentes por punción digital que facilitan la toma y conservación del producto⁸²⁻⁸⁸.

Las primeras pruebas serológicas efectuadas con eluidos séricos obtenidos de papel para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas las realizaron Maekelt en 1960, Sadun en 1963, Souza y Camargo en 1966, Neal y Miles en 1970, Alvarez en 1971, Franco y Chamma en 1973, entre otros⁸³⁻⁸⁸. En México, Goldsmith y Kagan en 1972, Salazar en 1984 y 1989 utilizaron esta metodología para obtención de muestras sanguíneas⁸⁹⁻⁹¹.

La toma de muestra en papel filtro, presenta ciertas ventajas comparada con la venopunción; entre ellas, la mas importante es que al requerir un volumen pequeño de muestra, se puede obtener por punción digital, se toma rápidamente por lo que el número de muestras por jornada es mayor y no requiere de personal capacitado. Por otro lado, la conservación y el transporte son muy sencillos ya que estas muestras no requieren de una red fría hasta su procesamiento como es el caso en el manejo de sueros en donde además se requiere de centrifugación para la separación del producto. Existen gran cantidad de encuestas serológicas realizadas a partir de eluidos obtenidos de papeles filtro en nuestro país y en otros países cuyos resultados muestran una buena correlación de este procedimiento cuando se compara con el suero obtenido por venopunción^{24,78,92-101}.

Debido a que sólo el 5% o menos de los infectados presentan un cuadro clínico típico de infección aguda, las pruebas serológicas son apropiadas para detectar prevalencias de la infección; la información que se obtiene, es por lo tanto, sumamente valiosa no sólo para el diagnóstico de casos aislados sino a nivel epidemiológico. Los estudios serológicos realizados en poblaciones rurales combinados con la electrocardiografía y antecedentes clínico-epidemiológicos dirigidos, han permitido determinar la prevalencia de la infección chagásica y su relación con patologías cardíacas de la enfermedad^{36,90,91,102}.

2.8 ANTÍGENOS EN EL DIAGNÓSTICO. En algunos países de Sudamérica y en el nuestro, existen áreas endémicas donde pueden coexistir las infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. Estos flagelados poseen determinantes antigénicos compartidos que pueden mostrar cruce inmunológico, por lo que la especificidad en el inmunodiagnóstico representa gran importancia.

La primera prueba serológica con fines diagnósticos, fue la reacción de Guerreiro y Machado en 1913, la cual consistía en un ensayo de fijación del complemento con un antígeno inicialmente extraído de órganos de tejidos de animales infectados con *T. cruzi* y que posteriormente fue modificado por otro proveniente de formas parasitarias obtenidas de medios de cultivo¹⁰³.

Desde ese momento a la fecha, se han realizado multitud de estudios con el fin de mejorar cada vez más tanto la sensibilidad como la especificidad en el diagnóstico; así, Kelsner en 1936 obtiene a partir de epimastigotes un antígeno somático crudo con baja especificidad. Davis en 1943 introduce la centrifugación de los medios de cultivo, el uso del timerosal y el congelamiento en hielo seco; la extracción de este antígeno fue modificada por varios investigadores con lo cual mejoró su eficacia. Muniz y Freitas en 1944 demuestran por vez primera la presencia de componentes antigénicos comunes en diferentes fases del parásito¹⁰³.

Boyden en 1951 emplea por primera vez la prueba de hemaglutinación indirecta con el antígeno de Davis con buenos resultados; hasta que en 1960, Fife y Kent purifican aun más el antígeno, lo tratan con cloroformo y lo separan en una fracción proteica y otra de carbohidratos eliminando las reacciones cruzadas^{104,105}. En 1966 Séneca extrae un lipopolisacárido al que denomina "chagastoxina" que es empleado con fines de inmunización, desafortunadamente este antígeno resultó ser muy inestable además de obtenerse en muy pequeñas cantidades a partir de los lisados sónicos^{106,107}. Segura en 1974 y 1977 evaluó la eficacia de 5 fracciones subcelulares de epimastigotes, empleando estos antígenos con fines diagnósticos e inmunoprotectores^{108,109}.

Debido a que la membrana del parásito es la primera y más importante área de contacto con el huésped, tiene especial interés el estudio de las proteínas y glucoproteínas que la conforman. El estudio de la membrana celular del parásito permite definir diferentes patrones de proteínas para cada estadio; Snary en 1979 identifica una glucoproteína de 90 kDa presente en la superficie celular en las fases de amastigote, epimastigote y tripomastigote empleada con éxito para el diagnóstico diferencial de *T. cruzi* con *T. rangeli* y *Leishmania* spp¹¹⁰, Nogueira en 1981 y 1982 refiere esta proteína como el principal antígeno detectado en sueros de pacientes crónicos la cual es encontrada en tripomastigotes sanguíneos y amastigotes y plantea la factibilidad de su empleo con fines inmunoprolácticos; también describe una glucoproteína de 75 kDa específica en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos^{111,112}.

Bongertz en 1981 describió en animales de experimentación la presencia de antígenos de *T. cruzi* en orina durante la fase aguda de la infección. Corral en 1984 también lo refiere en niños con infección aguda o congénita y Katzin en 1989 en pacientes crónicos¹¹³ y Umezawa estudia un antígeno excretado en orina en el 60% de pacientes humanos en fase crónica, cuyo peso molecular se localiza entre 150-160 kDa¹¹⁴.

Scharfstein en 1983, 85 y 86 estudia una glucoproteína de 25 kDa la cual se aisló de la superficie de todas las fases y en diferentes cepas del parásito, con buena reactividad en sueros chagásicos provenientes de diferentes áreas endémicas y sin cruce en sueros de pacientes infectados con *Leishmania* sp.¹¹⁵⁻¹¹⁷. Con el fin de mejorar el inmunodiagnóstico, especialmente en áreas donde las infecciones por *T. cruzi* y *Leishmania* sp. son coendémicas, Tachibana propone el empleo de esta glucoproteína además de un anticuerpo monoclonal que a la microscopía electrónica la reconoce como un antígeno común en la membrana plasmática y el filamento axial del flagelo (axonema)^{118,119}.

Una glucoproteína de superficie de 72 kDa descrita por Araujo en 1984 y Ferguson en 1985 se encontró en las formas de epimastigote y tripomastigote metacíclico, al parecer ausente en las formas sanguíneas y en el Amastigote^{120,121}. Los trabajos de

Joiner en 1985 demostraron que esta glucoproteína es el sitio receptor en la membrana del factor C3 del complemento involucrado en la lisis de epimastigotes por la vía alterna del complemento en sueros normales de mamíferos, está presente en las fases aguda y crónica de la enfermedad y en los trabajos de Schechter en 1986 se comprobó su presencia en cepas, clonas y sueros de pacientes independientemente del origen geográfico de los mismos^{122,123}. Araujo en 1986 describió un complejo de antígenos de PM entre 21 y 31 kDa, los cuales fueron evaluados con buenos resultados diagnósticos y sin cruce con *Leishmania braziliensis* y *L. donovani*¹²⁴.

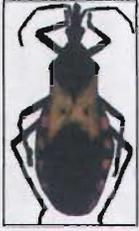
Schechter y Nogueira describieron otra glucoproteína de 75 kDa presente en los estadios que se desarrollan en el transmisor la cual no presentaba cruce inmunológico y no se relaciona bioquímicamente con la de 90 kDa^{111,112,125}.

Los trabajos de Fischer en 1988, responsabilizaron a una glucoproteína de 58 kDa obtenida de tripomastigotes de cultivos de inhibir la unión celular con el factor C3 del complemento humano¹²⁶.

Actualmente, se están realizando estudios con antígenos recombinantes para el diagnóstico de la enfermedad; Almeida en 1990 realizó estudios al respecto en bancos de sangre, Krieger en 1992 durante la fase aguda de la enfermedad y Lorca en 1992 y 1993 en pacientes sintomáticos, asintomáticos y en crónicos, Gruber en 1993 caracteriza dos Ag recombinantes, de los cuales uno es propuesto como un candidato promisorio para el diagnóstico de la enfermedad. En Brasil, Paraguay, Argentina y Bolivia, varios investigadores están trabajando con péptidos sintéticos para su aplicación en las pruebas de ELISA y PCR.

Aún cuando existen algunas publicaciones respecto al empleo de antígenos recombinantes, péptidos sintéticos y PCR, su empleo con fines diagnósticos o para encuestas epidemiológicas aún se encuentra restringido¹²⁷⁻¹³⁶.

3. TRANSMISOR



Ubicación taxonómica

Phylum Artropoda

Subphylum Mandibulata (Antennata)

Clase Hexapoda (Insecta)¹³⁷

Orden Hemiptera

Familia Reduviidae

Subfamilia Triatominae

Géneros	<i>Belminus</i>
	<i>Dipetalogaster</i>
	<i>Eratyrus</i>
	<i>Panstrongylus</i>
	<i>Paratriatoma</i>
	<i>Rhodnius</i>
	<i>Triatoma</i>

El transmisor, huésped intermediario, es un artrópodo hematófago del que han sido reportados en la República Mexicana, 7 géneros y del género *Triatoma*, 24 especies distribuidas en todo el territorio nacional^{19,20,138}.

El ciclo de vida comprende los estadios de huevo, cinco ninfales y el adulto, con duración de diferentes periodos de tiempo según la especie y disponibilidad de alimento; la mayoría de las especies lo realiza entre 5 y 12 meses en función de la disponibilidad de alimento, humedad y temperatura¹³⁹.

El triatomino es conocido en zonas rurales y según la región recibe diferentes nombres, de los que han sido descritos alrededor de 40 entre los más comunes: chinche picuda, chinche hocicona, chinche besucona, pick, chinche voladora, mesquite, botijilla, chupasangre, hijacamat, coruco, chinche del monte, talaje, chumil y chinche trompuda, entre otros¹⁴⁰.

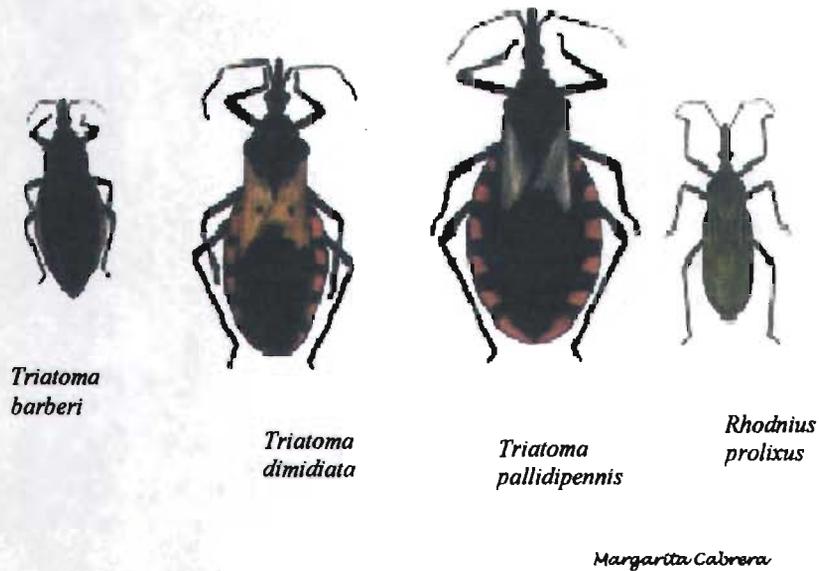


Fig. 7 Transmisores de *Trypanosoma cruzi*

4. JUSTIFICACION

En México no se reconoce a la Enfermedad de Chagas como problema de Salud Pública debido a que son pocos los trabajos realizados al respecto, con diferentes metodologías y no se han realizado en todos los estados del país.

La seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en el estado de Veracruz se desconoce, aun cuando en la Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE) en 1987 encontró una seroprevalencia del 3% para el estado. Por otro lado los padecimientos cardiovasculares se encuentran entre las tres primeras causas de mortalidad; sin embargo no se realiza el diagnóstico serológico con antígenos y pruebas estandarizadas y validadas adecuadamente.

Los trabajos serológicos realizados hasta ahora utilizan antígenos de origen extranjero, extraídos de cepas obtenidas de diferentes transmisores y reservorios de la enfermedad; realizados con diferentes técnicas, por lo cual es importante la extracción de antígenos de *T. cruzi* de cepas de regionales para mejorar la sensibilidad diagnóstica.

5. HIPÓTESIS

En el estado de Veracruz se encuentran los factores necesarios para que se lleve a cabo la dinámica de transmisión natural de *Trypanosoma cruzi*, que favorecen el contacto y convivencia con el vector (artrópodo), características de la vivienda del humano entre otros; de ahí que, al juntarse estas condiciones es posible que se dé la infección en el hombre y ésta detectarse mediante pruebas serológicas sensibles y específicas.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia la Enfermedad de Chagas con la técnica de hemaglutinación indirecta con un antígeno regional, en 11 jurisdicciones sanitarias del estado de Veracruz.

OBJETIVOS PARTICULARES

Extraer antígenos de cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*.

Caracterizar inmunoquímicamente los componentes del extracto antigénico obtenido.

Validar el extracto antigénico obtenido.

Estandarizar la técnica de Hemaglutinación indirecta con el extracto antigénico y eluidos séricos.

Validar la técnica de hemaglutinación indirecta mediante pruebas intraensayo e interensayo.

Establecer la seroprevalencia de infección con *Trypanosoma cruzi*, mediante la prueba de Hemaglutinación indirecta con eluidos séricos con un antígeno de origen mexicano en cada jurisdicción sanitaria.

7. METODOLOGÍA

Este trabajo forma parte de un estudio integral realizado en el estado de Veracruz denominado " Importancia de la Enfermedad de Chagas en el Estado de Veracruz" realizado de 1997 a 2003, con objeto de identificar la prevalencia en cada Jurisdicción Sanitaria del estado, los principales factores de riesgo asociados a ella, así como los índices entomológicos y su interrelación como factor de riesgo para la infección Chagásica.

7.1 Tipo de estudio. Se llevo a cabo un estudio epidemiológico de tipo transversal realizado por el personal del Laboratorio de Biología de Parásitos, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, conjuntamente con el personal de la Secretaría de Salud del estado. Inicialmente se realizaron un estudio piloto y talleres de capacitación al personal del área de vectores de la Secretaria de salud; donde se les indico como realizar la encuesta, toma de muestra sanguínea en papel filtro y por punción venosa, así como búsqueda intencionada de triatominos.

7.2 Tamaño de la muestra. El estado de Veracruz se encuentra integrado por 11 Jurisdicciones Sanitarias (J.S.), que incluyen 17,390 localidades y 210 municipios, con una población estatal de 7,059,360 habitantes.

Se obtuvo un tamaño de muestra que pudiese ser representativo para cada Jurisdicción Sanitaria y los individuos incluidos en ella fueron seleccionados en forma aleatoria, siempre y cuando hubiesen habitado en la comunidad por lo menos durante el último año y sin antecedentes transfusionales.

El tamaño de muestra se obtuvo para cada Jurisdicción Sanitaria, mediante fórmula de proporciones poblacionales, en la que la prevalencia es una proporción¹⁴¹:

$$n = \frac{Npq}{(n - 1) D + pq}$$

En donde:

n = Tamaño muestral

N = Total poblacional de cada jurisdicción

p = Prevalencia de enfermedad de Chagas estimada en otros estudios (15%)

q = 1 – p

D = Intervalo de confianza al 95%

$$D = \frac{B^2}{4}$$

B = Magnitud del límite de error (2%)

Para compensar el tamaño de la muestra, aún después de aplicar los criterios de selección, se aumentó el 20% al tamaño de muestra.. Con base a lo anterior, el número de muestras requeridas y procesadas se describe en el cuadro 2.

Cuadro 2

Muestras requeridas y procesadas en el estudio

Jurisdicción Sanitaria	Requeridas	Procesadas
PÁNUCO	1526	1222
TUXPAN	1525	1270
POZA RICA	1528	1182
MARTINEZ DE LA TORRE	1525	1357
XALAPA	1528	1291
CÓRDOBA	1528	1290
ORIZABA	1526	1592
VERACRUZ	1528	1313
COSAMALOAPAN	1525	43
SAN ANDRÉS TUXTLA	1526	1282
COATZACOALCOS	1528	1445
TOTAL	16,793	13,294

7.3 Criterios de selección:

Criterios de inclusión.

Haber habitado en la comunidad por lo menos durante un año.

Ser mayor de un año de edad.

Criterios de exclusión.

Antecedente transfusional.

Criterios de eliminación.

Muestra de sangre no identificada, insuficiente o contaminada.

Cuestionario ausente o con información incompleta.

7.4 Encuesta. Se procedió a realizar una encuesta *ad hoc* por interrogatorio directo para recabar la información requerida relacionada con las siguientes variables de estudio: Biológicas, Socioculturales, Ambientales, Estilo de vida y Clínicas. Esta información se obtuvo mediante entrevista personal a un individuo adulto; cuando en la primera visita, no se encontró un adulto, se regresó a la vivienda hasta en tres ocasiones.

Obtención de muestras de sangre en papel filtro. La toma de muestra sanguínea se realizó mediante punción digital con lanceta desechable estéril en papel filtro Whatman No.1 asegurándose de que el papel haya quedado bien impregnado por ambos lados.

Las muestras se identificaron y dejaron secar a temperatura ambiente, sin exposición directa a la luz solar y se guardaron individualmente en papeles absorbentes hasta su envío, junto con los cuestionarios correspondientes al Laboratorio de Biología de Parásitos para su procesamiento.



Fig. 8 A. Punción digital. B. Toma de muestra en papel filtro.
C. Secado de la muestra

7.5 Antígeno.

7.5.1 Adaptación y expansión de parásitos (cepa TQ) en medios de cultivo bifásico y monofásico³⁵. Se utilizaron medios bifásicos para adaptar los parásitos y monofásicos para la expansión de los mismos con el fin de obtener epimastigotes libres de componentes sanguíneos y realizar las extracciones antigénicas para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas con la prueba de hemaglutinación indirecta en microplaca.

7.5.2 Cosecha de parásitos y extracción antigénica³⁵. Los parásitos se cosecharon por centrifugación y se lavaron en 3 ocasiones con PBS pH 7.2 a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Sorvall RC 26 Plus); el último lavado se hizo con solución salina isotónica (SSI); los sobrenadantes fueron desechados en cada lavado; la masa húmeda se cuantificó y almacenó a -45°C hasta la extracción antigénica. Para la extracción antigénica, la masa parasitaria se diluyó 1:20 con una solución de tioglicolato de sodio 1:1000; a partir de esta solución se realizó la lisis y ruptura parasitaria con un homogenizador de tejidos (Tekmar Tissumizer SDT-1810) a 2000 rpm en baño frío (hielo/etanol) durante 15 minutos; el material obtenido se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 15 minutos para obtener el antígeno crudo (sobrenadante); el cual se isotonizó con NaCl, se fraccionó y mantuvo a 4°C durante 48 hrs. para ser almacenado y conservado en criotubos de tapón de rosca a -35°C hasta su empleo.

7.5.3 Caracterización inmunoquímica del extracto antigénico.

7.5.3.1 Cuantificación de proteínas y carbohidratos totales^{142,143}. La cuantificación de proteínas totales se determinó por método de Lowry modificado, construyendo una curva patrón con albúmina sérica bovina (BSA 1mg/ml). Se realizaron diferentes diluciones del antígeno obtenido para seleccionar la que presentaba lecturas (D.O.) cercanas a la parte media de la curva patrón y calcular así la concentración por ml y el rendimiento final de la masa parasitaria. La cuantificación de carbohidratos totales se realizó por el método de Fenol-Sulfúrico de Dubois, construyendo una curva patrón con glucosa (1mg/ml). Se realizaron diluciones del antígeno obtenido de cada aislado para calcular la concentración final igual que en el caso anterior.

