

870127

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

Incorporada a la Universidad Nacional Autónoma de México

24
2ej

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS



Condiciones seroepidemiológicas de la Enfermedad de Chagas en individuos del medio rural; área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

TESIS PROFESIONAL

que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

presenta:

Alonso Sandoval Correa

asesor: Q.F.B. Ma. del Socorro Pulido García

Guadalajara, Jalisco

Octubre de 1987

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICES

	Página
I INTRODUCCION	1
- Definición	1
- Agente Etiológico	
1.- Taxonomía	1
2.- Morfología y Ciclo Biológico	2
3.- Transmisores	4
4.- Mecanismos de Transmisión	5
5.- Patogenia	6
6.- Cuadro Clínico	8
- Inmunología de la Enfermedad	12
- Diagnóstico de Laboratorio	15
II ANTECEDENTES	20
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
IV JUSTIFICACION	22
V OBJETIVOS	23
VI MATERIAL Y METODOS	24
- Plan de Trabajo	26
- Procesamiento de la Muestra	
1.- Técnicas de Diagnóstico	30
2.- Criterios de Lectura	37
3.- Preparación del Antígeno	38
4.- Reactivos	41
VII RESULTADOS	42
VIII DISCUSION	48
IX CONCLUSIONES	51
ANEXO	52
BIBLIOGRAFIA	58

I INTRODUCCION

DEFINICION

La Enfermedad de Chagas, conocida también como Trypanosomiasis Americana, es la enfermedad infecciosa causada, en el hombre y otros mamíferos, por el protozoario Trypanosoma cruzi.

Involucra principalmente al individuo que habita viviendas precarias en zonas rurales de casi todos los países de América Latina comprendidos entre los 43° latitud Norte y los 47° latitud Sur, es decir, del Sur de los Estados Unidos de América al Sur de la Argentina.

AGENTE ETIOLOGICO

1.- Taxonomía.

Phylum:	Protezoa
Sub-phylum:	Sarcomastigophora
Superclase:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophora
Orden:	Kinetoplastida
Sub-orden	Trypanosomatina
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<u>Trypanosoma</u>
Especie:	<u>cruzi</u>

2.- Morfología y Ciclo Biológico.

Trypanosoma cruzi se presenta en la naturaleza en tres estadios morfológicos principales que son: Tripomastigote, Epimastigote y Amastigote (1).

El tripomastigote es un flagelado de cuerpo alargado con forma de tirabuzón, que mide entre 20 y 25 micras de longitud. Presenta un gran núcleo vesiculoso central, un cinetoplasto subterminal posterior al núcleo y, junto al cinetoplasto, un cinetosoma, de donde nace el flagelo.

El flagelo, nacido en la porción posterior, recorre al parásito a lo largo de su cuerpo, unido por una membrana ondulante, y termina por salir libre en la porción anterior para moverse activamente como un chicote.

El citoplasma es poco granuloso y, cuando se tiñe al parásito con Giemsa o Wright, se ve azul pálido, el núcleo color carmín y el cinetoplasto morado.

A este estadio morfológico se le encuentra en la sangre de los mamíferos como tripomastigote "circulante", y en la ampolla rectal del intestino del insecto vector como tripomastigote "metacíclico", siendo esta última forma la infectante para los mamíferos.

El epimastigote es la segunda forma que presenta el parásito. Es de aspecto fusiforme y con 20 micras de longitud en promedio. El cinetoplasto está situado en la región anterior con respecto al núcleo, y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se encuentra en el intestino del insecto vector, en donde se multiplica profusamente y da lugar a los tripomastigotes metacíclicos. Esta forma es también la que reproduce mayormente en los medios de cultivo.

El amastigote es la forma intracelular en el mamífero. Mide de 2 a 2.5 micras y tiene forma redondeada. No presenta flagelo libre, aunque al microscopio electrónico se ve al flagelo dentro de una bolsa. Presenta un grán núcleo y cinetoplasto.

El ciclo biológico del parásito se inicia (1,2,3,4) cuando el Triatomino infectado se alimenta y al mismo tiempo defeca sobre la piel de su huésped.

En las deyecciones se encuentran los tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran al cuerpo a través del agujero de la picadura cuando el triatomino arrastra con las patas la materia fecal hacia dicho agujero, o también penetran por las escoriaciones producidas por el rascado de la piel, o a través de las membranas mucosas que son frotadas con los dedos contaminados con las heces del insecto, y aún a través de la piel indemne.

Habiendo penetrado los tripomastigotes metacíclicos por debajo de la piel o mucosas, se introducen en las células del tejido adyacente al sitio de penetración, pierden la membrana ondulante y el flagelo y se redondean y diferencian a amastigote, el cual se multiplica por fisión binaria, produciendo tal cantidad de parásitos que la célula huésped muere pronto y se lisa. Los amastigotes salen a circulación, se diferencian a tripomastigotes, y penetran a nuevas células, repitiendo el ciclo muchas veces.

Cuando un triatomino libre de infección se alimenta sobre un mamífero infectado, ingiere con la sangre el tripomastigote circulante. Este sufre un proceso de diferenciación a medida que progresa por el tubo digestivo del insecto (esferomastigote-epimastigote). Como epimastigote se divide activamente por fisión binaria longitudinal en el intestino medio del triatomino hasta que, a nivel de la ampolla rectal del intestino, se diferencia a tripomasti

gote metacíclico, entre 8 y 10 días después de la infección.

El ciclo se completa cuando el triatomino infectado pica, defeca, e infecta a un nuevo huésped.

3.- Transmisores.

Los transmisores de T. cruzi son pequeños insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Los triatominos son insectos que miden de 2 a 4 cm de longitud, su cuerpo es aplanado en sentido dorso-ventral, de color pardo o negro. Su cabeza es larga y cónica, por detrás de los ojos se localizan los ocelos y por delante un par de antenas muy delgadas; su probóscide es larga y se encuentra doblada en ángulo agudo hacia la porción ventral; al abdomen, que también es alargado, generalmente presenta a su alrededor colores brillantes que van del rojo al amarillo según la especie; también están presentes un par de alas. Todas las fases del desarrollo de estos insectos son hematófagas; se alimentan de vertebrados silvestres y peridomésticos, y algunas especies han desarrollado hábitos marcadamente intradomiciliarios, por lo que su alimentación la llevan a cabo en el hombre o en animales domésticos. Sus nidos o criaderos son las rendijas y grietas en las paredes de adobe, ladrillo, carrizo, madera, los techos de paja y teja, así como los echaderos de los animales domésticos. Tienen hábitos principalmente nocturnos, escondiéndose durante el día en las rendijas y agujeros de las paredes.

En México se conocen 32 especies, pertenecientes a 7 géneros: un mínimo de 25 especies del género *Triatoma*, una del gén. *Rhodnius*, una del gén. *Dipetalogaster*, dos del gén. *Eratyrus*, una

del gén. *Belminus*, una del gén. *Pastronylus*, y una especie del gén. *Paratriatoma* (5).

Se han encontrado gran variedad de triatominos en áreas por debajo de los 1800 metros de altura sobre el nivel del mar, es decir, en las 2/3 partes del territorio nacional (6).

Los mamíferos de pequeño y mediano tamaño son generalmente quienes constituyen los reservorios de la enfermedad. Se cree que la proximidad entre reservorios silvestres y el hombre provoca los desequilibrios ecológicos.

Dentro de los reservorios domésticos se presentan: perro (*Canis familiaris*), gato (*Felis catus*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), cabra (*Capra hircus*); y entre los reservorios silvestres más frecuentemente encontrados están: conejo (*Oryctolagus cuniculus*), tlacuache (*Didelphis marsupialis*) y armadillo (*Dasyurus novemcinctus*), (7).

4.- Mecanismos de Transmisión.

La forma natural de la transmisión de *T. cruzi* al hombre en área endémica es por medio del insecto hematófago infectado, cuando este defeca sobre el huésped, depositando junto con las materias fecales a los tripomastigotes metacíclicos, los cuales penetran al cuerpo por los mecanismos ya descritos.

La infección chagásica se puede transmitir también por transfusión sanguínea (8), pues se ha comprobado que el parásito puede permanecer viable a temperaturas de 4 °C, en las condiciones habituales de los bancos de sangre, por lo menos 18 días, e inclusive hasta por dos meses.

En México se han realizado estudios esporádicos en bancos de sangre con el propósito de encontrar portadores de la enfermedad. Hasta 1987 se han realizado tres estudios:

El primero, en Oaxaca, donde el 4% de los donadores estaban infectados (9); el segundo en Puebla, con el 17.5% de infectados (10); y el tercero en Acapulco, donde el 19% de los donadores remunerados resultaron infectados (11).