7.5.3.2 Separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE)¹⁴³. Para la separación por peso molecular de los componentes de los extractos antigénicos, se siguió en términos generales la metodología descrita por Laemmli en 1970; se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 y 12.5% en condiciones reductoras, con dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE) en un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 100 volts durante 140 minutos con una fuente de poder Bio Rad Modelo 200/2.0. Se usó amortiguador de corrimiento constituido por 0.025 M Trizma-base (Tris [hidroximetil] aminometano), 0.192 M glicina y dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3. Las muestras se prepararon en un amortiguador constituido por 3.125 ml de Trizma-base 1M pH 6.8, 5 ml de glicerol, 1.25 ml de SDS al 10%, 2.5 ml de β mercaptoetanol, 2.5 mg de azul de bromofenol y agua desionizada para aforar a 25 ml y se sometieron junto con los marcadores de peso molecular a ebullición en baño maría durante 5 min. El volumen de las muestras se ajustó para contener entre 20 y 47 μ g de proteína por carril. Los marcadores de peso molecular fueron de 14,300 a 200,000 kDa (weight range, Gibco BRL). Después de la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 (Sigma) durante 10 min.

7.5.3.3 Electroinmunotransferencia de los componentes del extracto antigénico con sueros testigo (Western-blot)¹⁴⁵. Después del análisis electroforético, las proteínas se transfirieron a una matriz de nitrocelulosa con poro de 0.45 μ m (Bio-Rad) en un equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad) a 12 volts durante 22 min, con un amortiguador de transferencia constituido por Tris-Base 0.025 M, glicina 0.192 M y metanol al 20%, pH 8.3. Después de concluida la transferencia, el papel de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 5% (Difco) en PBS-Tween 20 al 0.3% durante 2 hrs. a temperatura ambiente en agitación ligera; se realizaron 2 lavados rápidos con PBS-Tween 20 al 0.3% y se incubaron los sueros testigo reactivos a *T. cruzi*, *L. mexicana* y normales (procedentes de la seroteca del Lab. de Biología de Parásitos) en dilución 1:70 a 4°C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.3% y posteriormente se incubó con el conjugado anti IgG humano obtenido en cabra unido a peroxidasa (Zymed) en dilución 1:5000, durante 2

horas a temperatura ambiente. Se realizaron 5 lavados y se colocó el sustrato correspondiente DAB (3,3 diaminobenzidina) en una solución de Tris HCl-50mM pH 7.6 con peróxido de hidrógeno al 30% en oscuridad. La reacción se frenó con agua destilada. La nitrocelulosa se dejó secar y se conservó a temperatura ambiente hasta realizar la evaluación de reactividad antigénica así como la identificación de los componentes por peso molecular.

7.6 Estandarización de la técnica de hemaglutinación indirecta en microplaca.

7.6.1 Sensibilización de glóbulos rojos con el extracto antigénico³⁵.

a) Obtención de glóbulos rojos de pollo. Los pollos fueron heparinizados con 0.5 ml de heparina intravenosa (5000 U/ml) en el ala 20 minutos antes de realizar el sangrado; la sangre se recibió en matraces estériles, cada uno con 100 ml de anticoagulante (BRK) y 0.5 ml de una mezcla de estreptomicina-penicilina-anfotericina y se dejaron reposar durante 24 horas.

b) 1ª Fijación con Formol. Después del reposo de los eritrocitos, se retiró el plasma y se filtró por gasa, se adicionó una solución de PBS pH 7.2 en proporción 1:10, se centrifugó durante 10 minutos a 2500 rpm y se desechó el sobrenadante; se repitieron los lavados hasta que no se observó hemólisis en el sobrenadante.

Se determinó el volumen globular como porcentaje de hematócrito ajustando al 8% con PBS pH 7.2 y se agregó igual cantidad de una solución de formol al 8%. El paquete globular se dejó en agitación mecánica durante 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó lavando con PBS pH 7.2, ajustando la suspensión a hematócrito al 8% y se agregó azida de sodio al 1% para obtener una dilución final de 1/10 000.

c) Tanado. El paquete globular se llevó al 1.5% con PBS pH 7.2 y se agregó un volumen igual de ácido tánico 1/10 000 en PBS pH 7.2 incubando 40 minutos a 37°C; posteriormente se desechó el sobrenadante por centrifugación, lavando 3 veces con PBS pH 7.2/suero normal.

d) Sensibilización con el extracto antigénico. El botón de eritrocitos se resuspendió en 50 ml de PBS pH 7.2/suero normal y se calculó el volumen globular como porcentaje de hematócrito, sensibilizando los eritrocitos con el extracto antigénico con la siguiente relación: por cada mililitro de eritrocitos, 2 ml de antígeno, posteriormente se incubó a 37°C en baño termostatzado durante 2 horas agitando manualmente cada 10 minutos; después, el paquete se centrifugó y se lavó con PBS pH 7.2 / suero normal.

e) 2ª. Fijación con formol. El botón fué resuspendido en PBS pH 7.2 agregando igual volumen de formol al 6% en PBS pH 7.2 en agitación mecánica a 4°C durante aproximadamente 12 horas para posteriormente centrifugar, eliminando el sobrenadante y realizar un lavado del paquete globular con PBS pH 7.2/suero normal, resuspendiendo con 25 ml de solución protectora; nuevamente se determinó el hematócrito ajustando a 5.75% para llevarlo finalmente a 1% con PBS pH 7.2. La suspensión antigénica obtenida fue envasada en frascos de 10 ml con tapón de caucho y precinto metálico (tipo penicilina) para su almacenamiento y conservación a 4° C.

7.6.2 Validación del antígeno^{23,24}. El análisis consistió en los cálculos de sensibilidad, especificidad y determinación de valores predictivos positivo y negativo empleando un panel de 20 sueros reactivos y no reactivos a *T. cruzi* con un antígeno mexicano y otro argentino proporcionado por el Instituto "Dr. Mario Fatala Chaben" de la República de Argentina, de acuerdo a las siguientes fórmulas y definiciones:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}} \times 100$$

Sensibilidad: proporción de muestras positivas (reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada.

Especificidad: proporción de muestras positivas (no reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada.

Verdaderos Positivos (VP): resultados positivos obtenido con las muestras de individuos infectados.

Falsos Positivos (FP): resultados positivos obtenido por la prueba con las muestras de la población normal.

Verdaderos Negativos (VN): resultados negativos obtenido con las muestras de individuos normales.

Falsos Negativos (FN): resultados negativos obtenido por la prueba con las muestras de la población de infectados.

Valor predictivo positivo (VPP)

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos Positivos}}{\text{Verdaderos Positivos} + \text{Falsos Positivos}} \times 100$$

Valor predictivo positivo (VPP): es la probabilidad de un individuo de estar infectado, cuando el resultado de la prueba empleada ha sido positivo.

Valor predictivo negativo (VPN)

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos Negativos}}{\text{Falsos Negativos} + \text{Verdaderos Negativos}} \times 100$$

Valor predictivo negativo (VPN): es la probabilidad de un individuo de no estar infectado, cuando el resultado de la prueba empleada ha sido negativo.

Determinación de reacción cruzada. Se realizó la prueba de hemaglutinación indirecta en microplaca con 10 sueros de individuos con anticuerpos anti *Leishmania mexicana* proporcionados por la Dra. Ingeborg Becker de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.

7.6.3 Estandarización de la técnica con eluidos séricos.

Elución de sueros. Se realizaron diferentes pruebas de elución de la muestra de sangre en papel filtro cortando círculos y eluyendo a diferentes tiempos con solución de PBS pH 7.2. Inicialmente se determinó por diferencia de pesada, la cantidad de sangre absorbida por cada círculo y se calculó la cantidad de diluyente con base en la dilución requerida para trabajar la muestra (1:16) tomando en consideración un hematócrito de 47%^{82,87,88,90,92}.

7.6.3.1 Determinación del título de corte.

Se hicieron diluciones seriadas desde 1:2 hasta 1:1024, el título de corte se definió con el título ubicado en la zona intermedia entre los sueros reactivos (positivos) y no reactivos (negativos) con 20 sueros de referencia (argentinos), el cual fue determinado para cada lote de antígeno.

Cuando un procedimiento es empleado con fines de tamizaje, especialmente cuando se emplea únicamente una técnica serológica, se recomienda recorrer el título de corte a la dilución previa con el fin de incrementar la sensibilidad epidemiológica, aún cuando se vea afectada la especificidad.

7.6.3.2 Evaluación de la técnica serológica con pruebas intraensayo e interensayo^{23,146}.

Intraensayo. Con el fin de evaluar la reproducibilidad de la prueba serológica se realizó un ensayo con 3 sueros reactivos a *T. cruzi* (sueros 12, 14 y 20), usando 2 lotes de antígeno, uno de reciente extracción (Ag-TQ-2) y otro mantenido en conservación más de un 1 año a 4°C (Ag-TQ-1). Para determinar diferencias en el comportamiento de ambos antígenos, la prueba se repitió 15 veces en un día, con los datos obtenidos se realizó un análisis comparativo por X^2 , desviación estándar y coeficiente de variación.

Interensayo.

- 1) Se realizó el ensayo con los mismos sueros 15 veces cada 24 hrs con los datos obtenidos se realizó un análisis comparativo por X^2 , desviación estándar y coeficiente de variación.
- 2) Con el fin de conocer el comportamiento de los dos lotes de antígeno se realizó una prueba de concordancia kappa (k), la cual es útil cuando se requiere evaluar dos o más reactivos (lotes de antígeno) frente a un mismo panel de sueros de referencia según la fórmula:

k = índice kappa

Po = concordancia esperada por azar

Pi = concordancia observada

7.6.3.3 Procesamiento de muestras.

Elución de sueros

Se colocaron los círculos de papel filtro con la muestra sanguínea en tubos de polipropileno desechables y se agregaron 125 μ l de PBS pH 7.2 estéril. Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 horas y se mezclaron en agitador mecánico tipo vortex durante 2 min. Se tomaron 25 μ l del sobrenadante para realizar la técnica en microplaca.



Fig.9 Procesamiento de muestras con la prueba de hemaglutinación indirecta

7.6.3.4 Reacción de hemaglutinación indirecta.

La prueba se realizó en diluciones seriadas del suero problema en placas de poliestireno de 96 pozos con fondo en U desechables frente a la suspensión de eritrocitos sensibilizados con el antígeno:

Se colocaron 25µl de PBS pH 7.2 en cada pozo.

Se agregaron 25µl de los sueros testigo positivo y negativo en los 2 primeros pozos y en los subsecuentes 25µl de los sueros problema.

Se hicieron las diluciones seriadas con pipeta multicanal (1:16, 1:32 y 1:64).

Se agregaron 25µl de la suspensión antigénica en cada pozo y se agitó la placa para homogenizar el contenido de los pozos.

Finalmente, se dejaron reposar durante 60 min a T° ambiente para realizar la lectura correspondiente.

Interpretación de la prueba:

Positivo: manto de aglutinación en el fondo del pozo entre el 100 y 50%.

Negativo: los eritrocitos se aprecian sin aglutinar en el fondo del pozo.

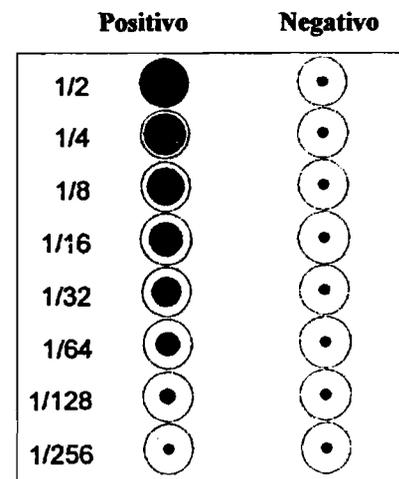


Fig.10 Interpretación de la prueba, donde se observa el manto positivo desde la dilución 1:2 hasta 1:64³⁵

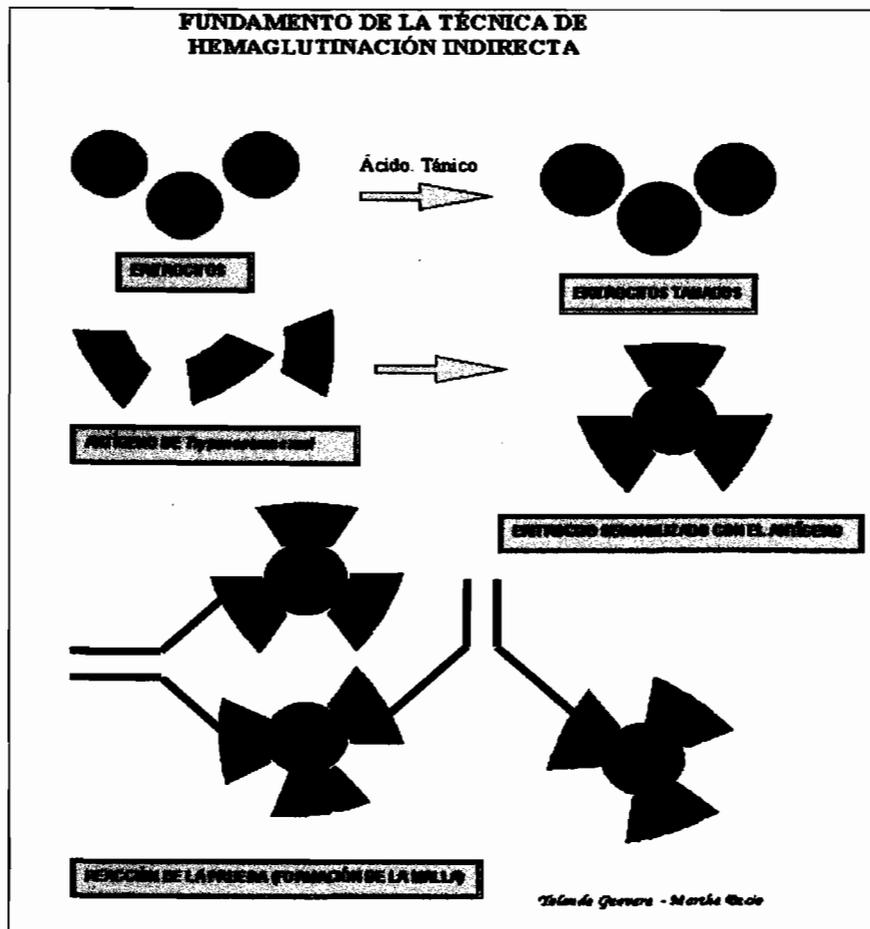


Fig.11 Fundamento de HAI

Se usan eritrocitos cuya membrana ha sido modificada por tratamiento con ácido tánico, comportándose así como partículas inertes capaces de absorber los antígenos sobre su superficie, estos eritrocitos sensibilizados con el antígeno son aglutinados en presencia de anticuerpos específicos (suero positivo). La reacción de hemoaglutinación puede ser efectuada de un modo rápido y simple en placa de poliestireno con pozos fondo en "U", con lectura a ojo desnudo.

La ventaja principal de esta técnica es su sensibilidad, además de que puede probar un gran número de sueros. En esta prueba se debe tener cuidado para controlar las reacciones inespecíficas, lo que hace necesario utilizar los controles adecuados ^{82,99}.

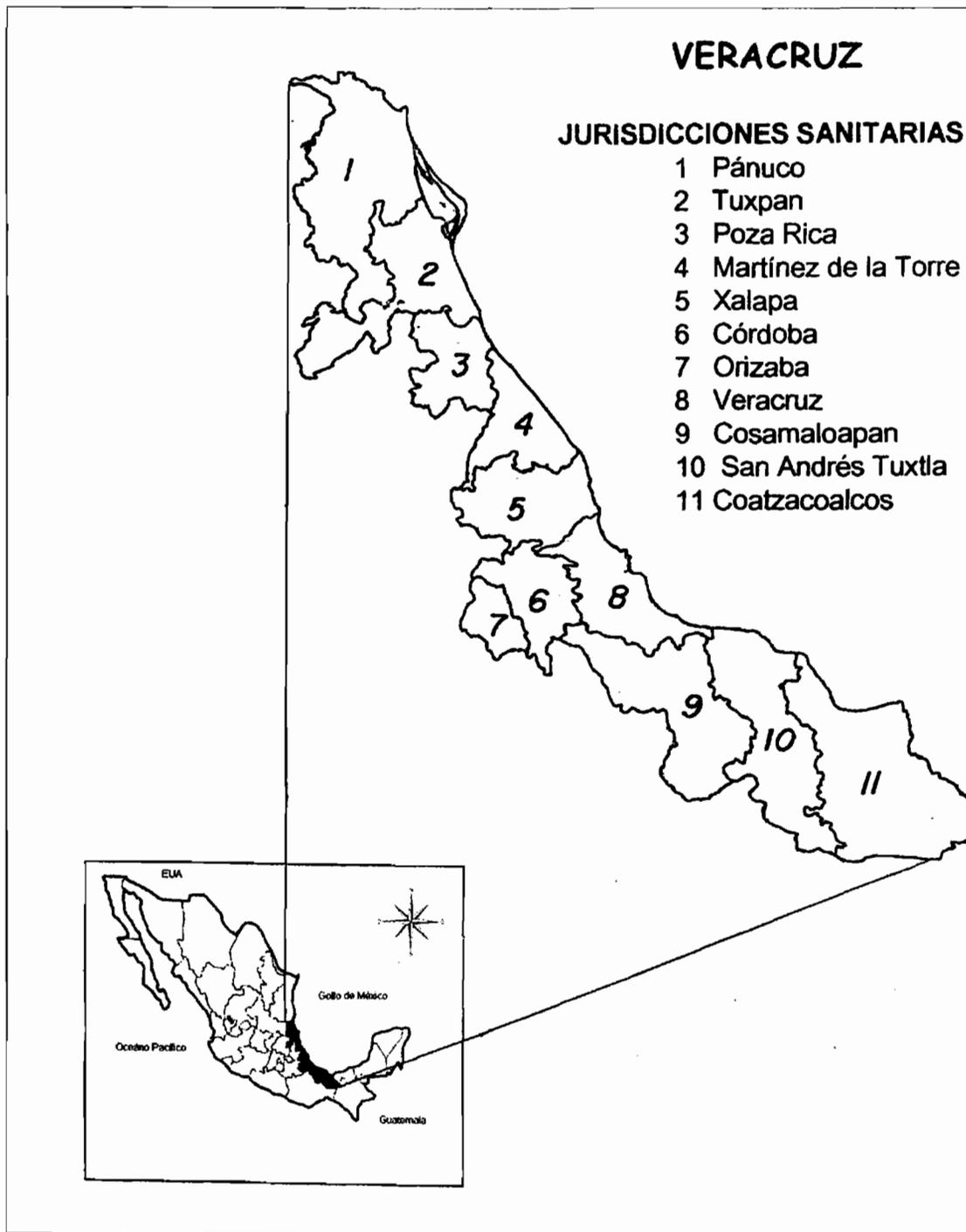


Fig.12 Mapa de Veracruz mostrando las zonas de estudio

8. RESULTADOS

Se procesaron 13,294 eluidos séricos procedentes de 10 jurisdicciones sanitarias del estado de Veracruz cuyos resultados se muestran en la Tabla 1 y Gráfico 1, en donde se observa que la seroprevalencia determinada para el estado fue de 2.4% con un intervalo de confianza de 2.3% - 2.5%, la jurisdicción sanitaria que presentó la más elevada fue Coatzacoalcos (4.3%) y la más baja Martínez de la Torre (0.7%).