La vía transplacentaria es también otro mecanismo de transmisión (12). Durante la segunda mitad de la gestación los tripomastigotes sanguíneos de la madre pueden salvar la barrera placentaria e infectar al producto. Se ha reportado transmisión congénita hasta a un 3% de los hijos de madres chagásicas (13).

Otras posibles formas de transmisión son: la manipulación de animales infectados por personas que los desollan y manejan sus carnes; infecciones en el laboratorio, por quienes trabajan con sangre contaminada o mantienen cultivos de T. cruzi en laboratorios de investigación.

Y ultimamente se ha sugerido la transmisión potencial ligada al trasplante de órganos, en donde parásitos existentes en el órgano donado podrían originar una infección aguda grave en el receptor inmunosuprimido.

5.- Patogenia.

El parásito agrede al huésped de varias maneras, pero quizá la destrucción de las células del sistema Retículo-Endotelial (SRE) y de otros tejidos (músculo, células nerviosas), por el crecimiento y multiplicación del organismo, sea de los más importantes.

Cuando el parásito ingresa a los tejidos invade las células del sitio de entrada. La ruptura de estas permite su diseminación y se desencadenan fenómenos inflamatorios inespecíficos localizados, en relación con los nidos ("pseudequistes") de parásitos destruidos. Simultáneamente, sin relación con los parásitos, comienzan a aparecer focos de infiltrados mononucleares.

Se ha propuesto un mecanismo patogénico que envuelve la destrucción de células neuronales en el corazón y sistema digestivo (14). Cuando es invadido el músculo cardiaco, se puede perder hasta el 80% de las células ganglionares cardiacas.

Es común que se destruyan, con el tiempo, los ganglios autónomos del esófago y del colon. Esto arruina el tono muscular, dando como resultado la gradual flacidez del órgano, el cual aumenta su diámetro y es incapaz de pasar materiales. A estas condiciones avanzadas se les ha llamado "mega-síndromes": "megaesófago" y "megacolon", dependiendo del órgano afectado.

Estos cambios característicos, asociados con cardiopatía y megasíndromes, se atribuyen a respuesta auto-inmune, causada por la liberación de toxinas en el momento de ruptura del pseudoquiste y a la destrucción de los amastigotes restantes (15).

La génesis de esta auto-agresión permanece sin aclarar.

Lo que sí está claro es que los parásitos en el miocardio bloquean los haces, produciendo disfunción, dilatación (cardiopatías), o también inflamación miocárdica (miocarditis aguda) con infiltración celular, que posteriormente se traducirá en inflamación con fibrosis (miocarditis chagásica crónica).

Los parásitos invaden gran cantidad de tejidos y órganos, como corazón, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculo, etc., produciendo lesiones y cuadros clínicos diversos.

6.- Cuadro Clínico.

A la penetración de T. cruzi en el organismo sigue un período de incubación que suele durar entre 4 y 14 días, tiempo en que los parásitos sufren las transformaciones mencionadas anteriormente y se introducen en las células, empezando a ejercer los mecanismos patogénicos ya señalados.

La enfermedad de Chagas presenta períodos "agudo" y "crónico".

Fase o período "agudo": Aún cuando en la mayoría de los casos no hay síntomas o signos de entrada del parásito y cursan asintomáticos, entre el 5 y 10% de los pacientes desarrollan la etapa aguda sintomática.

A la inoculación de los tripomastigotes en la piel, la inflamación local produce un pequeño nódulo subcutáneo, acompañado de microadenitis regional, conocido como "chagoma de inoculación". Generalmente se presenta en la cara, aún cuando puede aparecer en otras partes del cuerpo, dependiendo del sitio de entrada del parásito.

Cuando los tripomastigotes penetran por la conjuntiva ocular, producen edema bpalpebral, hiperhemia conjuntival, escasa secreción conjuntival y adenopatía local, con inflamación de los ganglios linfáticos preauriculares; además es indoloro. Estos síntomas se conocen como "Signo de Romana-Mazza" o "complejo oftalmo-ganglionar".

Se suelen presentar complicaciones viscerales, sobre todo en niños, siendo los casos de mayor gravedad los registrados en quienes se infectan durante el primer año de vida. Estas complicaciones se caracterizan por fiebre, generalmente no mayor de 38 °C, hepatomegalia, plienomegalia, poliadenitis generalizada, diarrea, signos bronquiales, cardiomegalia y meningoencefalía.

Si se encuentra complicado el corazón se presenta miocarditis de in

tensidad variable, que puede ir de cardiomegalia ligera y sin alteraciones del ritmo cardiaco, hasta casos graves con gran cardiomegalia y alteración del Electro-Cardio-Grama, por bloqueo de las ramas de haz de His, e insuficiencia cardiaca.

La evolución de los enfermos aparentemente es benigna y en la mayoría de los casos curan en unos dos meses.

El período agudo dura entre 7 y 30 días, después de lo cual todo tiende a normalizarse, pero la infección queda latente y a largo plazo redundará en cardiopatías.

En el 10% de los pacientes que presentan manifestaciones clínicas de enfermedad aguda, se produce la muerte en pocos días.

Después de la infección aguda, la mayoría de los infectados pasan por un largo período de "latencia", sin manifestaciones clínicas. En esta etapa los parásitos se multiplican lentamente dentro de las células, y los que salen a circulación suelen ser destruidos. Los pacientes pueden durar así mucho tiempo, sin que haya curación espontánea. En autopsias de personas muertas accidentalmente durante este período, se han hallado focos de miocarditis y disminución de neuronas del plexo parasimpático en corazón y tubo digestivo (16).

Fase "crónica": Puede aparecer muchos años después (10, y a veces hasta 30) de la fase aguda, en la que pudo o no haber síntomas.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas está caracterizada por cardiomiopatías y los llamados mega-síndromes (megassófago y megacolon).

El corazón muestra una típica infiltración de células linfoides, asociada con degeneración miofibrilar y fibrosis.

De los datos más sobresalientes en esta fase crónica están:

Cardiomegalia, con insuficiencia cardiaca de predominio derecho; alteraciones del ECG, que indican bloqueo completo de las ramas del haz de His.

El corazón dilatado e hipertrofiado puede presentar, como consecuencia de trastornos de conducción, el aneurisma de punta.

Pueden existir zonas de trombosis, con el consecuente riesgo de embolias a distancia.

Los pacientes pueden estar virtualmente asintomáticos mucho tiempo, o bien se hace aparente con disnea, palpitaciones, dolor precordial e insuficiencia cardiaca, o presentarse muerte súbita sin grandes síntomas previos.

Tratamiento.

Hasta el momento no existe una droga ideal para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Una droga ideal debería tener capacidad de actuar exclusivamente sobre el parásito en la ubicación que se encuentre, sin causar reacciones secundarias.

Las principales drogas usadas han sido Nifurtimox y Benznidazol.

Ambas negativizan parasitemia y serología en prácticamente todos los casos de infección aguda, cuando el parásito circula principalmente en sangre (17).

Pero en casos crónicos, con el parásito latente en las células del huésped, los resultados no han sido satisfactorios.

Ambas drogas, usadas tiempo prolongado en pacientes con Xenodiagnóstico positivo, han negativizado: Benznidazol al 83%, y Nifurtimox al 100% de los casos, pero las reacciones secundarias son muy fuertes, incluyendo anorexia, pérdida de peso, gastritis, excitación, hepatitis medicamentosa, cefalea, intolerancia solar, urticaria con intenso prurito, edema de mucosas y amnesia.

Los mejores resultados se han obtenido más recientemente con tratamiento a base de Alopurinol, en dosis de 7-10 mg/Kg/día/60 días, en que se negativizaron el 100% de los Xenodiagnósticos, y los efectos secundarios son leves (fotofobia, ostealgia errática) y reversibles.

Por desgracia, el seguimiento de los casos se ha mantenido con un máximo de 3 años, por lo que no se asegura una cura total de la enfermedad hasta que pasen 10 años o más (18).

INMUNOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

Inmunidad Natural.

Está bien establecido que, como T.cruzi presenta una especificidad de huésped entre los mamíferos, deben existir diferencias entre las especies que las hagan diferentes o no.

Numerosos factores contribuyen a los variados grados de susceptibilidad al parásito: tipo de huésped, sexo, estado nutricional y endócrino, temperatura corporal, presencia de infecciones recurrentes, así como la cepa del parásito.

Los anfibios y las aves son refractarios a T.cruzi. El mecanismo de esta resistencia aparentemente depende de la capacidad del suero de estos animales para lisar las formas circulantes por medio del complemento (19).

En el humano se han encontrado anticuerpos "naturales", del tipo de las IgM, similares a las aglutininas naturales contra Leishmania y Toxoplasma (20).

Respuesta Inmune

Inmunidad Humoral

La infección por T.cruzi estimula una respuesta humoral específica por IgM primero y posteriormente por IgG.