En la dilución 1:16 se observó mayor número de muestras positivas, en todas las jurisdicciones sanitarias excepto en Martínez de la Torre donde se observó en la dilución 1:32 (Tabla 2 y Gráfico 2).

La distribución porcentual por sexo en individuos seroreactivos en el estado fue de 55% en mujeres y 45% en hombres ($p < 0.05$), en las jurisdicciones sanitarias de Tuxpan, Poza Rica, Orizaba y Coatzacoalcos; también se observan diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres (tabla 3 y gráfico 3).

En los seronegativos se presentaron diferencias entre el número de hombres y mujeres seronegativos en la mayoría de las jurisdicciones sanitarias y en la totalidad del estado en la que se observan mayor número de mujeres. (Tabla 4 y Gráfico 4).

La distribución porcentual de seropositivos por grupos de edad mostró una distribución semejante entre los grupos de edad de 5 -14 hasta el de 45 a 64 años, excepto en las jurisdicciones 4 y 5 donde no hubo individuos en el grupo de edad de 1-4 años (tabla 5, 6 y gráfico 5, 6).

Tabla 1

Distribución de seropositivos y seronegativos a *Trypanosoma cruzi*

Jurisdicción Sanitaria	Tamaño de muestra	Seroreactivos	Prevalencia % (IC95%)	Seronegativos n(%)
1 Pánuco	1272	31	2.4 (2.3 – 2.5)	1241 (97.6)
2 Tuxpan	1270	31	2.4 (2.3 – 2.5)	1239 (97.6)
3 Poza Rica	1182	11	0.9 (0.83 – 0.97)	1171 (98.4)
4 Mtz. de la Torre	1357	10	0.7 (0.63 – 0.77)	1347 (99.2)
5 Xalapa	1291	29	2.2 (2.1 – 2.3)	1262 (97.8)
6 Córdoba	1290	38	2.9 (2.8 – 3.0)	1252 (97.1)
7 Orizaba	1592	49	3.0 (2.9 – 3.1)	1543 (97.0)
8 Veracruz	1313	46	3.5 (3.4 – 3.6)	1267 (96.5)
9 Cosamaloapan	0	0	FE*	FE*
10 San Andrés Tuxtla	1282	19	1.5 (1.4 – 1.6)	1263 (98.5)
11 Coatzacoalcos	1445	63	4.3 (4.2 – 4.4)	1382 (95.7)
TOTAL	13294	327	2.4 (2.3 – 2.5)	129 (97.5)

*Fuera del estudio: Esta jurisdicción no se analizó estadísticamente debido a que sólo se recibieron 143 muestras de las 1271 solicitadas.

Gráfica 1
Seroprevalencia por Jurisdicción Sanitaria

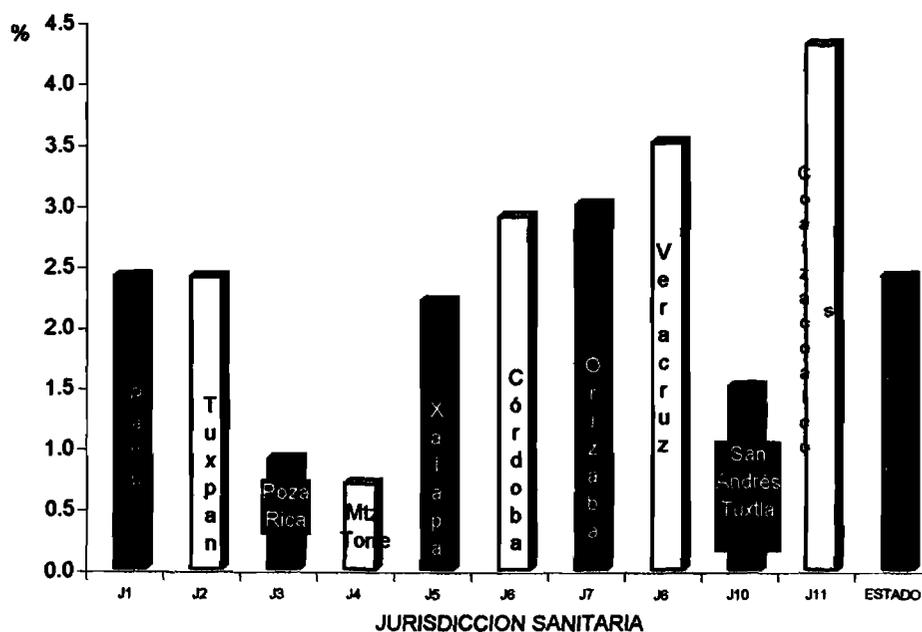


Tabla 2

Séroprevalencia a *T. cruzi* por Jurisdicción Sanitaria a tres diluciones.

Jurisdicción Sanitaria	1:16	1:32	1:64	Muestras reactivas n(%)	Tamaño de muestra
1 Pánuco	28	3	0	31 (2.4)	1272
2 Tuxpan	15	8	8	31 (2.4)	1270
3 Poza Rica	8	2	1	11(0.9)	1182
4 Mtz. de la Torre	2	6	2	10(0.7)	1357
5 Xalapa	26	3	0	29 (2.2)	1291
6 Córdoba	31	7	0	38 (2.9)	1290
7 Orizaba	44	5	0	49 (3.0)	1592
8 Veracruz	43	3	0	46 (3.5)	1313
9 Cosamaloapan	0	0	0	0	F E*
10 San Andrés Tuxtla	15	4	0	19 (1.5)	1282
11 Coatzacoalcos	39	18	6	63 (4.3)	1445
TOTAL	261	59	17	327 (2.4)	13,294

*Fuera del estudio: Esta jurisdicción no se analizó estadísticamente debido a que sólo se recibieron 143 muestras de las 1271 solicitadas.

Gráfica 2

Seroprevalencia a *T. cruzi* por Jurisdicción Sanitaria a tres diluciones.

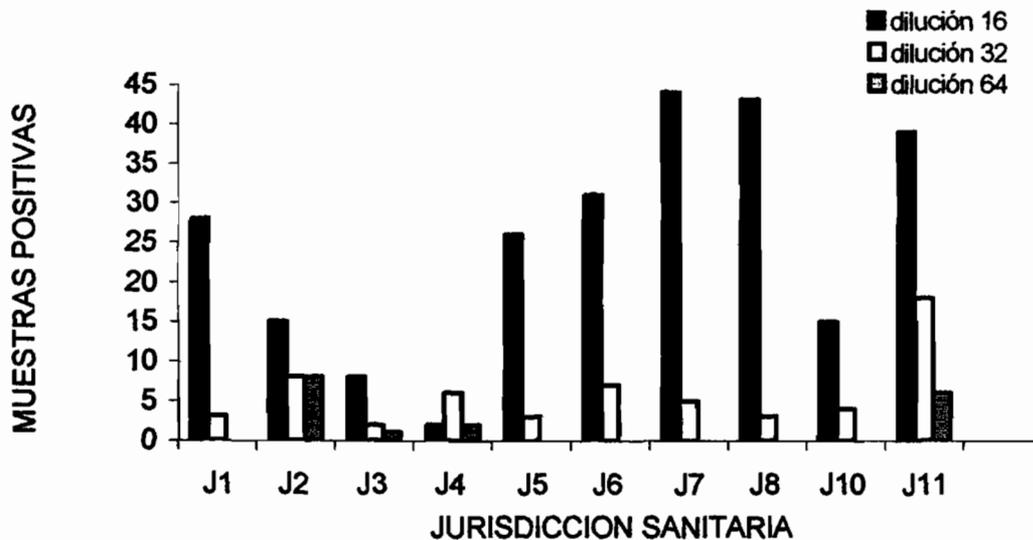


Tabla 3
Distribución porcentual por sexo en individuos seropositivos

Jurisdicción Sanitaria	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Total n	p
1 – Pánuco	19 (61)	12 (39)	31	0.204
2 - Tuxpan	10 (32)	21 (68)	31	0.0009
3 – Poza Rica	2 (18)	9 (82)	11	0.0028
4 – Martínez de la Torre	6 (60)	4 (40)	10	0.371
5 – Xalapa	14 (48)	15 (52)	29	0.792
6 – Córdoba	20 (53)	18 (47)	38	0.358
7 – Orizaba	16 (33)	33 (67)	49	0.001
8 – Veracruz	22 (48)	24 (52)	46	1.00
10- San Andrés Tuxtla	11 (58)	8 (42)	19	0.745
11- Coatzacoalcos	29 (46)	34 (54)	53	0.0326
Total	148 (45)	179(55)	327	0.0001

*p < 0.05

Gráfica 3
Distribución porcentual por sexo en individuos seropositivo

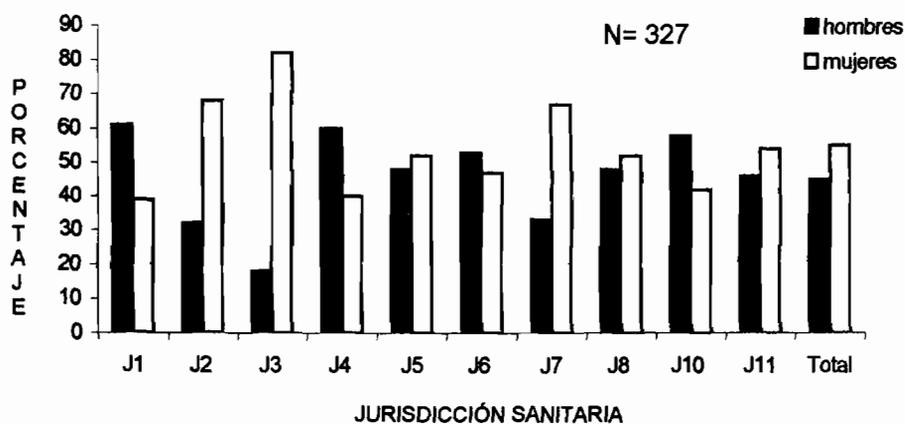


Tabla 4

Distribución porcentual por sexo en individuos seronegativos

Jurisdicción Sanitaria	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	Total n	p
1 – Pánuco	632 (51)	609 (49)	1241	0.4775
2 - Tuxpan	537 (43)	702 (57)	1239	0.0000
3 – Poza Rica	570 (49)	601 (51)	1171	0.4653
4 – Martínez de la Torre	710 (53)	637 (47)	1347	0.0273
5 – Xalapa	546 (43)	716 (57)	1262	0.0000
6 – Córdoba	583 (46)	669 (54)	1252	0.0047
7 – Orizaba	718 (46)	825 (54)	1543	0.0015
8 – Veracruz	575 (45)	692 (55)	1267	0.0003
10- San Andrés Tuxtla	571 (45)	692 (55)	1263	0.0003
11- Coatzacoalcos	636 (46)	746 (54)	1382	0.0032
Total	6078 (47)	6889 (53)	12,967	0.0000

*p < 0.05

Gráfica 4

Distribución porcentual por sexo en individuos seronegativos

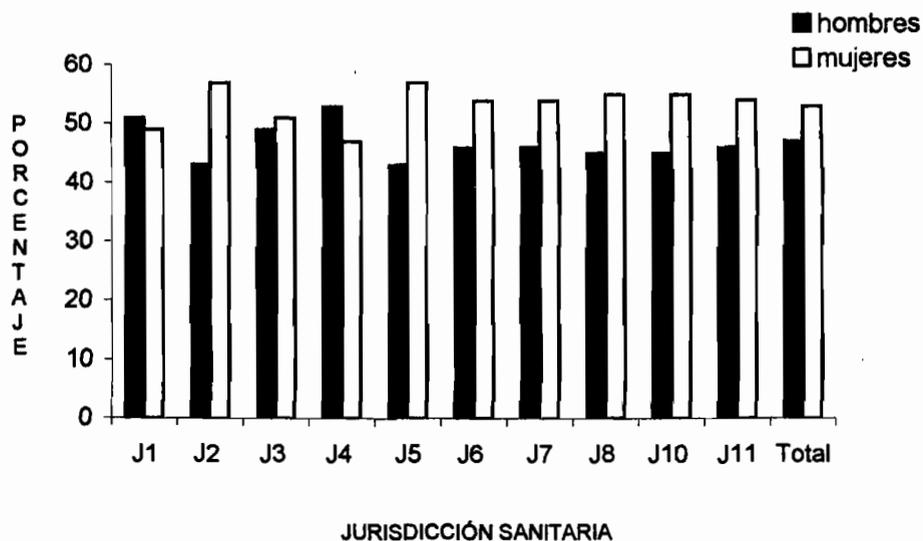


Tabla 5
Distribucion porcentual de seropositivos a HAI por grupos de edad
Jurisdicciones 1 - 5

	J-1 +/n	%	J-2 +/n	%	J-3 +/n	%	J-4 +/n	%	J-5 +/n	%
Gpo. etareo					*	*				
1-4	3/31	9.7	1/31	3.2			0/10	0	2/29	6.9
5 - 14	9/31	29.0	8/31	25.8			0/10	0	4/29	13.8
15 - 24	4/31	13.0	5/31	16.1			3/10	30.0	6/29	20.7
25 -34	2/31	6.4	4/31	13.0			3/10	30.0	4/29	13.8
35 - 44	1/31	3.2	2/31	6.4			1/10	10.0	4/29	13.8
45 -64	9/31	29.0	8/31	25.8			2/10	20.0	7/29	24.1
65 - +	3/31	9.7	3/31	9.7			1/10	10.0	2/29	6.9
Total	31/31	100	31/31	100			10/10	100	29/29	100
	31/1272	2.4	31/1270	2.4			10/1357	0.7	29/1291	2.2

• no se obtuvo la información por no tener cuestionarios

Gráfica 5
Distribución porcentual de seropositivos a HAI por grupos de edad
Jurisdicciones 1 - 5

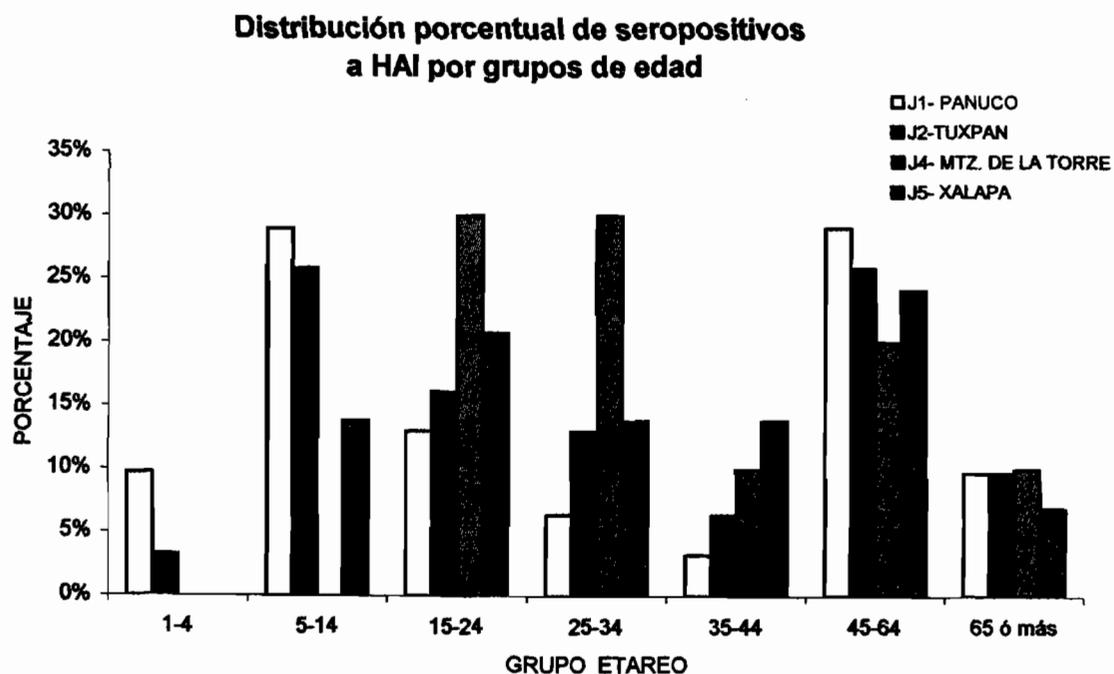
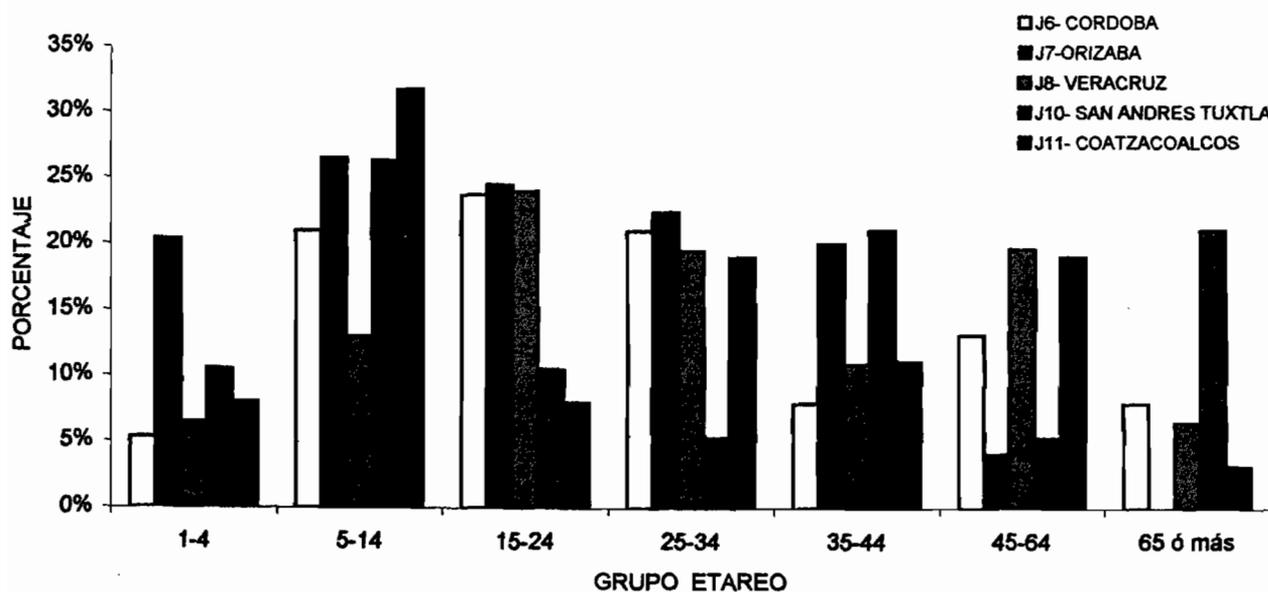


Tabla 6
Distribucion porcentual de seropositivos a HAI por grupos de edad
Jurisdicciones 6 - 11

	J-6	%	J-7	%	J-8	%	J-10	%	J-11	%
	+/n		+/n		+/n		+/n		+/n	
Gpo. etareo										
1-4	2/38	5.3	1/49	20.4	3/46	6.5	2/19	10.5	5/63	8
5 - 14	8/38	21.0	8/49	26.5	6/46	13.0	5/19	26.3	2/63	31.7
15 - 24	4/38	23.7	5/49	24.5	11/46	24.0	2/19	10.5	5/63	8
25 -34	2/38	21.0	4/49	22.4	9/46	19.5	1/19	5.3	12/63	19
35 - 44	1/38	7.9	2/49	20.0	5/46	10.9	4/19	21	7/63	11.1
45 -64	9/38	13.1	8/49	4.1	9/46	19.6	1/19	5.3	12/63	19
65 - +	3/38	7.9	3/49	0	3/46	6.5	4/19	21	2/63	3.2
Total	31/38	100	49/49	100	46/46	100	19/19	100	63/63	100
	38/1290	2.9	49/1592	3.0	46/1313	3.5	19/1282	1.5	63/1445	4.3

NOTA: La jurisdicción 9 esta fuera del estudio por falta de muestras

Gráfica 6
Distribucion porcentual de seropositivos a HAI por grupos de edad
Jurisdicciones 6 - 11



La adaptación y expansión de los parásitos, fue a los dos meses, obteniendo una masa parasitaria de 4 gramos en un volumen de 8 litros de medio de cultivo monofásico, con un rendimiento de 85 ml de antígeno crudo.