El incremento de las gamma-globulinas séricas totales ocurre durante el tiempo en que los parásitos comienzan a decrecer en número en circulación, y el máximo nivel de gamma-globulinas coincide con la desaparición de los parásitos de la sangre y órganos.

En la fase aguda de la infección, se estimula principalmente la formación de gamma-globulinas del tipo IgM, alcanzando títulos máximos 3 semanas después de la infección (21).

Los títulos de IgM decrecen 6 a 7 semanas después de la infección, para volver a niveles normales a las 20 semanas.

De la misma manera, los títulos de IgG se incrementan entre las semanas 3 y 6, alcanzando títulos máximos 7 semanas después de la infección; las IgG disminuyen después de la 8a. semana, aunque mantienen niveles mayores que lo normal después de 20 semanas.

También hay un ligero aumento en la producción de IgA.

Los anticuerpos interactúan con el tripomastigote circulante y se unen a la superficie de la membrana del parásito, induciendo su lisis por medio del complemento (19).

Inmunidad Celular.

En la respuesta celular hacia T.cruzi actúan Linfocitos T y Linfocitos B, así como Macrófagos (15,19,21).

Se ha demostrado la efectividad de mecanismos citotóxicos en la destrucción de epimastigotes y tripomastigotes.

Los eventos inflamatorios inespecíficos producidos por el parásito inducen en los Monocitos sanguíneos una serie de funciones, las cuales incluyen rápida diseminación, incremento de hidrolasas en los lisosomas y cambios en las membranas plasmáticas; así mismo, eventos mediados por linfocinas influyen en el desarrollo de actividad microbicida (19).

Se ha demostrado que se adquiere una resistencia a T.cruzi, pero esta resistencia no es absoluta, pues bajos números de parásitos permanecen en el huésped, presumiblemente de por vida, aún después de haberse recuperado de una infección aguda (21).

Evasión de la Respuesta Inmune.

El parásito puede librarse de la acción de los anticuerpos - por medio del movimiento de los antígenos de membrana, los cuales - forman agregaciones múltiples ("patch") o sencillas ("cap"). Estas agregaciones son después liberadas, con lo que el parásito -- queda libre de anticuerpos. El "capping" representa el mecanismo de evasión a la respuesta inmune humeral (19).

En cuanto a los macrófagos, los epimastogotes son destruidos en las vacuolas fagocíticas, pero los tripomastigotes y las formas de transición escapan a la destrucción, probablemente debido a la - liberación de un factor que lisa la membrana del fagosoma.

Reacciones Auto-Inmunes.

En la fase crónica de la enfermedad, los daños al corazón y células neuronales son probablemente debido a mecanismos auto-inmunes, pues los parásitos tienen niveles tan bajos que no podrían -- destruir directamente el tejido (19).

Se han demostrado Linfocitos-T autoinmunes que ejercen una función aberrante, debido a antígenos comunes que podrían estar presentes - entre el parásito y células del hospedero (15).

Otra explicación sugiere que antígenos liberados por las células -- destruidas se unen a células vecinas, y la respuesta del huésped -- ejerce la reacción autoinmune que destruye células normales (19).

La infección por T.cruzi induce también la formación de anti- cuerpos capaces de reaccionar con los tejidos del huésped; estos anti- cuerpos se combinan con endocardio, endotelios vasculares y mem- branas plasmáticas de músculo cardiaco y esquelético, y neuronas.

Estos anticuerpos son probablemente la expresión de la reac- ción de antígenos cruzados entre T.cruzi y algunos tejidos de los - vertebrados (19).

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El laboratorio tiene gran importancia en el diagnóstico de la infección chagásica, pues si bien se observan circunstancialmente cuadros clínicos (agudo y crónico), la mayoría de los mismos no son patognómicos ni patrimonio exclusivo de la enfermedad y, además, gran parte de los infectados no presentan lesiones viscerales demostrables.

Los métodos de diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas se pueden clasificar en:

A.- Parasitológicos.

Capaces de demostrar la presencia del parásito en el torrente sanguíneo. Estos métodos son de elección en la etapa inicial de la enfermedad (aguda), donde la parasitemia es constante y elevada. Se utilizan también en la investigación de enfermedad congénita. Los métodos parasitológicos a su vez se subdividen en:

- 1.- directos: examen en fresco, gota gruesa, método de Strout.
- 2.- Indirectos: Xenodiagnóstico, hemocultivo, inoculación en animales sensibles.

B.- Inmunodiagnósticos.

Se utilizan para demostrar la existencia de anticuerpos específicos contra T.cruzi. Estos métodos son de elección en la etapa crónica de la enfermedad.

A.- Métodos Parasitológicos.

Examen en fresco.- Es el procedimiento más utilizado, por su simplicidad, con buena sensibilidad en la fase inicial (50-80 %) de la enfermedad.

Gota gruesa.- Es una técnica un poco más sensible que el examen en fresco. Una gota de sangre, voluminosa, se deja secar sobre un portaobjetos bien limpio, sin fijación previa. Luego se tiñe por Wright o Giemsa y se observa al microscopio.

Método de Strout.- Este método alcanza el 95% de positividad en casos agudos. Consiste en extraer sangre por punción venosa y dejarla coagular. Inmediatamente después de la retracción del coágulo este se descarta y se centrifuga el suero. El sobrenadante se centrifuga nuevamente a alta velocidad y se examina al microscopio una gota del sedimento obtenido.

Xenodiagnóstico.- El método consiste fundamentalmente en el empleo de los insectos vectores de la enfermedad, los que se alimentan sobre los pacientes sospechosos de enfermedad.

Luego de un cierto tiempo (15, 30, 45, 60 días), se examina el contenido intestinal de los insectos en busca del parásito. Esto es posible ya que el T. cruzi completa su ciclo biológico, multiplicándose en el tubo digestivo de los triatomíneos, donde indiscutiblemente se dan las mejores condiciones naturales para el desarrollo del parásito.

Se deben utilizar no menos de 40 triatomíneos, distribuidos en dos cajas, para su aplicación en la cara ventral del antebrazo. Los insectos deben haber sido criados en el laboratorio, siendo alimentados con sangre de ave, y ayuno previo de dos semanas antes de su utilización en la prueba.

La realización consiste en dejar que los insectos se alimenten con la sangre del paciente durante 20-30 minutos. Después las cajas se retiran y se dejan en lugar oscuro, a temperatura entre 25 y 30° C. El examen de los insectos se hará luego de 10-30 días en pacientes agudos y luego de 30-60 días en los pacientes crónicos debiendo comprobarse a los 45 y 60 días.

Se suele comprimir el abdomen de los insectos y obtener una gota de heces sobre solución salina, para examen en microscopio con 40X.

El Xenodiagnóstico es el método más sensible para el reconocimiento de la enfermedad en la fase aguda, con un 95-100% de sensibilidad, aventajando a todos los demás métodos directos e indirectos (22).

En la etapa crónica solo permite detectar el 50% de los infectados, lo que hace necesaria su reiteración (Xenodiagnóstico sucesivo) a fin de aumentar su sensibilidad.

Hemocultivo.- Es una técnica más sencilla que el Xenodiagnóstico.

La sensibilidad en los casos agudos y congénitos se superpone a la del Xenodiagnóstico. En casos crónicos tiene una sensibilidad del 55%. Los medios de cultivo más utilizados son el NNN, trip-tosa, LIT.

Inoculación en animales.- Se usa preferentemente en casos agudos y trabajos experimentales (aislamiento de cepas). Se emplean ratones albinos jóvenes, e hámsters.

B.- Métodos Inmunodiagnósticos.

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos, generalmente formados cuando el parásito se introduce y multiplica en el organismo humano.

Trypanosoma cruzi puede ser considerado como uno de los protozoarios antigénicamente más ricos (15). Una infección determina, en el hospedero, la aparición de varios tipos de anticuerpos.

Las reacciones serológicas para la demostración de anticuerpos frente a T. cruzi son bastante específicas, y no se observan regularmente reacciones cruzadas o de otra naturaleza, con excepción de los casos de Leishmaniasis o de otras Tripanosomiasis (T. gambiense y T. rhodesiense).

Las pruebas inmunológicas tienen su indicación en la fase crónica de la enfermedad.

El inmunodiagnóstico de precisión debe basarse como mínimo en el resultado de dos reacciones serológicas practicadas simultáneamente; de esa manera se puede efectuar el diagnóstico de infección chagásica con una precisión superior al 95%.

Fijación de Complemento.- La reacción de Guerreiro y Machado presenta alta sensibilidad para el diagnóstico de casos crónicos y elevada especificidad, cuando se utilizan antígenos adecuados, llegando a detectar un 93.4% de los casos (23).

Sin embargo la complejidad de la técnica y la imposibilidad de utilización de antígenos estandarizados para el diagnóstico de rutina, contribuyen a modificar la sensibilidad de la reacción. Se observan así resultados negativos en la fase inicial de la enfermedad, y menor sensibilidad que las reacciones de IPI y HAI en la fase crónica (24).