Caracterización inmunoquímica del extracto antigénico.

Como se observa en la tabla 7, la relación proteínas/carbohidratos fue de 78/22%.

Tabla 7 Relación de proteínas y carbohidratos totales.

Proteínas mg/ml	Carbohidratos mg/ml	Proteínas %	Carbohidratos %
2.71	0.77	78	22

En la separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE), al realizar el análisis electroforético en gel al 10% se aprecian 14 componentes con pesos moleculares entre 32 y 92 kDa. (32, 33; 37, 39, 42, 44, 47, 54, 58, 60, 64, 72, 85 y 92) siendo los de mayor relevancia los de 72, 48 y 42 kDa. según se aprecia en la figura 13.

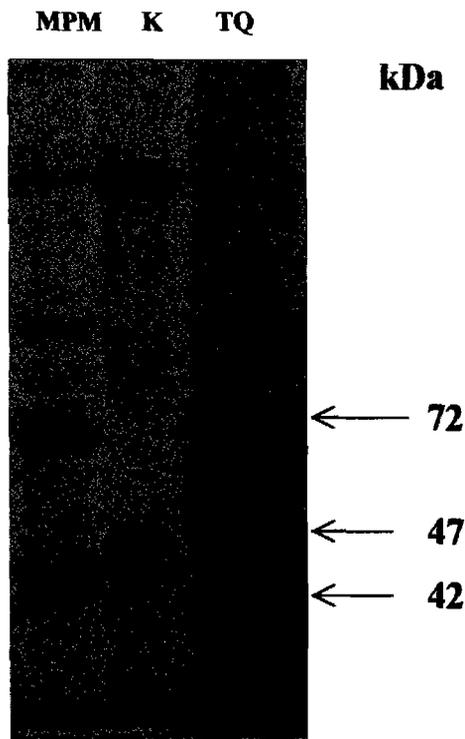


Figura 13

SDS-PAGE del extracto antigénico de *T. cruzi* al 10%

La electroforética se realizó en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) a 100 volts durante 140 min. Se colocaron entre 20 y 40 μg de proteína por carril en un gel de poliacrilamida al 10%, el cual fue teñido con azul de Coomassie. MPM: Marcadores de peso molecular (Gibco), K MPM: (kaleidoscopio, Bio-Rad), ambos de rango amplio.

K = kaleidoscopio (marcador de peso molecular preteñido)

TQ= Extracto antigénico (Tequesquitengo)

kDa = kilodaltons

En la separación de componentes proteicos y determinación de pesos moleculares por electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE), al realizar la electroforesis en gel al 12.5% se aprecian patrones de corrimiento de 18 componentes con pesos moleculares entre 25 y 110 kDa (110, 92, 85, 72, 68, 64, 60, 54, 48, 45, 42, 39, 36, 33, 32, 30, 28 y 26 25 kDa; los de mayor relevancia fueron 72, 42, 32, 28 y 25 kDa. según se aprecia en la figura 14.

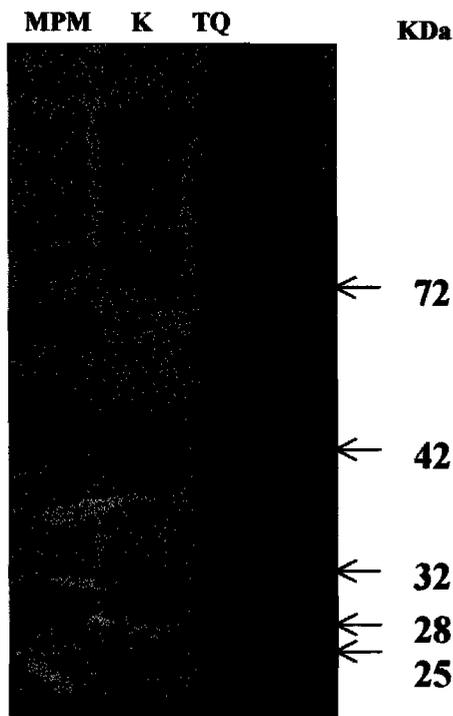


Figura 14

SDS-PAGE del extracto antigénico de *T. cruzi* al 12.5%.

La electroforesis se realizó en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) a 100 volts durante 2 horas . Se colocaron entre 23 y 47 μ g de proteína de cada muestra por carril. Se utilizó un gel de poliacrilamida al 12.5% el cual fue teñido con azul de Coomassie. MPM: Marcadores de peso molecular (Gibco), K MPM: (kaleidoscopio, Bio-Rad), ambos de rango amplio.

K = kaleidoscopio (marcador de peso molecular preteñido)

TQ= Extracto antigénico (Tequesquitengo)

kDa = kilodaltons

En la electroinmunotransferencia de los componentes del extracto antigénico con sueros testigo (Western-blot): Se evaluó la reactividad inmunológica con sueros humanos reactivos a *T. cruzi*, *L. mexicana* y normales, se aprecia que los sueros reactivos a *T. cruzi* mostraron un patrón de reconocimiento de 16 componentes con pesos moleculares entre 16 y 210 kDa y los reactivos a *L. mexicana*, 7 componentes con pesos moleculares entre 26 y 72 kDa, según se observap en la figura 15.

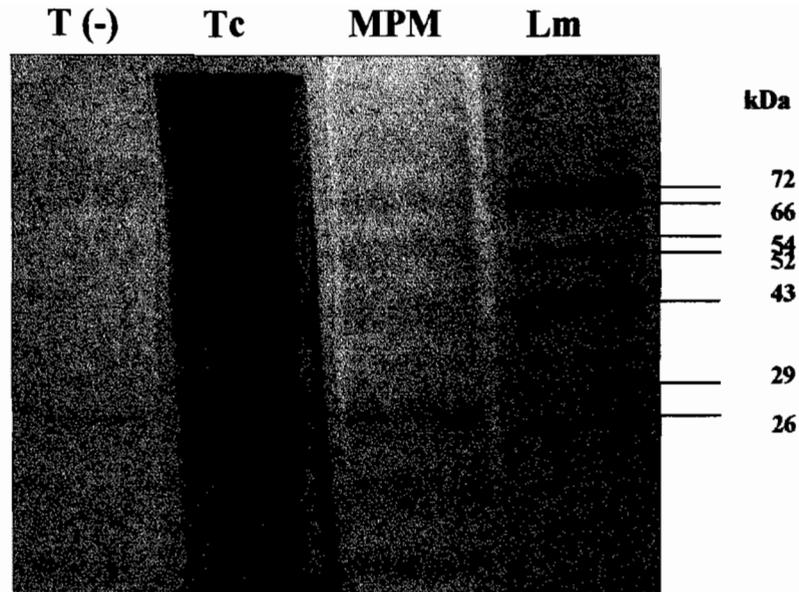


Figura 15

Electroinmunotransferencia del extracto antigénico

con sueros humanos reactivos a *T. cruzi*, *L. mexicana* y normales

Las proteínas fueron transferidas a una matriz de nitrocelulosa con poro de 0.45 μm (Bio-Rad) en un equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer (Bio-Rad) a 12 volts durante 22 min. Los sueros se emplearon en dilución 1:70 y el conjugado (Zymed) en dilución 1:5000. El sustrato empleado fue 3,3 diaminobenzidina con H_2O_2 al 30%.

T (-) = testigo negativo (sueros normales)

Tc = testigo positivo (sueros de *T. cruzi*)

MPM = marcador de peso molecular

Lm = sueros de *Leishmania mexicana*

La validación del antígeno mostró una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90%.

		Antígeno Argentino	
		(+)	(-)
Antígeno Mexicano	(+)	Verdaderos Positivos 10	Falsos positivos 1
	(-)	Falsos negativos 0	verdaderos negativos 9

El valor predictivo positivo (VPP) fue de 90.9% y el valor predictivo negativo (VPN) de 100%.

El título de corte se estableció en la dilución 1:16.

Al realizarse las pruebas intraensayo e interensayo con los dos lotes de antígeno se presentaron variaciones de un título de dilución arriba o abajo, o bien se mantenía el mismo título como se observa en las tablas 8-11, excepto en el caso de la prueba intraensayo del lote 1 (tabla 8) con los sueros 12 y 14 los días 9,12 y 15 respectivamente.

Tabla 8 Prueba intraensayo Ag-TQ-1 (lote1)

Día → Suero ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S-12	1:128	1:128	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:128	1:64	1:32	1:128	1:128	1:128
S-14	1:64	1:64	1:128	1:64	1:64	1:64	1:64	1:128	1:32	1:64	1:64	1:32	1:64	1:64	1:32
S-20	1:32	1:32	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	1:32	1:32	1:64

Tabla 9 Prueba interensayo Ag-TQ-1 (lote 1)

Día → suero ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S-12	1:256	1:256	1:128	1:256	1:256	1:256	1:256	1:128	1:128	1:256	1:128	1:256	1:128	1:256	1:256
S-14	1:512	1:512	1:512	1:256	1:256	1:256	1:512	1:512	1:512	1:512	1:256	1:512	1:256	1:512	1:512
S-20	1:64	1:64	1:64	1:32	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:32	1:32	1:64	1:32	1:64

Tabla 10 Prueba intraensayo Ag-TQ-2 (lote 2)

Día → suero ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S-12	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64	1:64
S-14	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:512	1:512	1:1024	1:512	1:1024	1:512	1:1024	1:512	1:1024	1:512
S-20	1:64	1:32	1:64	1:32	1:32	1:64	1:32	1:64	1:64	1:64	1:32	1:32	1:32	1:32	1:64

Tabla 11 Prueba interensayo Ag-TQ-2 (lote 2)

día → suero ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S-12	1:256	1:128	1:128	1:256	1:256	1:256	1:128	1:128	1:128	1:256	1:256	1:256	1:128	1:128	1:256
S-14	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:1024	1:1024	1:512	1:1024	1:1024	1:512
S-20	1:64	1:64	1:32	1:32	1:64	1:64	1:32	1:32	1:32	1:64	1:64	1:32	1:64	1:64	1:64

En el análisis intraensayo de los lotes de antígeno 1 y 2 con la prueba estadística de proporciones χ^2 , los resultados obtenidos muestran que en el lote 1 en el suero 12 y 14 hay diferencias estadísticamente significativas y con el lote 2 no hay diferencias como se observa en los siguientes resultados:

Intraensayo Ag TQ-1

Suero 12

1:32 1/15 = 0.07 x 100 = 7%
 1:64 8/15 = 0.53 x 100 = 53%
 $\chi^2 = 5.71$
 p 0.01

1:64 8/15 = 0.53 x 100 = 53%
 1:128 6/15 = 0.4 x 100 = 40%
 $\chi^2 = 0.54$
 p 0.46

1:32 1/15 = 0.07 x 100 = 70%
 1:128 6/15 = 0.4 x 100 = 40%
 $\chi^2 = 0.2.28$
 p 0.84

Suero 14

1:32 3/15 = 0.02 x 100 = 20%
 1:64 10/15 = 0.67 x 100 = 67%
 $\chi^2 = 6.65$
 p 0.009

1:64 10/15 = 0.67 x 100 = 67%
 1:128 2/15 = 0.13 x 100 = 13%
 $\chi^2 = 8.89$
 p 0.002

1:32 3/15 = 0.02 x 100 = 20%
 1:128 2/15 = 0.13 x 100 = 13%
 $\chi^2 = 0$
 p 1.0

Suero 20

1:32 5/15 = 0.33 x 100 = 33%
 1:64 10/15 = 0.67 x 100 = 67%
 $\chi^2 = 3.33$
 p 0.067

Intraensayo Ag TQ-2

Suero 12

1:64 15/15 100 %

Suero 14

1:512 6/15 = 0.4 x 100 = 40%
 1:1024 9/15 = 0.6 x 100 = 60%
 $\chi^2 = 1.2$
 p 0.27

Suero 20

1:32 8/15 = 0.53 x 100 = 53%
 1:64 7/15 = 0.47 x 100 = 47%
 $\chi^2 = 0.13$
 p 0.715

En el análisis interensayo de los lotes de antígeno 1 y 2 con la prueba estadística de proporciones χ^2 , los resultados obtenidos muestran que en el lote 1 en el suero 20 hay diferencia estadísticamente significativa y en el lote 2 no hay diferencias como se observa a continuación:

Interensayo Ag TQ-1

Suero 12

1:128 5/15 = 0.33 x 100 = 33%
 1:256 10/15 = 0.67 x 100 = 67%
 $\chi^2 = 3.33$
 p 0.07

Suero 14

1:256 5/15 = 0.33 x 100 = 33%
 1:512 10/15 = 0.67 x 100 = 67%
 $\chi^2 = 0.33$
 p 0.067

Suero 20

1:32 4/15 = 0.26 x 100 = 26%
 1:64 11/15 = 0.74 x 100 = 74%
 $\chi^2 = 6.53$
 p 0.01

Interensayo Ag TQ-2

Suero 12

1:128 8/15 = 0.54 x 100 = 54 %
 1:256 7/15 = 0.46 x 100 = 46%
 $\chi^2 = 0.13$
 p 0.71

Suero 14

1:512 9/15 = 0.6 x 100 = 60%
 1:1024 6/15 = 0.4 x 100 = 40%
 $\chi^2 = 1.2$
 p 0.27

Suero 20

1:32 6/15 = 0.4 x 100 = 53%
 1:32 6/15 = 0.4 x 100 = 40%
 1:64 9/15 = 0.6 x 100 = 60%
 $\chi^2 = 1.2$
 p 0.27

Al realizarse las pruebas intraensayo e interensayo con los análisis estadísticos desviación estándar y coeficiente de variación se obtuvieron resultados semejantes a lo observado anteriormente; es decir que hay variaciones entre los dos lotes de antígeno. Por lo anterior se puede interpretar que la reproducibilidad de la prueba es aceptable, tomando en cuenta que en trabajos serológicos realizados por otros grupos de trabajo, no se han hecho este tipo de ensayos intra e interensayo; sólo reportan pruebas de kappa para observar concordancia entre resultados de eluidos y sueros.

Intraensayo Ag TQ-1

Suero 12

$$X = 87.47$$

$$s = 35.19$$

$$CV = 40.2$$

Suero 14

$$X = 66.13$$

$$s = 28.28$$

$$CV = 42.7$$

Suero 20

$$X = 53.33$$

$$s = 15.61$$

$$CV = 29.2$$

Intraensayo Ag TQ-2

Suero 12

$$X = 64$$

$$s = 0$$

$$CV = 0$$

Suero 14

$$X = 682.67$$

$$s = 249.83$$

$$CV = 36.5$$

Suero 20

$$X = 46.93$$

$$s = 16.52$$

$$CV = 35.2$$

Interensayo Ag TQ-1

Suero 12

$X = 213.33$

$s = 62.46$

$CV = 29.2$

Interensayo Ag TQ-2

Suero 12

$X = 196.27$

$s = 66.10$

$CV = 33.6$

Suero 14

$X = 426.67$

$s = 124.92$

$CV = 29.2$

Suero 14

$X = 716.80$

$s = 259.63$

$CV = 36.2$

Suero 20

$X = 55.47$

$s = 14.65$

$CV = 26.4$

Suero 20

$X = 51.20$

$s = 16.23$

$CV = 31.6$

El análisis interensayo con la prueba estadística de concordancia kappa (k), se muestran a continuación, para interpretar los resultados de ésta se utilizó la clasificación según Landis-Koch¹⁴⁷:

1. Leve (0 – 0.20)
2. Regular (0.21 – 0.40)
3. Moderada (0.41 – 0.60)
4. Buena (0.62 – 0.80)
5. Muy buena (0.81 – 1.00)

De acuerdo a los siguientes resultados observamos una concordancia moderada en el suero 12 y leve en los sueros 14 y 20.

Suero 12

$k = 0.453$

Suero 14

$k = 0.129$

Suero 20

$k = 0.118$

9. DISCUSIÓN

Se llevo a cabo un estudio transversal observacional también llamado encuesta de prevalencia. El diseño de una encuesta transversal debe considerar aspectos relacionados con la población que se estudiará como los sujetos de quien se obtendrá información y la información que se busca captar. Las encuestas transversales se dirigen principalmente al estudio de la frecuencia y distribución de eventos de salud y enfermedad; evalúan los resultados como prevalencia global descartando la intervención del azar en los resultados mediante análisis comparativos como lo es la X^2 , cuyo valor se compara con un valor derivado de la curva normal como lo es el intervalo de confianza de 95% ^{148,149}.

Este tipo de estudios son de gran utilidad para estimar la prevalencia de la infección de *Trypanosoma cruzi* por lo que se diseñó el estudio en once jurisdicciones del estado de Veracruz, teniendo que la seroprevalencia obtenida en el estado con la prueba de hemaglutinación indirecta fue de 2.4%; en la interpretación de estos resultados, se debe considerar que el muestreo fue realizado en población abierta con un solo procedimiento diagnóstico. Por otra parte, Velasco, reporta una seroprevalencia para el estado de 3% con dos procedimientos diagnósticos¹⁸.

Aún cuando las muestras proceden del mismo estado, es importante señalar que en el presente estudio, la prevalencia más elevada la presentó la jurisdicción de Veracruz y la más baja la de Martínez de la Torre (tabla 1); se han descrito factores de riesgo asociados para adquirir la infección, como son la presencia del transmisor, las características de la vivienda, factores geográficos y climáticos. En el estado se observó gran variabilidad de éstos y probablemente estén influyendo en los resultados^{150,151}. Considerando uno de los factores más fuertemente asociados como es la presencia del transmisor, se encontró a *Triatoma dimidiata* en el peri e intradomicilio. En las jurisdicciones de Veracruz y Martínez de la Torre el índice de infestación fue de 4% y 3%, y el de infección natural fue de 7% y 0% respectivamente; lo que explica la prevalencia encontrada.

En el análisis comparativo (χ^2) de la distribución porcentual por sexo en individuos seropositivos, en la mayoría de las jurisdicciones no se observaron diferencias estadísticas significativas entre hombres y mujeres, ya que el número de individuos fue muy semejante, se observó que 55% correspondía a mujeres y 45% a hombres ($p < 0.05$). Las jurisdicciones sanitarias en las que se encontró mayor porcentaje de mujeres y con diferencias estadísticamente significativas fueron Tuxpan, Poza Rica, Orizaba y Coatzacoalcos. Se ha descrito que las mujeres se infectan más y el hombre se enferma más, esto se ha observado en condiciones experimentales con ratones, las hembras son más susceptibles a la infección y los machos al infectarse son más propensos a desarrollar la enfermedad^{152, 153}.

Respecto a los individuos seronegativos el mismo análisis reveló que no había diferencias estadísticas significativas en la mayoría de las jurisdicciones ya que como en el caso anterior el tamaño de muestra fue muy semejante y también se observaron más mujeres que hombres.

La distribución porcentual de seropositivos por grupos de edad mostró una distribución semejante entre los grupos de edad de 5 –64 años, excepto en las jurisdicciones 4 y 5 donde no hubieron individuos en el grupo de 1-4 años (tabla 5, 6 y gráfico 5, 6). Lo anterior representa importancia ya que en la mayoría de las jurisdicciones se observa reactividad en niños y jóvenes, lo cual representa una gran importancia debido a que la presencia de individuos infectados menores de 18 años indica una transmisión activa de la infección, ya que significa que los individuos se continúan infectando, aún cuando existan o no estrategias de control en las poblaciones estudiadas.

La OPS/OMS define que la confirmación del diagnóstico serológico en la enfermedad de Chagas, requiere de 2 procedimientos de distinto principio; circunstancia que en casos de estudios de tamizaje sería inoperante al requerir mayor cantidad de recursos físicos, materiales y financieros. Debido a que en este tipo de estudios, los tamaños de muestra son generalmente grandes, la toma de muestras en papel filtro ha sido de gran utilidad, especialmente por ser de bajo costo y no requerir de personal calificado ni de redes frías para su transporte y conservación, como ha sido reportado por varios autores⁸³⁻⁹¹. Con los resultados del presente trabajo corroboramos la utilidad del

empleo de muestras sanguíneas obtenidas en papel filtro, ya que el número de muestras procesadas fue de 13,294.

Respecto a la extracción antigénica, ésta se realizó cuando el parásito se encontraba en fase de epimastigote, con lo cual se garantiza la presencia de antígenos específicos que aún cuando sean de fase, son compartidos con las formas presentes en el vertebrado y que con fines diagnósticos presentan buena reactividad, independientemente de la fase del parásito en que se generen, ya que *Trypanosoma cruzi* presenta diferencias antigénicas entre sus estadios, pero también presenta antígenos compartidos y ninguna de las fases los presenta inmunodominantes^{74,75,105,108}.

El análisis electroforético (SDS-PAGE) del extracto estudiado, muestra algunos componentes ya descritos por otros investigadores, algunos con fines diagnósticos y otros involucrados en aspectos de patogenicidad, virulencia o inmunoprofilaxis.

El análisis electroforético con el gel al 10%, mostró 14 componentes de naturaleza proteica siendo los más relevantes los de 72, 47 y 42 kDa.

El patrón electroforético del gel al 12.5%, mostró 18 componentes siendo los más relevantes los de 72, 42, 32, 28 y 25 kDa.

Al evaluar la reactividad de anticuerpos anti-*T. cruzi* y anti-*L. mexicana* por electroinmunotransferencia (Wb), el patrón de reconocimiento a *T. cruzi* mostró 16 componentes con pesos moleculares entre 16 y 210 kDa y un patrón de reconocimiento a *L. mexicana* de 7 componentes entre 26 y 72 kDa compartidos por ambos géneros y 9 exclusivos del género *T. cruzi*. Respecto a esto, los parámetros de sensibilidad y especificidad de extractos antigénicos crudos como es en este caso, son afectados por la presencia de estos componentes compartidos y exclusivos de género. Al respecto, existen estudios en donde se han comparado antígenos solubles extraídos de *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *T. dionisii*, *T. brucei*, *Leishmania donovani* y *L. mexicana* definidos por inmunoprecipitación e inmunolectroforesis en donde para el

caso del género *Leishmania* fueron compartidos 3 de los 10 y para *Trypanosoma cruzi* 4 de los 10 que fueron específicos en todos los géneros de los que solo uno mostró características específicas en cuanto a inmunogenicidad y antigenicidad ¹⁵⁴.

Rangel Aldao, describe un grupo de antígenos respecto a la inducción de anticuerpos en huéspedes inmunizados o infectados en contra de componentes de PM localizados entre los 75 y 150 kDa; en este estudio se aprecia un componente de 110 kDa presente en SDS-PAGE¹⁵⁵.

El componente de 92 kDa, de naturaleza glucoproteica, presente en el SDS-PAGE y con reconocimiento en Wb, probablemente corresponda a la proteína de 90 kDa descrita por otros investigadores; este componente, ha llamado la atención de varios investigadores^{110-112,120} con diversos fines: ha sido encontrado en las fases de amastigote, epimastigote y tripomastigote; ha sido referido como el principal antígeno detectado en sueros de pacientes en fase crónica y en otros estudios ha sido considerado como un buen candidato con fines inmunoprolácticos. No presenta reacción cruzada con *Leishmania* sp^{110-112,120}.

La proteína de 85 kDa, presente en SDS-PAGE, ha sido involucrada en la patogenia de la relación parásito-célula huésped, a la fecha continua siendo motivo de investigación por varios grupos de trabajo, especialmente por el papel que desempeña en el proceso de interiorización en células del vertebrado por la presencia de ácido siálico en su composición¹¹³.

La proteína de 72 kDa identificada en SDS-PAGE y por Wb con marcada relevancia, ha sido descrita en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos. Está presente en sueros de pacientes en las fases aguda y crónica de la enfermedad. Algunos estudios de esta molécula han demostrado que es el receptor de factor C3 de la vía alterna del complemento involucrado así, en la lisis de epimastigotes por sueros normales de mamíferos^{77,120-123,126}.

Respecto al componente de 58 kDa presente en SDS-PAGE, Fischer en sus trabajos relacionados con la interacción parásito-célula huésped, implica una glucoproteína de superficie de 58/68 kDa en sus formas no reducida/reducida purificada de tripomastigotes de cultivos que inhibe específicamente la unión celular con la C3 convertasa de la vía alterna del complemento humano¹²¹.

En este trabajo, en SDS-PAGE se describe un grupo de antígenos de 47,44 y 42 kDa los cuales habían sido descritos previamente en nuestro laboratorio¹⁵⁶.

Ferguson en 1985 realiza una extracción con fenol a partir de epimastigotes y obtiene un complejo de 3 glucoproteínas de 24, 31 y 37 kDa, el cual se encuentra presente en sueros de animales infectados y no se encuentra presente en los tripomastigotes sanguíneos. Realiza el análisis de la composición de los mismos y refiere el 56% de carbohidratos respecto a proteínas¹²¹. En el presente trabajo se encontró este componente de 37 kDa en SDS-PAGE.

Existe un grupo de proteínas de 21 a 31 kDa identificadas por Wb, específicas para *T. cruzi*. En el presente estudio, en el patrón electroforético, fue definido dentro de este complejo el componente de 25 kDa y en Wb los de 21, 24, 26, 29 y 31 kDa. Esta proteína de 25 kDa se encuentra presente en todas las fases del parásito, es reconocida por sueros de pacientes sintomáticos y asintomáticos, presenta buena reactividad en sueros reactivos de diferentes áreas geográficas y además no presenta cruce con *Leishmania*, por lo cual, ha sido propuesta como un anticuerpo monoclonal con fines de diagnóstico diferencial para su empleo en regiones donde las leishmaniasis son coendémicas con la enfermedad de Chagas^{121,124}.

Existe un grupo de antígenos entre 130 y 200 kDa que han sido descritos como útiles para el diagnóstico en las fases aguda y congénita de la enfermedad¹⁵⁷.

Llama la atención el hecho de haber encontrado en Wb una proteína con peso molecular de 210 kDa; al respecto en un trabajo previo de nuestro laboratorio ha sido identificado un compuesto de 212 kDa¹⁵⁶; Este resultado puede ser atribuido a que componentes mayores a 150 kDa han sido poco estudiados en *T. cruzi* ya que no han sido importantes para el diagnóstico en sueros humanos.

El extracto antigénico TQ, en la prueba de hemaglutinación indirecta, no presentó reacción cruzada con sueros con anticuerpos anti *L. mexicana*. Esta circunstancia, tiene especial importancia diagnóstica debido a la existencia de áreas geográficas coendémicas para ambas infecciones en nuestro país.

Los cálculos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo señalan claramente la posibilidad de que se presente un 10% de individuos con resultados falsos positivos, circunstancia por demás esperada en toda prueba estandarizada con fines de tamizaje, en donde se requiere disminuir la probabilidad de perder a todo individuo reactor aun con el riesgo de incrementar el porcentaje de falsos positivos (especificidad). La existencia de falsos positivos en estos procedimientos se ha visto en casos de enfermedades generalmente infecciosas que generan anticuerpos afines como es el caso del género *Leishmania* y otros tripanosomátidos así como en procesos autoinmunes y es por esta razón que normativamente en esta enfermedad, después de realizar el tamizaje inicial, la confirmación deberá hacerse con 2 pruebas de diferente principio y con suero obtenido por punción venosa.

El análisis estadístico para la evaluación de antígenos y procedimientos, muestra que la prueba de hemaglutinación indirecta realizada con eluidos séricos empleada en este estudio satisface los objetivos inicialmente planteados del presente trabajo; especialmente relacionados con la factibilidad de estos procedimientos para realizarse en campo y en grandes volúmenes de muestras. Aún cuando la reproducibilidad de la prueba se ve afectada, según los análisis estadísticos, esto puede deberse, no sólo a la vida media del reactivo antigénico, sino también al procedimiento en si de la técnica. Actualmente, respecto a lo anterior, se están llevando a cabo estudios para determinar tanto estabilidad y reproducibilidad de la técnica y procedimiento.

El análisis estadístico con X^2 y kappa realizado para evaluar la calidad de la prueba y del procedimiento de hemaglutinación indirecta, (análisis intra e interensayo) dio como resultado que el lote del antígeno AgTQ-1 con más de un año de conservación mostró diferencias estadísticas significativas, a diferencia del antígeno AgTQ-2 (de reciente

preparación) que no presentó éstas diferencias, lo anterior se explica por un detrimento en la reactividad antigénica, debido a que los antígenos, por su naturaleza proteica, pierden reactividad con el tiempo, debido a la presencia de enzimas proteolíticas (proteasas). Como resultado de las evaluaciones intraensayo e interensayo y análisis estadístico de los mismos, se concluye que la vida de anaquel del reactivo antigénico, es de un año.

Existen pruebas serológicas no convencionales que no han sido sometidas aún a suficientes validaciones, algunas se encuentran disponibles comercialmente y otras se realizan exclusivamente en universidades y centros de investigación; al respecto, la OPS/OMS es muy clara, según se muestra en el cuadro 1, donde se plantea la factibilidad de emplear otros procedimientos diagnósticos como es el caso de la PCR y de los antígenos recombinantes en la detección de casos de transmisión connatal o para evaluación clínica de pacientes tratados^{158,159}.

En México, existen reactivos comerciales para realizar el diagnóstico serológico en laboratorios de diagnóstico clínico y bancos de sangre, pero son de alto costo para su empleo masivo por lo que el tamizaje obligatorio en Bancos de Sangre, aun cuando esté contemplado normativamente por la SSA^{160,161}, operativamente no es de observancia obligatoria, por lo que es necesario realizar el diagnóstico con técnicas y procedimientos eficaces, confiables, factibles, rápidos y de bajo costo como es el que se presenta en este trabajo.

10. CONCLUSIONES

- La prueba de Hemaglutinación indirecta sigue siendo un procedimiento útil para realizar tamizaje serológico en estudios epidemiológicos masivos de la enfermedad de Chagas.
- La toma de muestra sanguínea en papel filtro es una herramienta útil en la prueba de Hemaglutinación indirecta y en trabajos epidemiológicos con gran número de muestras.
- El reactivo antigénico de esta prueba, no presenta reacción cruzada con *Leishmania mexicana*.
- El extracto antigénico TQ, muestra buena sensibilidad y especificidad, por lo que se propone como un candidato para su empleo en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*.
- Se mejora la reactividad al utilizar antígenos extraídos de cepas regionales.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1- Chagas C. 1909. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159-218.
- 2- Schofield CJ. 2000. Challenges of Chagas disease vector control in Central America. WHO/WHOPES. 36pp.
- 3- Dias JCP, Schofield CJ. 1999. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 years since Carlos Chagas Discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 94 suppl.1:103-121
- 4- Hoffman C.C. 1928. Nota acerca de un probable transmisor de la trypanosomiasis humana en el estado de Veracruz. Rev Mex Biol 8:12-18.
- 5- Mazzotti L. 1936. Investigación sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en el país. Demostración de los tripanosomas en los reduvidos transmisores. Medicina Mex. 282(16):584-585.
- 6- Mazzotti L. 1940. Dos Casos de Enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca. Gac Med México 70(4):417-420.
- 7- Brumpt E, Mazzotti L, Brumpt LC. 1939. Enquetes Epidémiologiques sur la Maladie de C. Chagas au Mexique(1). Réduvidés Vecteurs. Animaux réservoirs de virus. Cas humains. Ann Parasitol 17(4):299-312.
- 8- Perrín T.G, Díaz E, Brenes M. 1974. Nota previa sobre primeiras comprovacoes sorológicas da doença de Chagas no México. Mem Oswaldo Cruz. 45(2):395-400.
- 9- Biagi, F. Y Arce G. 1965. Los dos primeros casos de miocardiopatía chagásica comprobados en México. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 35(5):611-623.
- 10- Tellaeche, L.A. 1976. Boletín informativo. Dirección General de Investigación en Salud Pública. (Mex). 5:29-40.
- 11- Salazar Schettino PM, Castrejón J, Rodríguez HM, Tay J. 1979. Miocarditis chagásica crónica en México. Tercer caso comprobado por exámenes parasitológicos. Prensa Med. Mex. 44(5-6):115-120.
- 12- Salazar Schettino PM, Tay J, Bucio MI, Haro I de, Anzures ME, Flores-Ayala S. 1984. Primer Caso de Megaesófago con Serología positiva a *Trypanosoma cruzi*. Sal. Pub. Mex. 26(5):452-455.

- 13- Tay J, Salazar Schettino PM, Ontiveros A, Jiménez J Haro I de, García YY, Quiroz M. 1986. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en una población de Oaxaca, México. Bol. Of. Sanit. Panam. 102(4):325-332.
- 14- Salazar-Schettino PM, Barrera M, Bucio MI. 1989. Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por Transfusión Sanguínea, Primer Caso Humano en México. Rev. Mex. Patol. Clin. 36(3-4):57-59.
- 15- Guzmán BC, LaHuerta S, Velasco CO. 1998. Chagas Disease. First Congenital case report. Archives of Medical Reseach. 29(2):195-196.
- 16- Tay J, Salazar-Schettino PM, Bucio MI, Zárate R, Zárate L. 1980. La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal. Pub. Mex. 12(4):409-450.
- 17- Salazar Schettino PM, Haro I de, Jiménez J, García E. 1983. Dos Nuevas Localizaciones de Transmisores de Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Sal. Pub. Mex. 25(1):77-82.
- 18- Velasco CO, Valdespino JL, Tapia Conyer R, Salvatierra B, Guzmán BC, Magos C, Llausas A, Gutiérrez G, Sepúlveda J. 1992. Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. Sal. Pub. Mex. 34(2):186-196.
- 19- Carcavallo RU, Galindez GI, Turbera J, Lent H. 1997. Bibliographic checklist of the American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). In Carcavallo RU y col. Atlas of Chagas disease vectors in America vol.1. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro Brazil pp 15-52.
- 20- Tay J, Schenone H, Sánchez JT, Robert L. 1992. Estado actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Bol. Chil. Parasitol. 47:43-53.
- 21- Salazar Schettino PM De Haro I, Uribarren T. 1988. Chagas disease in Mexico. Parasitology today. 4(12):348-52.
- 22- Salazar Schettino PM, Bucio MI, Cabrera M, Bautista J. 1997. First case of natural infection in pigs. Review of *Trypanosoma cruzi* reservoirs in Mexico. Mem Inst Osvaldo Cruz 92(4):499-502.
- 23- Cura E., Wendel S. 1994. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Washington D.C. USA.: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina

- Regional de la Organización Mundial de la Salud. PAHO/HCT. 61 pp.
- 24- Cura E. De Tito E, Segura EL. 1994. Control de calidad inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Manual de procedimientos. Instituto Nacional de Chagas "Dr. Mario Fatała Chabén". Centro Nacional de Referencia y Centro colaborador de OMS/OPS. Buenos Aires. Argentina. 43pp.
 - 25- Memorias del Taller Internacional de Epidemiología, Diagnóstico y Control de la Enfermedad de Chagas. 2002. UNAM, SSA, OPS/OMS-México. 48pp.
 - 26- Chuit R, Subías E, Perez A, Paulone I. Wisnivesky-Colli C and Segura EL. 1989. Usefulness of serology for the evaluation of transmission in endemic areas of Chagas' disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22:119-124.
 - 27- Report of a World Health Organization Expert Committee. 1991. In: Control of Chagas'disease. World Health Organization (editor) Technical Report Series N° 811 pp1-95.
 - 28- Cevallos A, Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana. 2003.
Biblioweb.dgesca.unam,mx/libros/microbios...5/capitulo.html
 - 29- Levine ND, Corlis JO, Dereux FEG, Grain J, Honingerg BM, Leedale GF, Leoblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page EC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J and Wallace FG. 1989. A new revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 27(1):1-37-58.
 - 30- Haro I, Salazar SPM y Cabrera M. 1995. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 2° edición. Mendez Editores. México. 289pp.
 - 31- Tay J.y col. 1980. Evolución del *Trypanosoma cruzi* cepa mexicana en el huésped vertebrado, invertebrado e in vitro. *Salud Pública de México*. 22(5):513-520.
 - 32- Hoare CA. Wallace FG. 1966. Developmental stage of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*. 212:1385-9.
 - 33- Souza W. 1984. Cell Biology of *T. cruzi*. *International Review of Cytology*. 86:197-283.
 - 34- Von Brand T. 1966. Biochemistry of parasites. Academic Press. New York and London. 429pp

- 35- Enfermedad de Chagas y otras parasitosis. 1996. Manual de Laboratorio. Instituto Nacional de Chagas Dr. Mario Fatala Chabén. Buenos Aires Argentina. 103pp.
- 36- Prata A.M. 1994. Chagas' disease. Infectious Disease clinics of North America. 8(1):61-76.
- 37- Atias A.1999. Parasitología Medica. Ed. Mediterráneo. Santiago de Chile. pp 251-264.
- 38- Ojeda-Luna, M. Murguía P. 1998. Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Gaceta Médica de México.134(6):757-759.
- 39- Pays , JF. 1998. La trypanosomose humaine americaine 90 ans apres sa decouverte par Carlos Chagas. I. Epidemiologie et controle. Mèdecine Tropicale. 58(4):391-402.
- 40- Salazar Schettino PM, Tay J, Ontiveros A, Jiménez Haro I de, Bucio TMI, Ruiz HAL. 1983. Enfermedad de Chagas en México. Rev Fac Med. 26(1):11-51.
- 41- Cerisola JA, Rabinovich A, Alvarez M di Corletto CH, Pruneda J. 1972. Enfermedad de Chagas y la Transfusión de Sangre. Bol Of Sanit Panam 73:203-221.
- 42- Pellegrini J. O 1949. Perigo de Transmissao da Doença de Chagas pela Transfusao de Sangue. Primeiras Comprovações Sorologicas de esquizotripanose em Doadores e em Candidatos a Doadores de Sangue. Brasil Med 63:63-68.
- 43- Ramos-Echevarria A, Monteón-Padilla V, Reyes-López P. 1993 Detección de Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Donadores de Sangre. Sal .Pub. Mex. 35(1):56-64.
- 44- Goldsmith RS, Zárate R, Kagan I, Cedeño-Ferreira J, Galindo-Vasconcelos M, Antonio Paz E. 1978. El Potencial de la Transmisión en la Enfermedad de Chagas por Transfusión Sanguínea: Hallazgos Serológicos entre Donadores en el Estado de Oaxaca. Sal. Pub. Mex. 20(4):439-44.
- 45- Moncayo, A. 1999. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas disease. World Health Organization, TDR,CH-1211. Geneva. 27, Switzerland. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(supl 1) :401-404.