Aglutinación Directa.- Es una técnica simple y rápida, recomendada en la fase aguda para detectar IGM, indicadores de infección reciente (20).

En la fase crónica tiene una sensibilidad casi tan grande como la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta, alcanzando el 98.4% de sensibilidad (25), superando a la reacción de Hemaglutinación Indirecta (23).

Inmunofluorescencia Indirecta.- Es la reacción inmunodiagnóstica más sensible y específica para la detección de la enfermedad de Chagas. Se vuelve positiva en la mayoría de los casos 3 o 4 semanas antes que las otras reacciones, permitiendo así la caracterización de la fase inicial de la infección y de transmisión congénita a través de la búsqueda de IGM (26).

En la fase crónica es la más específica, mediante la búsqueda de IGM totales (20).

Hemaglutinación Indirecta.- Es una de las más usadas, por la facilidad de su realización, una vez estandarizado el antígeno. Presenta una sensibilidad del 98.2%, mayor que la Fijación de Complemento, pero menor que las pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta y Aglutinación Directa (23).

II A N T E C E D E N T E S

Posteriormente al descubrimiento de la enfermedad por Carlos Chagas, en Brasil en 1909, se diagnosticó por Miller en 1913 en El Salvador; a partir de 1919 en Venezuela y Perú, y en 1931 en Panamá y demás países Sud-Americanos.

En México, los dos primeros casos autóctonos se reportaron en la población de Teojomulco, Oaxaca, en 1940 (27); los dos segundos en Yucatán (28) en 1949, y el quinto caso en Tutuapan, estado de México, en 1958 (29).

No se conocen con exactitud las cifras de enfermos ni de expuestos a riesgo, sin embargo se han realizado estudios y/o reportado casos humanos en los estados de: Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, edo. de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (5,10,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40). La ausencia de la parasitosis en otras entidades se debe a la falta de estudios.

Para el estado de Tabasco, se han reportado solo dos casos agudos de la enfermedad: uno, un paciente de 65 años, determinado accidentalmente mientras se buscaban parásitos del paludismo (41), y el segundo un infante de 14 meses que presentaba insuficiencia cardíaca congestiva, llevado a la Cd. de México (42).

Hasta la fecha no existe ningún estudio, para el edo. de Tabasco, que indique la existencia de la enfermedad como endemia entre sus habitantes, por lo que el presente trabajo pretende ser el primero.

Del transmisor, se reporta Triatoma dicidrata maculipennis (6,43).

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según cálculos de la OMS-OPS (44), se estimó que en 1980 al menos 24 millones de personas sufrían la enfermedad, y 64 millones estaban en riesgo de contraerla.

En México, en contraste con lo esperado, llama la atención la escasez de informes sobre este padecimiento, a pesar de la similitud ecológica y socioeconómica con los países donde constituye problema de salud pública, de la presencia de millones de individuos susceptibles que viven en condiciones favorables para el desarrollo de este mal, y de la presencia de los vectores.

Considerando que el estado de Tabasco cuenta, en sus zonas rurales, con las condiciones ecológicas, geográficas, económicas y sanitarias favorables para el desarrollo de la enfermedad, es admisible plantearse las siguientes interrogantes:

- 1.- ¿Existe la enfermedad de Chagas, como endemia, en zonas rurales del estado?
- 2.- ¿Qué especies de vectores se encuentran?
- 3.- ¿Están infectados con Trypanosoma cruzi los vectores presentes?
- 4.- ¿Cuáles son los factores favorables para el desarrollo de la enfermedad en la localidad?

IV JUSTIFICACION

El informe de dos casos humanos comprobados (41,42), en individuos provenientes del estado de Tabasco, dá lugar al inicio del presente estudio seroepidemiológico.

Los resultados de un estudio de este tipo son relevantes para una población de alto riesgo, donde los servicios médicos desconocen el serio problema de salud que produce esta enfermedad en el medio rural.

El conocimiento de la enfermedad de Chagas en el estado de Tabasco coadyuvará a la motivación y necesidad de implementar un programa de control a nivel estatal, pues es necesario que las autoridades de Salud vean la enfermedad como problema de salud pública.

Considerando que cualquiera zona del medio rural del estado de Tabasco, en general, puede ser endémica para la enfermedad, se ha escogido, en particular, el área de influencia del Hospital Rural Regional de Benito Juárez, municipio de Macuspana, Tabasco, para llevar a cabo un estudio Sero-Epidemiológico de la enfermedad de Chagas, y ser utilizada la información recabada en la elaboración de esta Tesis Profesional.

V OBJETIVOS

- 1.- Determinar la prevalencia de la enfermedad de Chagas en individuos del medio rural del área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco; por la presencia de anticuerpo contra Trypanosoma cruzi, medidos a través de las técnicas inmunológicas de:
Hemaglutinación Indirecta (HAI).
Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).
- 2.- Conocer, mediante la aplicación de encuesta, los factores de vivienda y demográficos que favorecen la transmisión de la enfermedad en los individuos estudiados.
- 3.- Clasificación taxonómica de las especies del artrópodo transmisor que se encuentren, así como la determinación de su grado de infección.
- 4.- Contribuir al conocimiento de la Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el Estado.

VI MATERIAL Y METODOS

Area de Trabajo.

El Estado de Tabasco se encuentra situado en la parte Sur Oriental de la República Mexicana, entre los $17^{\circ}15'$ y $18^{\circ}39'$ de Latitud Norte, y entre los $90^{\circ}59'$ y $94^{\circ}08'$ de Longitud Oeste. Limita al Norte con el Golfo de México, al Sur con Chiapas, al Oeste con Veracruz, al Noreste con Campeche y al Sureste con Guatemala.

Tiene una superficie de $24\ 661\ \text{Km}^2$, correspondientes al 1.3% del territorio nacional, y está dividido en 17 municipios, con una población total de 1 062 961 habitantes, según el censo de 1980 (45).

El clima es tropical-lluvioso, con temperatura cálido-húmeda que va de los $16\ ^{\circ}\text{C}$ a los $40.5\ ^{\circ}\text{C}$, con una media de $25.5\ ^{\circ}\text{C}$.

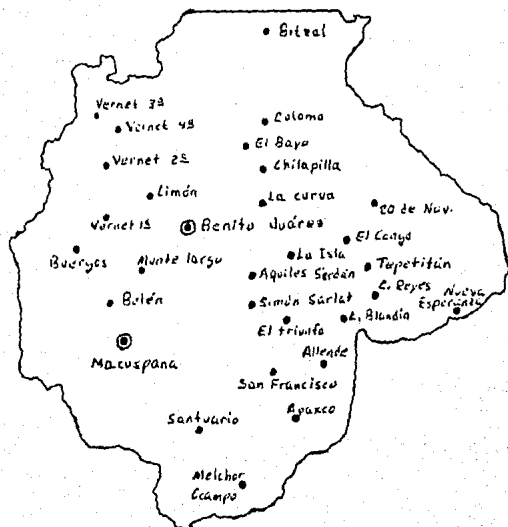
La altura promedio sobre el nivel del mar es de 30 m; y las mayores elevaciones, al sur del estado, no alcanzan los 1000 m.

El municipio de Macuspana se localiza en la región centro oriental del estado; entre los $17^{\circ}32'$ y $18^{\circ}06'$ de Latitud Norte y los $92^{\circ}08'$ y $92^{\circ}40'$ de Longitud Oeste.

Abarca una superficie de $2067.44\ \text{Km}^2$ (8.38% del estado), y su población es de 84 287 habitantes, según el censo de 1980.

LOCALIZACION GEOGRAFICA DEL ESTUDIO

Localidades de proveniencia de los individuos estudiados



1.- Plan de Trabajo.

Se realizó un estudio en población rural.

Se siguió la indicación de la OMS con respecto al tamaño de muestra para estudios en población rural (46).

El estudio se llevó a cabo en 296 individuos mayores de 5 años, de ambos sexos, provenientes de 28 comunidades rurales y rancherías en el área de influencia del Hospital Rural Regional de Benito Juárez, municipio de Macuspana, Tabasco; llegados al servicio de consulta externa de medicina general del mencionado hospital.

A cada individuo seleccionado se le aplicó encuesta epidemiológica, recabándose información referente a nombre, edad, sexo, condiciones de vivienda, conocimiento del insecto, antecedentes de picadura, así como se investigó la presencia de transmisores, animales domésticos y para-domésticos.

De igual manera, a cada individuo se le tomaron 3 cc. de sangre por venopunción, recolectándose en tubos de ensayo y separando se el suero, que fué mantenido en refrigeración hasta el momento de su procesamiento.