- 46- Rangel Hilda. 1998. Detection of antibodies against *trypanosoma cruzi* in donors from a blood bank in Cuernavaca, Morelos, Mexico. Arch.Med. Res. 29 (1): 79-82.
- 47- Figueiredo JF, Martinez R, da Costa JC, Moyses Neto M, Suaid HJ, Ferraz AS. 1990. Transmission of Chagas Disease through Renal Transplantation: Report of a Case. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 84:61-62.
- 48- Aulet F, Riarte A, Pattin M, Segura EL, Vazquez M. 1991 Chagas Disease and kidney Transplantation. Transplant Proc 23(5):2653.
- 49- Lopez Blanco OA, Cavalli NH, Jasovich A, Gotlieb D, Gonzalez-Cappa S. 1992. Chagas'Disease and Kidney Transplantation Follow-up of nine Patients for 11 Years Transplant Proc 24(6):3089-3090.
- 50- Amato Neto V, Matsubara L, Uip DE, Strabelli TM, Bocchi EA, Stolf NA, Jatene AD. 1992. Heart Transplantation: Donor with Chagas' Disease and Clinical Course of the Receptor. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo 47:92-94.
- 51- De Faria JB, Alves G. 1993. Transmission of Chagas' Disease through Cadaveric Renal Transplantation. Transplantation 56(3):746-747.
- 52- Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra R, Schiavelli R, De Rissio A, Maiolo E, García MM, Jacob N, Pattin M, Lauricella M, Segura EL, Vázquez M. 1999. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience, 1989-1996. Clinical Infectious Diseases. 29:561-567.
- 53- Schenone H Y Rojas A. 1989. Algunos datos y observaciones pragmáticas en relación a la epidemiología de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 44:66-86.
- 54- Lorca M, Thiermann E. 1991. Diagnóstico Serológico de las Infecciones Congénitas por *Trypanosoma cruzi*. Rev Chil Pediatr 62(6):337-344.
- 55- Fretes ER, de Fabro SP. 1995. Placenta humana chagásica: alteración estructural y citoquímica de vasos sanguíneos. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba, Argentina. 53(1):11-15.
- 56- Guzmán BC, García GL, Floriani VJ. 1998. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. Revista Panamericana de la Salud. 4(2):94-99.

- 57- Miles MA. 1972. *Trypanosoma cruzi* - Milk Transmission of Infection and Immunity from Mother to Young. *Parasitology* 65:1-9.
- 58- Segura EL, Vazquez C, Bronzina A, Campos JM, Cerisola J, Gonzalez-Cappa SM. 1977. Antigens of the Subcellular Fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and Membrane Fraction. *J Protozool* 24(4):540-543.
- 59- Tachibana H, Nagakura K, Kaneda Y. 1988. Serodiagnosis of Chagas' Disease using Monoclonal Antibody against *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25,000 Antigen. *Parasitol Res.* 74:409-414.
- 60- Wendel S, Gonzaga AL. 1993. Chagas Disease and Blood transfusion:A new world problem?. *Vox Sang.* 64:1-12.
- 61- Salazar Schettino PM. 1983. Customs which Predispose to Chagas' Disease and Cysticercosis in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 32(5):1179-1180.
- 62- Wendel S, Brener Z, Camargo ME. 1992. Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil. Sao Paulo. Brazil. Cap.4. Immune response and immunopathology in *Trypanosoma cruzi* infection. 3pp 1-47.
- 63- Brener Z, Andrade Z. 1979. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro Brasil:Gaunabara Koogan SA. 473pp.
- 64- Tafuri, W.L. 1987. Patogenia da doença de Chagas. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*29:194-99.
- 65- Köberle, F. 1968. Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The pathology of American Trypanosomiasis. *Advances in Parasitology.* 6:63-116.
- 66- Oberti C, Atías A, Strozzi L. 1966. Aspectos Neurohistológicos de los Plexos Ganglionares del Megacolon Chagásico. I. Estudio Histopatológico. *Biologica* 38:46-57.
- 67- Andrade S, Andrade Z. 1966. Doença de Chagas e Alterações Neurais no Plexo de Auerbach. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8(5):219-224.
- 68- Tafuri, WL, Maria TA, Lopez ER. 1971. Lesões do plexo Mientérico do esofago, do jejuno e do colo de chagasicos crônicos. Estudo ao Microscopio eletrônico. *Rev Inst. Med. Trop. São Paulo.* 13(2):76-91.

- 69- Antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Relación huesped parásito. www.unanleon.edu.ni/unanleon/facesc/fac...ses/labora1.html
- 70- Teixeira ARL, Teixeira G, Macedo V, Prata A. 1978. Acquired Cell-mediated Immunodepression in Acute Chagas' Disease. *J Clin Invest* 62:1132-1141.
- 71- Botero, D, Restrepo M. 1998. Parasitosis humana. Corporación para Investigaciones Biológicas. 3ª. ed. Colombia. 457pp.
- 72- Gonzalez-Cappa S.M., Menes S, Schmunis G.A., Szafrman A., Vatuonne N., Yanovsky J.F. 1976. La Detección de aglutininas específicas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). *Medicina (Buenos Aires)*. 36:364-375.
- 73- Kierszenbaum F, Szein M B. 1994. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). In: *Parasitic Infections and the Immune System*. USA: Academic Press, 53-85.
- 74- Cross GAM. 1977. Antigenic variation in Trypanosomes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26(6):240-244.
- 75- Snary D. 1980. Antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. *Exp Parasitol* 49:68-77.
- 76- Abrahamsohn Ises A. and Coffman Robert L. 1996 *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology* 84: 231-244.
- 77- Nogueira N, Bianco C, Cohn Z. 1975. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med.* 142(1):224-229.
- 78- Salazar Schettino PM, Bucio TM, Cabrera BM, Guevara GY, Rojas WG, Ruíz HA, Marín LRA, Romero ES. 2002. Manual de Laboratorio para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*. UNAM, SSA, OPS/OMS. México.
- 79- Blanco BS, Segura E, Gurtler ER. 1999. El control de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina. *Medicina. (B.A.)*. 59(2):138-142.
- 80- Gonzalez-Cappa SM, Kloetzel J, Katzin AM, dos Santos R. 1980. *Trypanosoma cruzi*. Activity of Immunosera on Surface Antigens. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 22(6):275-280.
- 81- Gonzalez-Cappa SM, Bronzina A, Katzin AM, Golferá H, De Martini GW, Segura EL. 1980. Antigens of Subcellular Fractions of *Trypanosoma cruzi*. III. Humoral

- Immune Response and Histopathology of Immunized Mice. *J Protozool* 27(2):467-471.
- 82- García Robles V. 1979. Estudio serológico de la enfermedad de Chagas utilizando muestras de sangre en papel filtro. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. México DF. 72pp.
- 83- Maeket, GA. 1960. Die Komplementbindungsreaktion der Chagas krankheit. *Ztschr. Tropenmed. Parasit.* 11:152-186.
- 84- Sadum, EH., Anderson R, E., William J. S. y col. 1961. Fluorescent antibody test for the laboratory diagnosis of Schistosomiasis in humans by using dried blood smears on filter paper. *Exp Parasit* 11:117-120.
- 85- Souza LS. 1966. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 8(6):255-258.
- 86- Neal, R. A. 1970. Indirect Haemagglutination test for Chagas' disease, with a simple method for survey work. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 12(5):325-332.
- 87- Alvarez M. De Rissio A, J Gladys, de Martin W, Abramo L, Cerisola JA. 1971. Recolección de sangre en papel para el diagnóstico de infección chagásica por inmunofluorescencia. *Bol. Chil. Parasitol.* 26:2-6.
- 88- Franco, M.F., Chamma, L.G. 1973. Technical Modification on indirect Immunofluorescent antibody test using filter paper blood eluates. *Int. Arch. Allergy.* 44:692-696.
- 89- Goldsmith RS, Kagan IG, Reyes GMA, Cerdeño FJ. 1971. Estudios epidemiológicos realizados en Oaxaca. México. *Bol Of Sanit Panam.* 69(6):500-17.
- 90- Salazar y col. 1984. Seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro grupos de población del estado de Oaxaca. *Salud Pública de México.* 26(6):589-95
- 91- Salazar Schettino PM, Ruiz HAL, Harol de, Bucio TM, Jiménez J, García YY, Gutiérrez QM. 1989. Serología y electrocardiografía en jóvenes de área endémica de la Enfermedad de Chagas. *Rev. Méd. IMSS (Mex).* 27(1):59-65.
- 92- Marinkelle C. 1978. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. *Rev. Inst. Med.*

- Trop. 20 (2):112-114.
- 93- Kagan IG., Goldmith RS, Zárate CR, Allain DS. 1979. Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam. 87(4):309-318.
- 94- Contreras M. C. 1984. Comparación de la sensibilidad de reacción de hemaglutinación indirecta para la enfermedad de Chagas en muestras de sangre obtenidas por punción venosa y capilar (papel filtro) en pacientes con xenodiagnóstico positivo. Bol. Chil. Parasitol. 39:60-62.
- 95- González J, Sagua H., Anaya J. 1985. Rendimiento de la técnica de hemaglutinación indirecta para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en eluidos de papel filtro. Bol. Chil. Parasitol. 40:67-70.
- 96- Apt W., Arribada A, Meza M, Sandoval J. 1978. Evaluación de la reacción de aglutinación directa en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica. Rev. Med. Chile. 106:16-18.
- 97- Zicker, F. 1990. Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the Immunofluorescence, ELISA and Haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter paper. Bull. of the World Health. Organization. 68(4):465-471.
- 98- Contreras M. C. 1992. Utilidad de la ELISA-IgG en muestras de sueros y eluidos de sangre en papel filtro en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 47(3-4):76-81.
- 99- Ross, A., Novoa-Montero D. 1993. Comparability and Reliability of ELISA, Immunofluorescence, and Indirect Hemagglutination Assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. The Journal Infectious Disease. 168:1581-1584.
- 100- Machado-Coelho L. y col. 1995. Validity of serology for american trypanosomiasis with eluates from filter paper. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 90(1):59-64
- 101- Monteon V., Sosa T, Reyes PA. 1989. Serological test for american trypanosomiasis. A comparative study. Rev Lat-amer Microbiol. 31:35-38.
- 102- Pays , JF. 1999. La trypanosomose humaine americaine 90 ans apres sa decouverte par Carlos Chagas. II. Clinique, Physiopathologie, Diagnostic et

- Traiment. *Mèdecine Tropicale*. 59(1):79-94.
- 103- Brener Z, Andrade Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Microbiol* 27:347-82.
- 104- Boyden S. 1951. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J Exp Med*. 93:107-120.
- 105- Fife EH, Kent JF. 1960. Protein and Carbohydrate Complement Fixing Antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 9(5):512-517.
- 106- Seneca H, Peer P. 1966 Immuno-biological Properties of Chagastoxin (Lipopolysaccharide). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 60(5):610-620.
- 107- Seneca H, Peer P, Hampar B. 1966. Immunology. Active Immunization of Mice with Chagastoxin. *Nature*. 209:309-310.
- 108- Segura EL, Cura E, Paulone I, Vasquez C, Cerisola J. 1974 Antigenic Makeup of Subcellular Fractions of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*. 21(4):571-574.
- 109- Segura EL, Vazquez C, Bronzina A, Campos JM, Cerisola J, Gonzalez-Cappa SM. 1977. Antigens of the Subcellular Fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and Membrane Fraction. *J Protozool*. 24(4):540-543.
- 110- Snary D, Hudson L. 1979. *Trypanosoma cruzi* Cell Surface Proteins: Identification of One Major Glycoprotein. *FEBS Letter*. 100(1):166-170.
- 111- Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkeless J, Cohn Z. 1981. *Trypanosoma cruzi* Surface Antigens of Blood and Culture Forms. *J Exp Med* 153:629-639.
- 112- Nogueira N, Unkeless J, Cohn Z. 1982. Specific Glycoprotein Antigens on the Surface of Insect and Mammalian Stages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci*. 79:1259-1263.
- 113- Búa J, Bontempi E, Ruiz A, Segura EL. 1990. Antígenos en *Trypanosoma cruzi*. *Rev Arg Microbiol*. 22:37-55.
- 114- Umezawa E, Shikanai-Yasuda M, Da Silveira JF, Cotrim P, Paranhos G, Katzin AM. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Detection of a Circulating Antigen in Urine of Chagasic Patients Sharing Common Epitopes with an Immunodominant Repetitive Antigen. *Exp Parasitol*. 76:352-357.
- 115- Scharfstein J, Rodriguez MM, Alves CA, de Souza W, Previato JO, Mendonça-Previato L. 1983. *Trypanosoma cruzi*. Description of a Highly Purified Surface

Antigen Defined by Human Antibodies. J Immunol. 131(2):972-976.

- 116- Scharfstein J, Luquetti A, Murta A, Senna M, Rezende J, Rassi A, Mendonça-Previato L. 1985. Chagas' Disease: Serodiagnosis with Purified Gp25 antigen. Am J Trop Med Hyg. 34:1153-1160.
- 117- Scharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L, Miles M. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Characterization and Isolation of a 57/51,000 m.w. Surface Glycoprotein (GP57/51) Expressed by Epimastigotes and Bloodstream Trypomastigotes. J Immunol. 137(4):1336-1341.
- 118- Tachibana H, Montenegro LT, Kuniyama K, Nagakura K, Kaneda Y, Komatsu N. 1986. Localization of the *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25,000 Antigen by Immune Electron Microscopy using Monoclonal Antibodies. Z Parasitenkd. 72:701-707.
- 119- Tachibana H, Nagakura K, Kaneda Y. 1988. Serodiagnosis of Chagas' Disease using Monoclonal Antibody against *Trypanosoma cruzi*-specific Mr 25,000 Antigen. Parasitol Res. 74:409-414.
- 120- Araujo F, Tighe L. 1984. Antigens of *Trypanosoma cruzi* : Evidence that the 90-kD Protective Glycoprotein Antigen is Expressed in Blood-form Trypomastigotes and may not be Functional in Dead Epimastigotes. J Parasitol. 70(1):185-187.
- 121- Ferguson M, Snary D, Allen AK. 1985. Comparative Compositions of Cell Surface Glycoconjugates Isolated from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. Biochim Biophys Acta. 842:39-44.
- 122- Joiner K, Hieny S, Kirchhoff LV, Sher A. 1985. Gp72, the 72 kilodalton Glycoprotein, is the Membrane Acceptor Site for C3 on *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. J Exp Med. 161:1196-1212.
- 123- Schechter M, Stevens A, Luquetti A, Snary D, Allen A, Miles M. 1986. Prevalence of Antibodies to 72-Kilodalton Glycoprotein (GP72) in Patients with Chagas' Disease and further Evidence of Zymodeme Associated Expression of GP72 Carbohydrate Epitopes. Infect Immun. 53(3):547-552.
- 124- Araujo F. 1986. Analysis of *Trypanosoma cruzi* Antigens Bound by Specific Antibodies and by Antibodies to Related Trypanosomatids. Infect Immun. 53(1):179-185.

- 125- Schechter M, Nogueira N. 1988. Variations Induced by Different Methodologies in *Trypanosoma cruzi* Surface Antigen Profiles. *Mol Biochem Parasitol.* 29:37-46.
- 126- Fischer E, Ouaiissi MA, Velge P, Comette J, Kazatchkine MD. 1988. GP 58/68 a Parasite Component that Contributes to the Escape of the Trypomastigote form of *T. cruzi* from Damage by the Human Alternative Complement Pathway. *Immunology.* 65:299-303.
- 127- Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W, Goldenberg S. 1990. Use of Recombinant Antigens for the Diagnosis of Chagas Disease and Blood Bank Screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Brazil.* 85(4):513-517.
- 128- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Borges Pereira J, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S. 1992. Use of Recombinant Antigens for the Accurate Immunodiagnosis of Chagas' Disease. *Am J Trop Med Hyg.* 46(4):427-434.
- 129- Lorca M, González A, Veloso C, Reyes V, Vergara U. 1992. Immunodetection of Antibodies in Sera from Symptomatic and Asymptomatic Chilean Chagas' Disease Patients with *Trypanosoma cruzi* Recombinant Antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 46(1):44-49.
- 130- Lorca M, González A, Reyes V, Veloso C, Vergara U, Frasch C. 1993. El Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas Crónica Mediante Antígenos Recombinantes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Med Chile.* 121:363-368.
- 131- Gruber A, Zingales B. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of two Recombinant Antigens with Potential Application in the Diagnosis of Chagas' Disease. *Exp Parasitol.* 76:1-12.
- 132- Vergara U, Lorca M, Veloso C, González A, Engstrom A, Aslund L, Pettersson U, Frasch A. 1991. Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Human Sera Based on Reaction with Synthetic Peptides. *J Clin Microbiol.* 29(9):2034-2037.
- 133- Vergara U, Veloso C, González A, Lorca M. 1992. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Chagas' Disease using Synthetic Peptides. *Am J Trop Med Hyg.* 46(1):39-43.
- 134- Luquetti O.A. 2002. Perspectivas del uso de la serología (Ag naturales y otros) en la evaluación de la eficacia del tratamiento etiológico. <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/lave/c003/luque.htm>

- 135- Da Silveira J F, Umezawa S E, Luquetti O A. 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *TRENDS in Parasitology*. 17(6):285-91
- 136- Matsumoto KT, Cotrim CP, Franco da Silveira J, Stolf AMS, Umezawa E. 2002. *Trypanosoma cruzi*: Isolation of an immunodominant peptide of TESA (trypomastigote excreted-secreted antigens) by gene cloning. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.42:187-192.
- 137- Borror J., Triplehorn C and Jonson N. 1992. Chapter 7. Study of insects. 6ta.ed. Sounders College Publishing. E.U.A. pp146-163
- 138- Carcavallo RU, Galindez GI, Jurgerg J, Lent H, Galvão C, Martínez A. 1997. Bibliographic checklist of the American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). In Carcavallo RU y col. Atlas of Chagas disease vectors in America vol.1. Ed. Fiocruz. Rio de Janeiro Brazil pp 15-52.
- 139- Zeledon R. 1983. Vectores de la Enfermedad de Chagas y sus características fisiológicas. *Interciencia*. 8:384-395.
- 140- Cabrera B,M. 1997. Factores sociodemográficos y clínicos relacionados con la enfermedad de Chagas en hemodonadores. TESIS de Maestría. Facultad de Medicina. UNAM. 84pp.
- 141- Lwanga SK, Lemeshow S. 1971. Sample size determination in health studies. World Health Organization.
- 142- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- 143- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28(3):350-356.
- 144- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T₄. *Nature*. 227:680-685.
- 145- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:4350-4354.
- 146- Wayne W.D. 1990. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ª. Edición. Ed. Limusa.
- 147- Landis JR, Koch GG. 1977. Measurement of observer agreement for categorical

- data. *Biometrics*. 33:149-174.
- 148- Hernández B., Velasco MM. 2000. Encuestas transversales. *Rev. Sal. Pub. Mex.* 42(5):447-455.
- 149- García de la Torre GS, Huerta AS. 1998. Consideraciones metodológicas y análisis simple de los estudios transversales. *Bol. Med. hosp. Inf. Mex.* 55(6):348-356.
- 150- García de la Torre GS. 1996. Tripanosomiasis americana en el estado de Morelos. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. 211pp.
- 151- Shenone H, Contreras M, Borgoño J, Rojas A, Villaroel F, Valdés J. 1985. Enfermedad de Chagas en Chile. Sectores rurales y periurbanos del área de endemo-enzootia. Relación entre condiciones de la vivienda, infestación triatomínea domiciliaria e infección por *T. cruzi* del vector, del humano y de mamíferos domésticos. *Bol Chil Parasitol.* 40:58-67.
- 152- Guzmán BC. 2001. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *TRENDS In Parasitology* 17(8):372-376.
- 153- Tay J, Alonso G, Salazar-Schettino PM. 1978. Efectos de las hormonas (progesterona y testosterona) sobre la patogenicidad de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 20:45-50.
- 154- Afchain D, Le Ray D, Fruit J, Capron A. Antigenic Make-Up of *Trypanosoma cruzi* Culture Forms: Identification of a Specific Component. *J Parasitol* 1979;65:507-514.
- 155- Rangel Aldao R, Comach G, Allende O, Cayana E, Delgado V, Piras R, Piras M, Henríquez D, Negri D. 1986. *Trypanosoma cruzi* polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20:25-32.
- 156- Bucio MI, Cabrera M, Segura E, Zenteno E, Salazar-Schettino PM. 1999. Identification of Immunodominant Antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunological Investigations.* 28(4):257-268.
- 157- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 34:2143-2147.

- 158- Kirchhoff VL. 1996. Parasitic Diseases of the liver and intestines. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Gastroenterology Clinics. 25(3):517-533.
- 159- Kirchhoff VL, Votava JR, Ochs DE. Comparison of polymerase chain reaction-based and microscopic detection of *Trypanosoma cruzi*. 1996. J Clin Microbiol 34:1117.
- 160- Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology. 110:241.
- 161- Norma Oficial Mexicana. Para la Vigilancia epidemiológica, Prevención y Control de Enfermedades transmitidas por vector. In Diario Oficial de la Federación (PROY-NOM-032-SSA2-2000). 1-45pp. Enero 2001. (<http://www.gobernacion.gob.mx>)
- 162- Norma Oficial Mexicana 2000. Para la disposición de sangre humana y sus componentes, con fines terapéuticos. Document approved by the Inter-institutional Committee of Blood Banks, National Centre of Blood Transfusion, Mexico.
- 163- www.inegi.gov.mx
- 164- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (INEGI) Anuario estadístico del estado de Veracruz. Tomo I. Ed.1999. N° cat.15658-9.

12. PERSPECTIVAS

1. Incorporar la toma de muestra en papel filtro a los programas de estudios epidemiológicos masivos.
2. Continuar con el uso de esta prueba de tamizaje en estudios epidemiológicos, bancos de sangre y centros donde se realice pruebas para el diagnóstico y tener así un panorama general actualizado de la prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en el país.
3. Determinar la efectividad de otras pruebas serológicas como pruebas de tamizaje alternativas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

13. ANEXOS

ANEXO 1: DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO^{162,163}

El estado de Veracruz tiene una superficie de 72,815 km² que representa el 3.7% de la superficie del país, con un mínimo de 32 km. y un máximo de 212 km., teniendo una longitud entre 780 y 800 km.

Colinda al norte con Tamaulipas y el Golfo de México; al este con el Golfo de México, Tabasco y Chiapas; al sur con Chiapas y Oaxaca; al oeste con Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí.

Ubicación geográfica: Al norte 22°28' , al sur 17°09' de latitud norte; al este 93°36'; al oeste 98°39' de longitud oeste.

El estado de Veracruz se encuentra integrado por 11 jurisdicciones sanitarias que incluyen 17.390 localidades y 210 municipios, con un total poblacional de 7'059,360 habitantes. La jurisdicción sanitaria más extensa es Coatzacoalcos con 12 062.49 km² y la más pequeña es Orizaba con 2 163.49 km².

La altitud de las jurisdicciones varía entre los 10 y 1230 msnm. Las principales elevaciones van de los 860 msnm (Sierra La Garganta) a los 5610 nsnm. (volcán Citlaltepetl o Pico de Orizaba).

Presenta climas variados como son: Cálido húmedo con lluvias todo el año (Af), Cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Am), Cálido subhúmedo con lluvias en verano (A(w)), Semicálido húmedo con lluvias todo el año (Acf), Semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Acm), Semicálido húmedo con lluvias en verano (Acw), Templado húmedo con lluvias todo el año (C(f)), Templado húmedo con abundantes lluvias en verano (C(m)), Templado subhúmedo con lluvias en verano (C(w)), Semifrío húmedo con abundantes lluvias en verano (C(E)(m)), Semifrío subhúmedo con lluvias en verano (C(E)(w)), Semiseco templado (BS1k) y Frío (E(T)).

La vegetación es básicamente selvática (23.81% de la superficie estatal), 26.81% son zonas de pastizal, 3.67% son bosques y 43.23% de la superficie estatal es usada para la agricultura; el 2.48% restante esta representado por otro tipo.

Las cuencas hidrológicas están compuestas por los ríos Balsas, Pánuco, Tuxpan-Nautla, Papaloapan, Coatzacoalcos y Grijalva-Usumacinta.

La temperatura media anual varía de los 8.3°C a los 23°C.

La precipitación total anual varía de 728 a 2428 milímetros.

4) PARENTESCO CON EL JEFE DE FAMILIA:

- | | |
|---------------------|------------------------|
| 1.- JEFE DE FAMILIA | 5.- NIETO (A) |
| 2.- ESPOSA (O) | 6.- PADRE (MADRE) |
| 3.- HIJO (A) | 7.- OTRO (ESPECIFIQUE) |
| 4.- YERNO (NUERA) | |

3) MIEMBRO DE LA FAM. (NOMBRE COMPLETO) 4) PARENTESCO CON J. DE F. 5) EDAD 6) SEXO 7) LUGAR DE NACIM.

1)	_____	_____	_____	_____	_____
2)	_____	_____	_____	_____	_____
3)	_____	_____	_____	_____	_____
4)	_____	_____	_____	_____	_____
5)	_____	_____	_____	_____	_____
6)	_____	_____	_____	_____	_____
7)	_____	_____	_____	_____	_____
8)	_____	_____	_____	_____	_____

8) ESCOLARIDAD:

- | | |
|--------------------------|-------------------|
| 1.- ANALFABETA | 6.- PREPARATORIA |
| 2.- SABE LEER Y ESCRIBIR | 7.- TECNICO |
| 3.- PRIMARIA INCOMPLETA | 8.- NORMALISTA |
| 4.- PRIMARIA COMPLETA | 9.- PROFESIONISTA |
| 5.- SECUNDARIA COMPLETA | |

MIEMBRO DE LA FAMILIA ESCOLARIDAD 9) FECHA DE NACIM.

1	_____	_____
2	_____	_____
3	_____	_____
4	_____	_____
5	_____	_____
6	_____	_____
7	_____	_____
8	_____	_____

10) OCUPACION:

- | | | | |
|----------------|----------------|------------------|-------------------------|
| 1.-AGRICULTURA | 4.-COMERCIANTE | 7.-ESTUDIANTE | 10.-OBRERO |
| 2.-GANADERIA | 5.-HOGAR | 8.-PROFESIONISTA | 11.-OTRO (ES-PECIFIQUE) |
| 3.-ARTESANO | 6.-PESCADOR | 9.- TECNICO | |

1	_____	5	_____
2	_____	6	_____
3	_____	7	_____
4	_____	8	_____

11) ¿CUÁNTO TIEMPO TIENE DE VIVIR EN LA COMUNIDAD?

MIEMBRO DE LA
FAM.

1	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
2	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
3	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
4	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
5	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
6	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
7	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO
8	_____ AÑOS	_____ TIEMPO APROXIMADO

12) ¿HA VIVIDO EN OTRA(S) COMUNIDAD(ES) DEL PAIS?

1	_____ SI	_____ NO (PASE A LA PREG. 17)
2	_____ SI	_____ NO
3	_____ SI	_____ NO
4	_____ SI	_____ NO
5	_____ SI	_____ NO
6	_____ SI	_____ NO
7	_____ SI	_____ NO
8	_____ SI	_____ NO

13) ¿CUÁL HA SIDO EN LA QUE PERMANECIÓ POR MÁS TIEMPO?
 MIEMBRO DE LA
 FAMILIA

1	_____	_____
	LOCALIDAD	ESTADO
2	_____	_____
3	_____	_____
4	_____	_____
5	_____	_____
6	_____	_____
7	_____	_____
8	_____	_____

14) ¿CUÁNTO TIEMPO VIVIÓ EN ELLA?

1	_____	AÑOS	_____	MESES
2	_____	AÑOS	_____	MESES
3	_____	AÑOS	_____	MESES
4	_____	AÑOS	_____	MESES
5	_____	AÑOS	_____	MESES
6	_____	AÑOS	_____	MESES
7	_____	AÑOS	_____	MESES
8	_____	AÑOS	_____	MESES

15) ¿CÓMO ERA EL CLIMA DE ESE LUGAR LA MAYOR PARTE DEL AÑO?

1	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
2	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
3	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
4	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
5	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
6	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
7	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO
8	_____	FRIO	_____	TEMPLADO	_____	CALUROSO

16) ¿HABÍA CHINCHES EN AQUELLA COMUNIDAD?

1	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
2	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
3	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
4	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
5	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
6	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
7	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE
8	_____	SI	_____	NO	_____	NO SABE

17) ¿HA VIVIDO EN OTRO PAIS?

1	_____ SI	_____ NO (PASE A LA PREGUNTA 22)
2	_____ SI	_____ NO
3	_____ SI	_____ NO
4	_____ SI	_____ NO
5	_____ SI	_____ NO
6	_____ SI	_____ NO
7	_____ SI	_____ NO
8	_____ SI	_____ NO

18.- ¿CUÁL HA SIDO EN EL QUE PERMANECIÓ POR MÁS TIEMPO?
MIEMBRO DE LA FAMILIA

1	_____	_____
	LOCALIDAD	PAIS
2	_____	_____
3	_____	_____
4	_____	_____
5	_____	_____
6	_____	_____
7	_____	_____
8	_____	_____

19.- ¿CUÁNTO TIEMPO VIVIÓ EN ESE PAÍS?

1	_____ AÑOS	_____ MESES
2	_____ AÑOS	_____ MESES
3	_____ AÑOS	_____ MESES
4	_____ AÑOS	_____ MESES
5	_____ AÑOS	_____ MESES
6	_____ AÑOS	_____ MESES
7	_____ AÑOS	_____ MESES
8	_____ AÑOS	_____ MESES

20) ¿CÓMO ERA EL CLIMA DE ESE PAÍS LA MAYOR PARTE DEL AÑO?

1	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
2	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
3	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
4	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
5	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
6	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
7	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO
8	_____ FRIO	_____ TEMPLADO	_____ CALUROSO

21) ¿HABÍA CHINCHES EN AQUELLA(S) COMUNIDAD(ES)?

1	___ SI	___ NO	___ NO SABE
2	___ SI	___ NO	___ NO SABE
3	___ SI	___ NO	___ NO SABE
4	___ SI	___ NO	___ NO SABE
5	___ SI	___ NO	___ NO SABE
6	___ SI	___ NO	___ NO SABE
7	___ SI	___ NO	___ NO SABE
8	___ SI	___ NO	___ NO SABE

SECCION B. CÉDULA DE OBSERVACIÓN

LA INFORMACIÓN QUE A CONTINUACIÓN SE SOLICITA, SE RECARARÁ MEDIANTE OBSERVACIÓN DIRECTA DEL ENTREVISTADOR. PARA ELLO SOLICITARÁ PERMISO PARA ENTRAR EN LA VIVIENDA.

22.- ¿HAY ANIMALES DOMESTICOS?

PERRO(S)	___ SI	___ NO
	1	2
GATO(S)	___ SI	___ NO
	1	2

23.- ¿EN DONDE DUERMEN SUS ANIMALES DOMESTICOS?

___ DENTRO DE LA CASA.	___ ESTABLO.
1	2
___ EN EL PATIO	___ OTRO (ESPECIFIQUE)
3	4

24.- EL PRINCIPAL MATERIAL DE CONSTRUCCION DEL TECHO DE ESTA CASA ES:

___ MADERA/CORTEZA	___ LAMINA DE CARTÓN
1	5
___ CARRIZO/BAMBU	___ PALMA O ZACATE
2	6
___ LAMINA DE ASBESTO.	___ TEJA.
3	7
___ LAMINA DE ZINC.	___ CEMENTO/CONCRETO.
4	8

25.- EL PRINCIPAL MATERIAL DE LOS MUROS DE ESTA CASA ES:

___ ADOBE	___ CEMENTO
1	6
___ PIEDRA.	___ MADERA
2	7
___ LADRILLO.	___ CARRIZO/BAMBU
3	8
___ BARRO.	___ BLOCK
4	9
___ LÁMINA DE CARTÓN	
5	

26.- EL PRINCIPAL MATERIAL DEL PISO DE ESTA CASA ES:

<u>1</u> TIERRA	<u>4</u> MOSAICO
<u>2</u> CEMENTO.	<u>5</u> PIEDRA.
<u>3</u> MADERA.	

27.- ¿SE OBSERVAN FISURAS O GRIETAS EN EL SITIO DONDE DUERMEN LAS PERSONAS?

MUROS	<u>1</u> SI	<u>2</u> NO
TECHO	<u>1</u> SI	<u>2</u> NO
PISO	<u>1</u> SI	<u>2</u> NO (PASE A LA PREG.29)

28.- ¿HA VISTO SALIR CHINCHES DE LAS FISURAS?

<u>1</u> SI	<u>2</u> NO
-------------	-------------

29.-LA VENTILACIÓN DE LA VIVIENDA ES:

DORMITORIO	<u>1</u> BUENA	<u>2</u> REGULAR	<u>3</u> MALA
ALMACEN	<u>1</u> BUENA	<u>2</u> REGULAR	<u>3</u> MALA
LUGAR DONDE DUERMEN SUS ANIMALES	<u>1</u> BUENA	<u>2</u> REGULAR	<u>3</u> MALA.

30.-LA ILUMINACIÓN DE LA VIVIENDA ES:

DORMITORIO	<u>1</u> BUENA	<u>2</u> REGULAR	<u>3</u> MALA
ALMACEN	<u>1</u> BUENA	<u>2</u> REGULAR	<u>3</u> MALA.
LUGAR DONDE DUERMEN SUS ANIMALES	<u>1</u> BUENA	<u>2</u> REGULAR	<u>3</u> MALA.

36.-DURANTE LOS ÚLTIMOS 15 DIAS, ¿HA TENIDO UD. CALENTURA SIN MOTIVO APARENTE?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		

|-----|
|
(PASE A LA 39)

37.- ¿SE PUSO (O LE PUSIERON) EL TERMOMETRO?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		

|-----|
|
(PASE A LA 39)

38.- ¿CUANTO MARCÓ EL TERMOMETRO?

1	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
2	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
3	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
4	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
5	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
6	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
7	_____	GRADOS CENTIGRADOS.
8	_____	GRADOS CENTIGRADOS.

39.-DURANTE LOS UTIMOS 15 DIAS, ¿HA TENIDO ESCALOFRIOS SIN CAUSA APARENTE?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		

40.-DURANTE LOS ULTIMOS 15 DIAS, ¿HA TENIDO UD. SENSACIÓN DE DE CANSANCIO O AGOTAMIENTO SIN CAUSA APARENTE?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___

41.-DURANTE LOS ULTIMOS 15 DIAS, ¿HA TENIDO UD. SENSACIÓN DE MALESTAR GENERAL, SIN CAUSA APARENTE?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___

42.-EN LOS ULTIMOS 15 DIAS, ¿HA NOTADO APARICIÓN DE "BOLITAS" EN AXILAS, ATRÁS DE LAS OREJAS, LAS INGLES, YA SEAN DOLO-ROSAS O NO? (SEÑALAR EL LUGAR)

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___

43.-DURANTE LOS ULTIMOS 15 DIAS, ¿SE LE HA HINCHADO UN OJO (O LOS DOS) SIN CAUSA APARENTE?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		___

44.-EN LOS ULTIMOS 15 DIAS, ¿HA NOTADO UD. QUE LE SALGAN "BOLITAS" ROJAS, DURAS Y QUE DAN COMEZÓN?

1	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
2	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
3	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
4	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
5	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
6	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
7	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□
8	___	SI	___	NO	___	NO RECUERDA		□

(PASE A LA 46)

45.- ¿EN QUE PARTE DEL CUERPO?

1	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
2	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
3	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
4	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
5	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
6	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
7	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					
8	CARA ___	ANTEBRAZO ___	BRAZOS ___	PIERNAS ___	PIES ___		□
	ABDOMEN ___	TORAX ___					

46.-GENERALMENTE, ¿LE DUELE A UD. AL PASAR EL ALIMENTO?

1	___	SI	___	NO (PASE A LA 48)		□
2	___	SI	___	NO		□
3	___	SI	___	NO		□
4	___	SI	___	NO		□
5	___	SI	___	NO		□
6	___	SI	___	NO		□
7	___	SI	___	NO		□
8	___	SI	___	NO		□

47.-LE SUCEDE CON ALIMENTOS:

1	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
2	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
3	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
4	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
5	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
6	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
7	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS
8	<input type="checkbox"/> SOLIDOS	<input type="checkbox"/> LIQUIDOS	<input type="checkbox"/> AMBOS

48.-¿LE SUCEDE CON FRECUENCIA QUE EL ALIMENTO QUE COMIÓ, SE LE REGRESE A LA BOCA?

1	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO (PASE A LA 50)
2	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
6	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
7	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
8	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

49.- LE SUCEDE CUANDO SE ENCUENTRA:

1	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
2	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
3	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
4	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
5	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
6	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
7	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO
8	<input type="checkbox"/> ACOSTADO	<input type="checkbox"/> SENTADO	<input type="checkbox"/> PARADO

50.-LE SUCEDE CON FRECUENCIA QUE SIENTA DESEO DE "OBRAR" Y NO PUEDE?

1	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
2	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
6	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
7	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
8	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

51.-¿SE DISTIENDE O "AVIENTA" UD. DEL ABDOMEN O "BARRIGA" FRECUENTEMENTE?

- | | | |
|---|-----------------------------|--|
| 1 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO (PASE A LA 53) |
| 2 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 3 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 4 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 5 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 6 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 7 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 8 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |

52.- ¿DESDE CUANDO?

- | | | |
|---|-------------------------------|--------------------------------|
| 1 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 2 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 3 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 4 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 5 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 6 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 7 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |
| 8 | <input type="checkbox"/> AÑOS | <input type="checkbox"/> MESES |

53.-AL REALIZAR SUS ACTIVIDADES COTIDIANAS:PRE-SENTA UD. SENSACION DE AHOGO O FALTA DE AIRE?

- | | | | | |
|---|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 2 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 3 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 4 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 5 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 6 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 7 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |
| 8 | <input type="checkbox"/> AUSENTE | <input type="checkbox"/> LIGERA | <input type="checkbox"/> MODERADA | <input type="checkbox"/> INTENSA |

54.-SE FATIGA CUANDO CAMINA LA MISMA DISTANCIA QUE RECORRIA HACE ALGUNOS AÑOS?

- | | | |
|---|-----------------------------|--|
| 1 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO (PASE A LA 56) |
| 2 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 3 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 4 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 5 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 6 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 7 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 8 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |

59.- PUEDE DORMIR UD. SIN ALMOHADAS?

1	<input type="checkbox"/> SI (PASE A 61)	<input type="checkbox"/> NO
2	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
6	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
7	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
8	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

60.- ¿CUÁL ES LA RAZON?

1	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
2	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
3	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
4	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
5	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
6	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
7	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>
8	POR FALTA DE AIRE <input type="checkbox"/>	POR OTRA RAZON <input type="checkbox"/>

61.- DESPIERTA UD. EN LA NOCHE CON SENSACION DE AHOGO?

1	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
2	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
6	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
7	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
8	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

62.- SE LE HINCHAN SUS PIES?