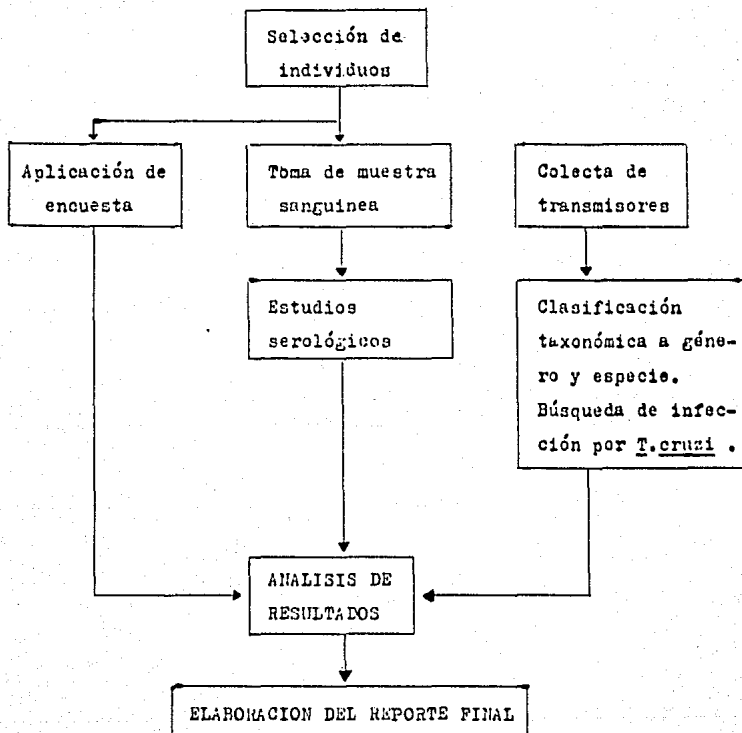
Los especímenes hematológicos fueron trasladados al Departamento de Parasitología del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales S.S.P. (I.S.E.T.), en la Cd. de México, y procesados conforme las técnicas diagnósticas de Hemaglutinación Indirecta y de Inmunofluorescencia Indirecta. Se utilizó antígeno de referencia dotado por el Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario

Patala Chabén", Buenos Aires, Argentina.

Se capturaron insectos vectores acudiendo a viviendas de la zona, utilizando insecticida excitatorio para promover la salida del insecto; así como se les pidió a los habitantes, previa muestra de ejemplares, que los capturaran y enviaran al Hospital Regional de Benito Juárez, Macuspana.

La búsqueda de T. cruzi en las heces del vector, así como la clasificación de especie, se efectuó en el Laboratorio del mencionado hospital, con posterior certificación en el Laboratorio de Entomología del I.S.E.T.

ESQUEMA DE TRABAJO



DEFINICION DE VARIABLES

Seropositividad: Presencia de anticuerpos séricos anti-T.cruzi, con títulos iguales o mayores a 1:16 según la técnica de Hemaglutinación Indirecta (HAI), y/o 1:30 según la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

Seronegatividad: Ausencia de anticuerpos séricos anti-T.cruzi titulables por las técnicas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta.

Caso: Todo individuo que posea títulos de anticuerpos séricos anti-T.cruzi iguales o mayores a 1:16 según la técnica de Hemaglutinación Indirecta y/o 1:30 según la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, presentando o no manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Vivienda Precaria: Vivienda con paredes de adobe, caña, lámina o cartón y techo de material vegetal o lámina.

Vivienda Regular: Vivienda con paredes de adobe o tabique, con techo de teja.

Vivienda Adecuada: Vivienda con paredes de tabique y techo de colado.

2.- Procesamiento de la Muestra.

a) Técnicas de Diagnóstico.

Hemaglutinación Indirecta (HAI): La reacción de Hemaglutinación - Indirecta está basada en los trabajos de Boyden (47), en -- que se modifica la membrana de los eritrocitos por medio de ácido tánico. Los glóbulos rojos así tratados se comportan como partículas inertes capaces de adsorber los antígenos parasitarios.

En la segunda parte de la prueba, los hematíes sensibilizados aglutinan en presencia de anticuerpos séricos específicos contra el antígeno.

Desarrollo de la prueba (48):

- Equipo: - Micropipeta calibrada de 10-100 μ l.
 - Placas de microtitulación con fondo en "U".

Material Biológico:

- Sueros problema
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Antígeno de T. cruzi
- Solución Amortiguadora de Fosfatos pH 7.2 (PBS 7.2)

Técnica:

- 1.- A todas las excavaciones con fondo de "U" de la placa de titulación agregar 25 μ l (0.025 ml) de PBS 7.2 .

2.- Agregar, con la micropipeta, 25 μ l de suero problema al primer pocillo de la placa, mezclar completamente evitando la formación de burbujas, y transferir 25 μ l de la mezcla al siguiente, y así sucesivamente hasta obtener la dilución requerida, descartándose los últimos 25 μ l.

De esta manera, las diluciones que se encuentran en los pocillos corresponden a 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

Los sueros control positivo y negativo se diluyen de la misma forma.

3.- A cada dilución de los sueros problema y controles agregar 25 μ l de antígeno de T. cruzi .

4.- Agitar con movimientos circulares suaves por 30 segundos.

5.- Dejar reposar la placa, a temperatura ambiente, por 30 minutos, Hacer la lectura transcurrido ese tiempo.

Lectura:

La reactividad del suero se manifiesta por la formación de un manto que cubre el fondo del pocillo de la placa de lectura.

La falta de reactividad se manifiesta por la sedimentación del antígeno en forma de botón o pequeños anillos de bordes regulares.

Se debe realizar la lectura transcurrido exactamente el tiempo necesario.

Una lectura antes de tiempo puede mostrar como positivas aquellas reacciones que sean realmente negativas, pero que no han tenido tiempo de sedimentar todavía.

Una lectura demasiado tiempo después puede mostrar como falsas negativas aquellas reacciones que sean realmente positivas pero la película de aglutinación sedimentó una vez transcurrido el tiempo de reacción.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): El principio del método del anticuerpo fluorescente consiste en la unión del anticuerpo presente en el suero con el antígeno de superficie del parásito.

Posteriormente, el complejo antígeno-anticuerpo es sometido a la acción de anti-gammaglobulina humana marcada con Isotiocianato de Fluoresceína, los cuales reaccionan con el ac. unido al antígeno parasitario y demuestran fluorescencia -- (luz amarillo-verdosa brillante) en la periferia del parásito, observable mediante el uso de un microscopio adaptado -- con lámpara de luz ultravioleta y filtros adecuados.

Desarrollo de la prueba (49):

Equipo: - Microscopio para fluorescencia

- Incubadora a 37 °C
- Micropipeta de 10-100 µl
- Portaobjetos de 2.5x7.5, marcados con 12 campos
- Tubos de ensayo de 12x75
- Cámara húmeda
- papel filtro
- papel aluminio
- Jarras de Coplin

Reactivos:

- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS).
- Anti-gammaglobulina humana, marcada con Isotiocianato de Fluoresceína (Conjugado).
- Azul de Evans
- Glicerina bidestilada neutra al 90% en PBS.

Material Biológico:

- Sueros problema
- Sueros control positivo
- Sueros control negativo
- Antígeno de T.cruzi

Técnica:

- 1.- Diluir la suspensión antigénica en PBS 7.2 hasta que la concentración de Trypanosoma muestre de 10 a 15 parásitos por campo microscópico de 400 aumentos.

Colecar en los portaobjetos, perfectamente limpios y desengrasados, 25 μ l de dicha suspensión en cada una de las divisiones marcadas. Distribuir por toda la superficie.

Secar con aire caliente y fijar a la llama, flameando suavemente.

lavar los portaobjetos con agua destilada y secar con aire frío.

- 2.- Preparar diluciones 1:30 y 1:60 de cada uno de los sueros -- problema y de control, de la siguiente manera:

En un tubo de ensayo se colocan 87 μ l de PBS 7.2 y se le añaden 3 μ l del suero a diluir. Se mezcla perfectamente y con esto la dilución es de 1:30.

Se toman 40 μ l de la mezcla anterior y se pasan a otro tubo -- que contenga previamente 40 μ l de PBS 7.2; en este segundo tubo la dilución que se alcanza es 1:60 .

- 3.- De cada una de las diluciones del suero problema, colocar - 25 μ l en una división del portaobjetos con el preparado antigénico.
Hacer lo mismo para los sueros control y para un control de fluorescencia inespecífica, que consiste en una gota de PBS.
- 4.- Incubar los portaobjetos así tratados en cámara húmeda cubierta con papel de aluminio, durante 30 minutos en estufa a 37 °C.
- 5.- Lavar los portaobjetos en una Jarra de Coplin llena de PBS, por dos veces, durante 5 minutos.
- 6.- Secar los preparados con papel filtro y corriente de aire frío.
- 7.- Cubrir los preparados con el Conjugado, diluido según el título adecuado, y el Azul de Evans, también diluido al título adecuado, con una cantidad de 25 μ l.
- 8.- Incubar nuevamente en cámara húmeda en estufa a 37 °C, por 30 minutos.
- 9.- Lavar de igual manera a la anterior y secar con papel filtro y corriente de aire frío.
- 10.- Colocar una gota de líquido de montaje y cubreobjetos.
- 11.- Leer en Microscopio de fluorescencia.