1	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO (PASE A LA 64)
2	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
3	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
4	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
5	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
6	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
7	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO
8	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO

63.-A QUE HORA DEL DIA SE LE HINCHAN?

- | | | | | |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| 1 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 2 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 3 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 4 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 5 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 6 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 7 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |
| 8 | <input type="checkbox"/> EN LA MAÑANA | <input type="checkbox"/> EN LA TARDE | <input type="checkbox"/> TODO EL DIA | <input type="checkbox"/> |

64.- ¿HA CONSUMIDO ALGUNA VEZ CUALQUIER BEBIDA QUE CONTENGA ALCOHOL?

- | | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 2 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 3 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 4 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 5 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 6 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 7 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 8 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |

65.- ¿HA CONSUMIDO CUALQUIER BEBIDA ALCOHOLICA DURANTE LOS ULTIMOS 12 MESES?

- | | | |
|---|-----------------------------|--|
| 1 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO (PASE A LA 68) |
| 2 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 3 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 4 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 5 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 6 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 7 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |
| 8 | <input type="checkbox"/> SI | <input type="checkbox"/> NO |

66.- DURANTE LOS ÚLTIMOS 12 MESES ¿CON QUÉ FRECUENCIA TOMÓ 3 Ó MÁS COPAS DE CUALQUIER BEBIDA, EN UNA SOLA OCASIÓN (CUALQUIER COMBINACIÓN DE CERVEZA, VINO, DESTILADOS, PULQUE, ETC)?

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| 1) TODOS LOS DÍAS | 6) DE 3 A 6/AÑO |
| 2) DE 3 A 4/SEM. | 7) 2 VECES/AÑO |
| 3) DE 1 A 2/SEM. | 8) 1 VEZ/AÑO |
| 4) DE 1 A 3/MES | 9) NINGUNA VEZ |
| 5) DE 7 A 8/AÑO | 10) NO SABE O NO RECUERDA. |

- | | | | |
|---|--------------------------|---|--------------------------|
| 1 | <input type="checkbox"/> | 5 | <input type="checkbox"/> |
| 2 | <input type="checkbox"/> | 6 | <input type="checkbox"/> |
| 3 | <input type="checkbox"/> | 7 | <input type="checkbox"/> |
| 4 | <input type="checkbox"/> | 8 | <input type="checkbox"/> |

67.- ¿CON QUÉ FRECUENCIA LLEGÓ AL ESTADO DE EBRIEDAD DURANTE LOS ÚLTIMOS 12 MESES?

- | | |
|-------------------|----------------------------|
| 1) TODOS LOS DÍAS | 6) DE 3 A 6/AÑO |
| 2) DE 3 A 4/SEM. | 7) 2 VECES/AÑO |
| 3) DE 1 A 2/SEM. | 8) 1 VEZ/AÑO |
| 4) DE 1 A 3/MES | 9) NINGUNA VEZ |
| 5) DE 7 A 8/AÑO | 10) NO SABE O NO RECUERDA. |

1 _____	5 _____
2 _____	6 _____
3 _____	7 _____
4 _____	8 _____

68.- EL LUGAR DONDE DUERME, ESTA JUNTO A LA PARED?

1	_____ SI	_____ NO
2	_____ SI	_____ NO
3	_____ SI	_____ NO
4	_____ SI	_____ NO
5	_____ SI	_____ NO
6	_____ SI	_____ NO
7	_____ SI	_____ NO
8	_____ SI	_____ NO

69.- SOBRE QUE DUERME CADA UNA DE LAS PERSONAS DE ESTA FAMILIA?

1	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
2	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
3	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
4	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
5	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
6	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
7	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)
8	_____ CAMA	_____ HAMACA	_____ PETATE	_____ OTRO (ESPECIFIQUE)

SECCION D. EN ESTA SECCION SE OBTENDRA INFORMACION ACERCA DE LA VIVIENDA.

70.- ¿HACE CUANTO TIEMPO VIVEN UDS. EN ESTA CASA?

_____	UN AÑO O MENOS.	_____	MAS DE UN AÑO.	_____	NO SABE.
1		2		3	

PASE A LA PREG. 72

71.-¿CUANTO TIEMPO PERMANECIO DESOCUPADA LA VIVIENDA?

1 UN AÑO O MENOS. 2 MAS DE UN AÑO. 3 NO SABE.

72.-CUANTAS PERSONAS VIVEN (COMEN Y DUERMEN) EN ESTA CASA?

_____.

73.-¿DE CUANTOS CUARTOS CONSTA LA VIVIENDA (SIN CONTAR COCINA NI BAÑO)?

UNO 1 DOS 2 TRES O MAS 3

74.-CUANTOS CUARTOS SE USAN PARA DORMIR?

UNO 1 DOS 2 TRES O MAS 3

75.- ¿TIENEN ANIMALES DE PATIO O DE CORRAL?

SI 1 NO 2 (PASE A LA PREG. 77)

76.- EN DONDE DUERMEN SUS ANIMALES?

ESTABLOS 1 CABALLERIZA 2 CORRAL 3
PALOMAR 4 GALLINERO 5 CHIQUERO 6
OTRO (ESPECIFICAR) 7.

77.- ¿ACOSTUMBRA ROCIAR INSECTICIDAS EN LA CASA?

1 SI 2 NO (PASE A LA PREG. 80)

78.-QUE TIPO DE INSECTICIDA SE UTILIZO: (ANOTE LA MARCA)

_____.

79.- EL ROCIAMIENTO LO HIZO:

1 PARTICULARMENTE 2 EL GOBIERNO.

| |

SECCION E. CEDULA DE OBSERVACION

NOS PERMITIRIA ENTRAR A SU CASA PARA VER SI ENCON-
TRAMOS ALGUNA SEÑAL DE QUE PUDIERA HABER CHINCHES,
O ALGUN LUGAR DONDE PUDIERAN ANIDAR PARA CAPTURAR-
LAS EN CASO DE ENCONTRAR ALGUNA?

80) EL NUMERO DE TRIATOMAS CAPTURADAS DENTRO DE LA
VIVIENDA FUE:

1 ADULTOS VIVOS

2 NINFAS VIVAS

| | |

3 HECES FRESCAS

4 INSECTO MUERTO

| | |

5 HUEVECILLOS

6 EXUVIAS

| | |

7 NO SE ENCONTRO

| |

81.-SITIO EN EL QUE SE CAPTURARON:

1 DORMITORIO

2 ALMACEN

| |

3 LUGAR DONDE DUERMEN LOS ANIMALES

| |

4 OTRO LUGAR (ESPECIFICAR) _____

| |

82.- NUMERO DE TRIATOMAS CAPTURADAS FUERA DE LA
VIVIENDA FUE:

1 ADULTOS VIVOS

2 NINFAS VIVAS

| | |

3 HECES FRESCAS

4 INSECTO MUERTO

| | |

5 HUEVECILLOS

6 EXUVIAS

| | |

7 NO SE ENCONTRO

| |

83.- SITIO EN EL QUE SE CAPTURARON:

<u>1</u>	PATIO	<u>2</u>	TRONCO DE ARBOLES.
<u>3</u>	NIDOS DE AVES	<u>4</u>	OTRO (ESPECIFIQUE)

SECCION F. REGISTRO DE PESO, TALLA Y LABORATORIO.
ESTA PARTE DE LA ENCUESTA, SE APLICARÁ A CADA UNA DE LAS
PERSONAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.

	PESO	TALLA
1)	_____	_____
2)	_____	_____
3)	_____	_____
4)	_____	_____
5)	_____	_____
6)	_____	_____
7)	_____	_____
8)	_____	_____

	RHAI (TITULOS)	ELISA (D.O.)
1)	____:_____	_____
2)	____:_____	_____
3)	____:_____	_____
4)	____:_____	_____
5)	____:_____	_____
6)	____:_____	_____
7)	____:_____	_____
8)	____:_____	_____



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

TRIPANOSOMIASIS AMERICANA
EN EL ESTADO DE VERACRUZ.



FOLIO []

¿NOS PERMITIRÍA ENTRAR A SU CASA PARA VER SI ENCONTRAMOS ALGUNA SEÑAL DE QUE PUDIERA HABER CHINCHES, O ALGUN LUGAR DONDE PUDIERAN ANIDAR PARA CAPTURARLAS EN CASO DE ENCONTRAR ALGUNA?

1.- EL NUMERO DE TRIATOMAS CAPTURADAS DENTRO DE LA VIVIENDA FUE:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| <u> </u> ADULTOS VIVOS | <u> </u> NINFAS VIVAS |
| <u> 1 </u> | <u> 2 </u> |
| <u> </u> HECEES FRESCAS | <u> </u> INSECTO MUERTO |
| <u> 3 </u> | <u> 4 </u> |
| <u> </u> HUEVECILLOS | <u> </u> EXUVIAS |
| <u> 5 </u> | <u> 6 </u> |
| <u> </u> NO SE ENCONTRO | |
| <u> 7 </u> | |

2.- SITIO EN EL QUE SE CAPTURARON:

- | | |
|--|---------------------|
| <u> </u> DORMITORIO | <u> </u> ALMACEN |
| <u> 1 </u> | <u> 2 </u> |
| <u> </u> LUGAR DONDE DUERMEN LOS ANIMALES | |
| <u> 3 </u> | |
| <u> </u> OTRO LUGAR (ESPECIFICAR) _____ | |
| <u> 4 </u> | |

3.-EL NUMERO DE TRIATOMAS CAPTURADAS FUERA DE LA VIVIENDA FUE:

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| <u> </u> ADULTOS VIVOS | <u> </u> NINFAS VIVAS |
| <u> 1 </u> | <u> 2 </u> |
| <u> </u> HECEES FRESCAS | <u> </u> INSECTO MUERTO |
| <u> 3 </u> | <u> 4 </u> |
| <u> </u> HUEVECILLOS | <u> </u> EXUVIAS |
| <u> 5 </u> | <u> 6 </u> |
| <u> </u> NO SE ENCONTRO | |
| <u> 7 </u> | |

4.- SITIO EN EL QUE SE CAPTURARON:

- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| <u> </u> PATIO | <u> </u> TRONCO DE ARBOLES. |
| <u> 1 </u> | <u> 2 </u> |
| <u> </u> NIDOS DE AVES | <u> </u> OTRO (ESPECIFIQUE) |
| <u> 3 </u> | <u> 4 </u> |

DE TRIATOMAS ESTUDIADAS EN LA VIVIENDA _____.

DE TRIATOMAS INFECTADAS _____.

ANEXO 3**FÓRMULAS Y REACTIVOS****MEDIO DE CULTIVO BIFASICO**

fase solida

agar nutritivo	23 g
NaCl	8 g
agua destilada	1000ml

fase líquida

Brain heart infusion (BHI)	37 g
agua destilada	1000ml

MEDIO DE CULTIVO MONOFÁSICO (Expansión)

Extracto de levadura	3 g
Triptosa	9 g
Brain heart infusion	5 g
Glucosa	4 g
Fosfato disódico 2H ₂ O	10 g *
NaCl	3.6 g
KCl	0.4 g
Hígado en polvo	1.5 g
Hemina	0.020 g
agua destilada	1000ml

ANTIGENO:

SOLUCION ANTICOAGULANTE	p / 100 ml
Glucosa	2.05 g
Citrato de sodio	0.080 g
Cloruro de sodio	0.042 g
Ácido cítrico	0.0055 g
Aqua destilada	100 ml
Esterilizar a 1 atm. (15 libras)	15 min.

SOLUCION PBS pH 7.2

SOLUCIONES MADRE

A. solución de fosfatos monopotásica:

fosfato monopotásico anhídrido ($\text{KH}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	20.414 g
agua destilada c.s.p.	1000 ml

B. solución de fosfatos disódico:

fosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	53.72 g
agua destilada c.s.p.	1000 ml

SOLUCIONES DE TRABAJO

A. solución de fosfatos monopotásico	28 ml
B. solución de fosfatos disódico	72 ml
C. cloruro de sodio	8.5 g
agua destilada c.s.p.	1000 ml

SOLUCIONES DE FORMOL

Formol al 8% en PBS pH 7.2:

216 ml de formol al 37% – c.b.p. 1000 ml de PBS pH 7.2

Formol al 6% en PBS pH 7.2:

162 ml de formol al 37% – c.b.p. 1000 ml de PBS pH 7.2

SOLUCION DE ACIDO TANICO AL 1%

1 g ácido tánico en 100 ml de PBS pH 7.2 disolver y llevarlo a 1000 ml.

SOLUCION DE AZIDA DE SODIO AL 1%

1 ml de azida de sodio en 100 ml de agua destilada estéril.

SOLUCION DE TIOGLICOLATO 1:1000

1 g de tioglicolato / 1000 ml agua destilada.

SOLUCION PROTECTORA

Glicina	4 g
Leche descremada en polvo	2.7 g
Glutamato de sodio	2 g
Tioglicolato de sodio	0.1 g
Timerosal	0.1 g
PBS pH 6.4	100 ml

SUEROS TESTIGOS

Los sueros testigos para las reacciones serológicas se obtienen de un "pool" de sueros de reactividad conocida.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS METODO DE LOWRY (FOLIN-CIOCALTEU)

Reactivos:

Solución A:

1 ml - tartrato de sodio y potasio al 2% (2g en 100 ml H₂O)

1 ml - sulfato de cobre al 1% (CuSO₄.5H₂O) (1g en 100 ml H₂O)

50 ml - carbonato de sodio al 5% (Na₂CO₃) 5g/100 ml NaOH 0.1N.

Reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu) 1:1 con agua destilada.

Curva estándar

Solución de albúmina sérica bovina (BSA), que contenga 1mg/ml.

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS (METODO FENOL – SULFURICO DE DUBOIS)

Reactivos:

Fenol 5%

H₂SO₄ (ácido sulfúrico concentrado)

Curva estándar

100 mg de glucosa en 100 ml de agua destilada

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Gel concentrador (5%)

Acilamida / bis	850 (μl)
Agua desionizada estéril	4.55 (ml)
Tris 1M pH 6.8	800 (μl)
SDS-10%	62.5 (μl)
Mezclar y desgasificar 15 min al vacío o a 37°C 10-15min.	
Persulfato de amonio 10%	31 (μl)
TEMED	3.1(μl)

Reactivos y soluciones

Acrilamida 30% -bis/acrilamida 0.8%

Pesar 30 g de acrilamida + 0.8 g de N-bis-Acrilamida.

Aforar a 100 ml con agua desionizada estéril, filtrar y cubrir con aluminio.

Guardar a 4°C.

Tris 1.5 m pH 8.8

Pesar 33.33 g de Tris-base (trizma base)

Disolver en 160 ml de agua desionizada estéril

Ajustar el pH a 8.8 con HCl 6 N

Aforar a 200 ml. Esterilizar y guardar a 4°C.

Tris 1 m pH 6.8

Pesar 12.1 g de Tris-base

Disolver en 80 ml de agua desionizada

Ajustar el pH a 6.8 con HCl

Aforar a 100 ml con agua desionizada estéril

Esterilizar y guardar a 4°C.

SDS-10%

Pesar 1 g de SDS

Disolver en agua desionizada esteril

Aforar el volumen a 10 ml.

Guardar a 4°C.

Buffer de muestra

	2X	4X
SDS 10% (g)	1.25	1.25
Tris 1M pH 6.8 (ml)	3.125	3.125
2- mercaptoethanol (ml)	2.5	2.5
Azul de bromofenol (mg)	2.5	2.5
Glicerol (ml)	5	5
Agua (aforar a) (ml)	25	12.5

Amortiguador de corrida 5X pH 8.3

Tris-base	9 g
Glicina	43.2 g
SDS	3 g
Agua desionizada estéril (aforar a)	600 ml

Guardar a 4°C.

A 60 ml del stock 5X añadir 240 ml de agua por corrida.

Colorante Azul de Coomassie

Azul de Coomasie	0.06 g
Ácido acético	10 ml
Metanol	50 ml
Agua desionizada estéril	40 ml

Solución para destefir el gel

Ácido acético	10 ml
Etanol	15 ml
Agua desionizada estéril	75 ml

ELECTROINMUNOTRANSFERENCIA (WESTERN-BLOT)

Electroforesis del gel de corrida

Amortiguador de transferencia pH 8.1-8.4

Tris-base 25mM	3.03 g
Glicina 192mM	14.4 g
Metanol 20% (V/V)	200 ml

Aforar a 1000 ml con agua desionizada estéril

no ajustar el ph con acidos ni bases

Revelado de la prueba con el sustrato

- 4-chloro-1-naphtol (4CN)

Tris HCl/NaCl 10 mm - 8.5 ml + 5.1 mg de chloronaphtol en 1.7 ml de *metanol frío*

agregar 5 µl de H₂O₂ al 30%

Tris HCl(10mm)/NaCl (0.14M) pH 7.5

Tris HCl	0.158 g
Agua desionizada estéril	100 ml ajustar a pH 7.5
NaCl	0.819 g

Esterilizar y guardar a 4°C

ANEXO 4 REACTIVIDAD ENTRE ELUIDOS SERICOS Y SUEROS (VERACRUZ)

Antes de iniciar el procesamiento de muestras del estudio epidemiológico, se realizó un estudio para determinar la reactividad obtenida en eluidos séricos de muestras sanguíneas obtenidas en papel filtro y ser comparadas con los sueros correspondientes obtenidos por punción venosa en antebrazo con los resultados siguientes:

			ELUIDO		SUERO		
			ELISA	HAI	ELISA	HAI	IFI
I-28	Santiago Hernández Bautista	011012201	.194	1:16	.206	1:128	1:128
I-961	Jorge Valle Cruz	019032001	.140	1:16	.695	1:32	1:128
II-236	Hermelinda del Ángel Domínguez	02250603	.307	1:32	.334	1:32	1:128
II-283(40)	Josefina López del Ángel	02260903	.363	1:16	.380	1:32	1:128
II-311(43)	Narcisa Hernández Erasmo	02261603	.398	1:16	.205	1:32	1:128
II-319(47)	Alberta Gaspar Catarina	02261802	.652	1:32	.279	1:256	1:256
II-344(51)	Bonifacio Santiago Inés	02262201	.389	1:16	.481	1:32	neg
II-381	Alberta Antonio Domínguez	02280102	.218	1:64	.524	1:32	1:128
II-386	Adelaida Santiago Reyes	02280202	.314	1:64	.473	1:32	1:256
II-389	Magdalena Domínguez Santiago	02280205	.331	1:64	.677	1:32	1:32
II-397	Onésimo Nava Hernández	02280502	.413	1:16	.456	1:32	1:256
II-423	Amalia Cruz Franco	02281202	.427	1:64	.450	1:32	1:64
II-433	Ma. Isabel Lugo Nieto	02290202	.352	1:32	.506	1:32	1:128
II-449	Polcarpo Flores Blanco	02300101	.457	1:32	.558	1:32	1:256
II-481	Manuel Hilario Librado	02310703	.228	1:32	.380	1:32	1:128
II-493	Eduardo Hilario Francisco	02311004	.306	1:32	.483	1:32	1:64
II-514	Antonio Benito Carballo	02320301	.304	1:16	.509	1:32	1:512
III-713	Isidora Plata Viguera	03137201	.410	1:64	.427	1:32	1:32
V-930	Margarita Guevara Ávila	05261502	.122	1:16	.511	1:32	1:128
V-1064	Heriinda Cuevas Castillo	05291201	.047	1:16	.225	1:32	neg
VIII-425	Isidro Trujillo Alvarez	08150403	.158	1:16	.463	1:32	1:256

TÍTULOS DE CORTE: EN ELUIDOS HAI: 1:16 ELISA: ≥ 140 (D.O.)
 EN SUEROS HAI: 1:16 ELISA: ≥ 180 (D.O.)