Lectura:

Proceder a la lectura de los controles previamente a la de los sueros problema.

- a) **control positivo:** El suero control positivo debe presentar los parásitos con fluorescencia amarillo-verdosa brillante. La fluorescencia es particularmente intensa en la membrana y flagelo del parásito.
- b) **control negativo:** Al microscopio los parásitos deberán presentar una coloración rojiza sobre fondo oscuro, y no mostrar fluorescencia.
- c) **control de fluorescencia inespecífica:** Está constituido por una gota de PBS incubada con suspensión antigénica. Los parásitos se observan rojizos y no mostrarán fluorescencia.

b) Criterios de Lectura.

Hemaglutinación Indirecta: Se consideraron imágenes positivas - aquellas en las que el manto o película formada cubrió el fondo del pocillo por lo menos en un 50% del mismo y presentó bordes irregulares, con una dilución del suero igual o mayor a 1:16, considerándose como reacción inespecífica las diluciones menores.

Inmunofluorescencia Indirecta: Se consideró positiva toda muestra que, a una dilución igual o mayor a 1:30, presentó -- fluorescencia verde-amarillenta en toda la periferia del parásito.

Se consideró negativa toda muestra en que se observó los organismos rojo-púrpura, o con fluorescencia sólo en los polos, sin extenderse a todo el parásito.

Los títulos diagnósticos fueron estandarizados por el Departamento de Parasitología del Institute de Salubridad y Enfermedades - Tropicales, México, D.F., en base a un estudio comparativo entre cardiopatas comprobados parasitológicamente y un grupo de individuos sanos provenientes de una zona libre de infección Chagásica del Distrito Federal (50).

c) Preparación del Antígeno1.- Cultivo de las formas epimastigotes de Trypanosoma cruzi.

- Medio bifásico para mantenimiento de cepa:

Medio NNN (Navy-Nicole-mcNeal)

Consta de una fase sólida y una líquida, las cuales se mezclan en el momento de cultivo.

Fase sólida		Fase líquida (Ringer)	
Agar	16g	NaCl	8g
NaCl	8g	Na ₂ HCO ₃	0.2g
Agua dest.	900 ml	KCl	0.2g
Sangre	100 ml	CaCl ₂	0.2g
		Agua dest.	cbp 1000ml

La sangre se agrega después de preparado y esterilizado el agar, dejándolo enfriar a una temp. de 45 °C antes de añadir la.

- Medio monofásico para semilla de antígeno.

Triptesa	25g
Extr. levadura	10g
Glucosa	5g
Na ₂ HPO ₄	10g
NaCl	4g
KCl	0.4g
Agua dest.	cbp 1000ml
Hemina	10ml

2.- Antígeno de Hemaglutinación Indirecta.

El antígeno está constituido por un lisado crudo total de T. cruzi, preparado según el siguiente procedimiento:

- 1) Recoger la masa de tripanosomas filtrando el medio de cultivo por aspiración a través de gasa.
- 2) Centrifugar a 5000 rpm por 15 minutos.
- 3) Lavar el sedimento constituido por los parásitos con solución salina isotónica 5 veces, centrifugando cada vez a 5000 rpm.
- 4) Suspender la masa húmeda así lavada en una solución de Tio-glicolato de sodio al 1:1000 para formar una suspensión 1:20.
- 5) Lisar en Homogenizador de tejidos a 20000 rpm durante 10 minutos.
- 6) Centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos.
- 7) Decantar. El sobrenadante constituye el antígeno.
- 8) Agregar azida sódica como conservador, en una concentración de 1:10000.

Tanado de los glóbulos rojos.

- 1) Preparar una suspensión de glóbulos rojos (Grupo O) lavados, al 20% en PBS 7.2 .
- 2) Agregar 2 volúmenes de ácido tánico 1:20000.
- 3) Incubar en baño María a 37 °C por 15 minutos.
- 4) Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
- 5) Decantar el sobrenadante.

Sensibilización de los glóbulos rojos con el antígeno.

- 1) Preparar una suspensión al 10% en PBS 7.2 de los hematíes tanados.
- 2) Agregar antígeno según título.
- 3) Incubar a 37 °C durante 30 minutos.
- 4) Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm decantando el sobrenadante.
- 5) Lavar por centrifugación con dos volúmenes de suero normal de conejo al 1% en PBS 7.2 .
- 6) Llevar los glóbulos rojos sensibilizados a una concentración final del 5% con suero normal de conejo (1% en PBS).

La solución última es la que se utiliza como antígeno para la reacción de Hemaglutinación Indirecta.

3.- Antígeno de Inmunofluorescencia Indirecta.

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

- 1) Obtener los parásitos de cultivo, filtrando por capa fina de algodón.
- 2) Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm.
- 3) Decantar y lavar el sedimento dos veces con PBS 7.2, y repetir la centrifugación.
- 4) Después del último lavado, suspender en solución salina isotónica con formol al 1% ; agregarlo lentamente y agitar bien para homogenizar.
- 5) Dejar a temperatura ambiente durante 24 horas, agitando constantemente.
- 6) Diluir la suspensión antigénica en PBS 7.2 hasta que la concentración de tripanosomas muestre de 10 a 15 parásitos por campo microscópico de 400 aumentos.

d) Reactivos**-Buffer Salino de Fosfatos (PBS) pH 7.2**

Na ₂ HPO ₄	21.3g	KH ₂ PO ₄	20.4g	NaCl	8.8g
Agua dest.	1000ml	Agua dest.	1000ml	Agua dest.	1000ml

Mezclar las siguientes cantidades de cada una de las soluciones anteriores:

Soln. de KH ₂ PO ₄	24ml
Soln. de Na ₂ HPO ₄	76ml
Soln. de NaCl	100ml

Mezclar completamente.

-Solución de Acido Tánico

ácido tánico	10mg
PBS 7.2	10ml

La solución está diluida 1:1000

Diluir la 20 veces para preparar la solución 1:20000 usada en la prueba.

-Solución anticoagulante

Citrato de sodio	3.8g
Agua destilada	100ml

Esterilizar en autoclave a 15 lbs. per 15 minutos.

-Solución salina isotónica

NaCl	0.85g
Agua dest.	100ml

Esterilizar en autoclave a 15 lbs. per 15 minutos.

VII RESULTADOS

De los 296 suero investigados (cuadro I), 94 (32%) de ellos pertenecieron a varones y 202 (68%) a mujeres.

Un total de 34 sueros (11.48%) resultaron positivos, y se encontraron proporciones específicas de seropositividad de 7.4% y 13.4% para varones y mujeres respectivamente.

Las proporciones de positividad para grupos de edad variaron entre 5.5% y 16.6% .

Cuadro I

Resultados por edad y sexo de las pruebas serológicas de 296 individuos. Encuesta sobre la Enfermedad de Chagas; área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

Edad (años)	No.	<u>posit.</u> <u>invest.</u>	% de posit.	<u>posit.</u> <u>invest.</u>	% de posit.	<u>posit.</u> <u>invest.</u>	% de posit.
5-9	10	1/4	25	0/6	0	1/10	10
10-14	18	1/8	12.5	0/10	0	1/18	5.5
15-24	84	0/23	0	9/61	14.7	9/84	10.7
25-44	111	2/32	6.2	15/79	19	17/111	15.3
45-64	61	2/20	10	2/41	4.9	4/61	6.6
_ 65	12	1/7	14.3	1/5	20	2/12	16.6
Total	296	7/94	7.4	27/202	13.4	34/296	11.48

El 50% de las viviendas de los encuestados fueron consideradas de construcción precaria, el 35.7% de construcción regular y apenas el 14.2% de las viviendas se consideraron adecuadas (Figura # I).

En la Figura II se muestra el número de habitantes por vivienda, que resultó con una media de 6 habitantes/vivienda.

El promedio de habitaciones por vivienda fué de 2 (Figura # III).

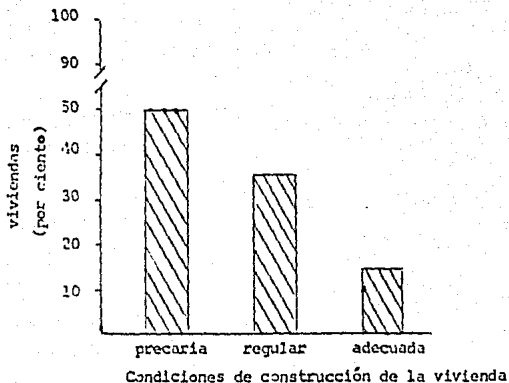


Figura I. Clasificación de la vivienda
Encuesta sobre la Enfermedad de Chagas;
área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

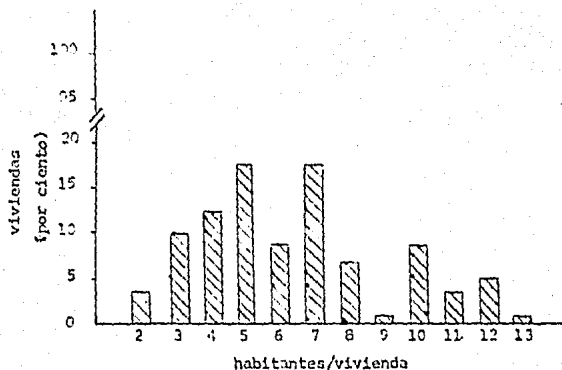


Figura II. Distribución de habitantes por vivienda. Encuesta sobre la Enfermedad de Chagas; área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

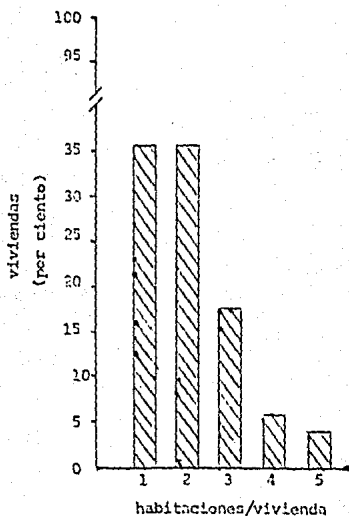


Figura III. Distribución de habitaciones por vivienda. Encuesta sobre la Enfermedad de Chagas; área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

Otros resultados obtenidos en la encuesta mostraron que el 70% de las familias tienen animales domésticos que pueden actuar como reservorios. Además, el 44% de los encuestados manifestaron conocer la crinche transmisora de la enfermedad, y el 6% reportaron haber sido picados por ella.

Se encontraron dos especies del insecto vector, ambas pertenecientes al género *Triatoma*: *Triatoma dimidiata maculipennis* y *Triatoma pallidipennis*.

De un total de 30 triatominos colectados, 13 se encontraron vivos y se examinaron, resultando infectados 12 de ellos, lo que muestra un índice de infección de 92% (Cuadro II).

Cuadro II
Triatominos colectados. Encuesta sobre la enfermedad de Chagas; área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

localidad	especie	número	infectados
Villa Benito Juárez	<u><i>T. dimidiata</i></u>	13	¿?*
		1	+
	<u><i>T. pallidipennis</i></u>	2	+
		1	-
		1	¿?
El Bayo	<u><i>T. dimidiata</i></u>	2	+
Bayona	<u><i>T. dimidiata</i></u>	2	¿?
San Francisco	<u><i>T. dimidiata</i></u>	7	+
El Mange	<u><i>T. dimidiata</i></u>	1	¿?
Total		30	12

* Los marcados "¿?" no se pudieron examinar, por haberse colectado muertos.

Los títulos alcanzados por los sueros fueron los siguientes:

Por la prueba de Hemaglutinación Indirecta (HAI), 264 sueros (89.2%) tuvieron títulos menores a 1:16; otros 22 (7.4%) presentaron títulos iguales a 1:16; se encontraron con un título de 1:32 un total de 3 sueros (1%) y solamente 2 (0.7%) alcanzaron título de 1:128.

Por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), 264 (98.2%) de los sueros presentaron títulos menores de 1:30; 21 (7%) tuvieron título igual a 1:30, y 9 (3.7%) alcanzaron título de 1:60 (Figura IV).

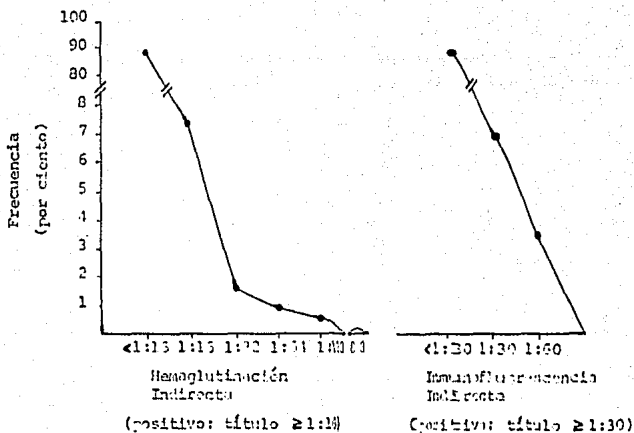


Figura IV. Curvas de distribución de la frecuencia de los títulos por Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta, de 296 sueros. Encuesta sobre la enfermedad de Chagas; área de Bannito Juárez, Macuspana, Tab.

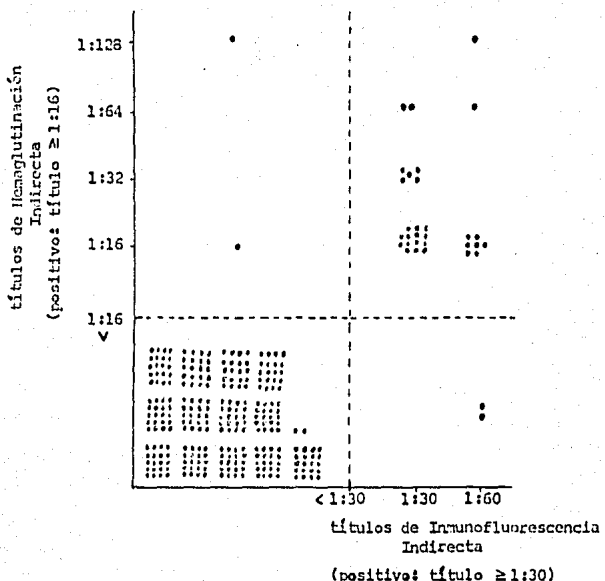


Figura V. Correlación de los títulos de Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta de 296 sueros. Encuesta sobre la enfermedad de Chagas; área de Benito Juárez, Macuspana, Tabasco.

Como se muestra en la Figura V, resultaron positivos por Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta 30 sueros, y negativos 262 por ambas pruebas; de esta manera las pruebas concordaron en un 98.6% .

De los sueros restantes, dos resultaron positivos por Hemaglutinación Indirecta y negativos por Inmunofluorescencia Indirecta, y otros dos resultaron positivos por Inmunofluorescencia Indirecta y negativos por Hemaglutinación Indirecta.

VIII DISCUSION

El estudio seroepidemiológico realizado permitió identificar una región endémica para la infección humana por Trypanosoma cruzi en el municipio de Macuspana, Tab., encontrándose una proporción de seropositividad de 11.48% en 296 individuos que acudieron a consulta general al Hospital Regional Benito Juárez, provenientes de 28 comunidades rurales del municipio.

La tasa de seropositividad encontrada no es, en modo alguno, representativa del Estado, pues haría falta un estudio completo de la distribución geográfica de la infección, dada la similitud de condiciones favorables para el desarrollo de la infección que se encuentran en el Estado.

Comparativamente con otros estudios realizados en el país (5,30,51), el resultado aquí obtenido muestra uno de los índices más bajos de infección, además de que en otros casos donde se reportan prevalencias menores (30,51) los resultados pueden estar minimizados, al exigirse un título serológico muy elevado (1:128) para considerar los casos positivos.

No se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de seropositividad con respecto a varones y mujeres, ni en las referentes a grupos de edad, es decir, no presentaron relación con la frecuencia de infección por T. cruzi, característica aceptada por los expertos en este padecimiento (14).

Es importante observar que un porcentaje muy grande (76%) de los infectados se encuentran en una edad productiva (15-44 años) y que, de desarrollar las alteraciones que corresponden a la fase -- crónica de la enfermedad, repercutiría notablemente en su actividad y consecuentemente en la economía familiar.

Con respecto a las condiciones que favorecen la presencia de la infección, se encontró que un 50% de las viviendas de los encuestados pertenecen a la categoría de "precaria", y un 36% a la categoría de "regular", conjuntando un elevado número de viviendas con características de construcción que permiten el establecimiento de los insectos transmisores.

Si a este unimos las condiciones de hacinamiento (promedio de 6 habitantes y 2 habitaciones por vivienda), el factor de riesgo de -- contraer la infección aumenta considerablemente.

Hay además una estrecha convivencia entre las personas y el insecto vector, como lo demuestra el dato de que el 44% de los encuestados manifiestan conocer la "chinche", y todos los triatomíneos colectados se encontraron en estructuras relacionadas con la vivienda humana.

Es de hacer notar que el 92% de los triatomíneos examinados estaban infectados con flagelados morfológicamente similares a Trypanosoma cruzi, lo cual es un índice muy elevado de infección, aunque en -- otras zonas del país se han reportado de 34% hasta el 100% de triatomíneos infectados (32,52).

En contraste con las condiciones muy favorables para la transmisión elevada de la enfermedad, la curva unimodular (Fig. IV) derivada de los datos de los títulos alcanzados por la muestra y sus

frecuencias, es característica de las curvas serológicas de una región con poca transmisión de la enfermedad (30), aunque se comprobó que la infección Chagásica se sigue transmitiendo en la región, por el hallazgo de positividad en un niño de 5 años (cuya madre no se detectó infectada, lo que permite suponer que no hubo transmisión congénita).

En las encuestas serológicas de la enfermedad de Chagas se requieren por lo menos dos pruebas para descubrir la mayor parte de las personas infectadas.

Si tomamos en cuenta que la reacción de IFI es la prueba más sensible de uso común para el diagnóstico de la enfermedad (48), y que la concordancia de resultados entre IFI y HAI en el presente trabajo fué de 98%, mayor que la concordancia de resultados entre otras pruebas (51), entonces es recomendable el uso de estas dos pruebas para un diagnóstico más preciso de la enfermedad.

IX CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio seroepidemiológico, permiten concluir lo siguiente:

- 1.- Las localidades rurales en el área de Benito Juárez, Macunapa, Tabasco; forman una región endémica para la enfermedad de Chagas.
- 2.- La prevalencia de anticuerpos hacia Trypanosoma cruzi es de 11.48%, lo que indica que la infección está presente, y probablemente la enfermedad en alguna de sus fases.
- 3.- Las deficientes condiciones de vivienda y el hacinamiento elevado presente en ellas son factores que promueven la transmisión de la infección Chagásica.
- 4.- Se encuentran por lo menos dos especies del vector, responsables de la transmisión en el área, a saber: Triatoma dimidiata maculipennis y Triatoma pallidipennis, presentando un alto grado de infección por T. cruzi.
- 5.- La presencia de la enfermedad de Chagas, con los factores inutilizantes que conlleva para quien la padece, puede ser un condicionante para el óptimo desarrollo económico de los individuos de esta área.

A N E X O

FORMATO DE ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA UTILIZADA
EN EL ESTUDIO SOBRE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS;
AREA DE BENITO JUAREZ, MACUSPANA, TABASCO.

ENCUESTA SEROEPIDEMIOLÓGICA DE ENFERMEDAD DE CHAGAS.

ENCUESTA N.º _____ FECHA: _____

LOCALIDAD: _____ MUNICIPIO: _____

DOMICILIO: _____

(CALLE N.º, MANZANA O REFERENCIA SECTOR)

1.- NOMBRE: _____

(APELLIDOS: PATERNO MATERNO Y NOMBRE -S-)

2.- EDAD: _____ 3.- SEXO: M F

1 2

4.- OCUPACION: _____ 5.- ESCOLARIDAD: _____

4.1. HOGAR. _____

4.2. ESCOLAR. _____

4.3. ESTUDIANTE. _____

4.4. PROFESIONISTA. _____

4.5. COMERCIANTE. _____

4.6. GANADERO. _____

4.7. AGRICULTOR. _____

4.8. PARCELERO. _____

4.9. OBRERO. _____

4.10. EMPLEADO. _____

4.11. JORNALERO. _____

4.12. SIRIENTA. _____

4.13. SIN EMPLEO. _____

4.14. OTRO _____

(ESPECIFICAR)

5.1. ANALFABETA. SI NO

1 2

5.2. PRIMARIA:

COMPLETA: _____ INCOMPLETA: _____

T 2

5.3. SECUNDARIA (O EQUIVALENTE):

COMPLETA: _____ INCOMPLETA: _____

T 2

5.4. BACHILLERATO (O EQUIVALENTE):

COMPLETO: _____ INCOMPLETO: _____

T 2

6.- ORIGINARIO DE: _____

(ESPECIFICAR)

7.- OTROS LUGARES DE RESIDENCIA (ESPECIFICAR TIEMPO: _____

8.- ACOSTUMBRA A DESTAZAR ANIMALES DOMESTICOS Y SILVESTRES: SI 1 NO 2

9.- LE HAN PUESTO SANGRE ALGUNA VEZ. SI 1 NO 2

10.- CONOCE LAS CHINCHES HOCIONAS, VOLADORAS, BESUCONAS, APETOSAS, DE COMPOSTELA.
SI 1 NO 2

11.- CON QUE OTRO NOMBRE LAS CONOCE: _____
(ESPECIFICAR)

12.- DONDE LAS HA VISTO:

12.1. DENTRO DE LA CASA: SI 1 NO 2

-PARED. SI 1 NO 2

-TECHO. 2 2

-SUELO. 3 2

-GUARDAROPA. 4 2

- OTRO. 5 2

(ESPECIFICAR)

12.2. PERIDOMICILIO: SI 1 NO 2

-EN LA CERCA. 1 2

-SUELO. 2 2

-CORRALES Y/O CHIOJEROS. 3 2

- OTROS. 4 2

(ESPECIFICAR)

12.3. EN EL CAMPO: SI 1 NO 2

12.4. CHIOJEROS Y/O CORRALES LEJOS DE LA CASA. SI 1 NO 2

13.- LE HAN PICADO: SI 1 NO 2

13.1. HACE QUE TIEMPO: _____

13.2. EN QUE PARTE DEL CUERPO:

CARA 1

BRAZO. 2

PIES. 3

TORAX. 4

5

ANTEBRAZO 6

PIERNAS 7

ABDOMEN. 8

OTRO 9

(ESPECIFICAR)

13.3. SE LE FORMO UNA BOLITA O RONCHA EN EL SITIO DE LA PICADURA: SI 1 NO 2

13.4. TUVO FIEBRE DIAS DESPUES: SI 1 NO 2

13.5. CUANTAS SEMANAS LE DURÓ LA FIEBRE:

1 2-3 3-4 + 4

13.6. SE LE HINCHÓ UN OJO CUANDO TUVO LA FIEBRE: SI NO

14.- SIENTE QUE EN OCASIONES EL CORAZÓN SE LE ACELERA VOLCARA O PARARA CUANDO USTED ESTA DESCANSANDO: SI NO

DESDE CUANDO: _____
(ESPECIFICAR)

15.- SE FATIGA CUANDO CAMINA LA MISMA DISTANCIA QUE RECORRIA HACE 5 AÑOS: SI NO DESDE CUANDO: _____

16.- SE FATIGA CUANDO CAMINA CON UNA PERSONA DE SU MISMA EDAD Y SEXO SIN QUE ELLA LO HAGA: SI NO DESDE CUANDO: _____

17.- SE LE HINCHAN LOS PIES: SI NO

18.- CUANDO BEBE O COME USTED SIENTE QUE SE LE ATORA EN EL CUELLO: SI NO DESDE CUANDO: _____

19.- HABITUALMENTE PADECE USTED DE ESTREÑIMIENTO SI NO
DESDE CUANDO: _____

20.- FRECUENTEMENTE SE DISTIENDE USTED DEL ABDOMEN O BARRIGA: SI NO
DESDE CUANDO: _____

21.- OBSERVACIONES: _____

ENCUESTO: _____
(NOMBRE COMPLETO)

ESTADÍSTICA DE LA INDUSTRIA Y COMERCIO

REGIÓN: _____ COMUNIDAD: _____

MUNICIPIO: _____

DOMICILIO: _____
 (CALLE O CALLEÓN, NO. DIRECCIÓN, CALLES REFERENCIA, SECTOR)

NOMBRE DEL JEFE DE LA FAMILIA: _____
 (APELLIDOS, PATRONO, MATERNO, NOMBRE -S-)

1 - CARACTERÍSTICAS DE LA VIVIENDA:

1. 1. TECHO	1. 2. PARED	1. 3. PISO
PAVIMENTO _____	PAVIMENTO _____	TIERRA _____
LADRILLO _____	BLOQUE O LADRILLO _____	CEMENTO _____
TEJO _____	LANTANA _____	CAJOTELO _____
OTRO _____	TABLA _____	MADERA _____
OTRO _____	OTRO _____	OTRO _____
(ESPECIFICAR)	(ESPECIFICAR)	(ESPECIFICAR)

2 - ¿CUANTOS VIVEN EN ESTA CASA? _____
 (ESPECIFICAR)

3 - ¿CUANTOS CUANTOS USAN PARA DORMIR? _____
 (ESPECIFICAR)

4 - INGRESO FAMILIAR MENSUAL: < 50 MIL _____ 50 - 100 MIL _____
 100 - 200 MIL _____ 200 - 300 MIL _____ > 300 < 400 MIL _____ + 400 MIL _____
 3 2 5 6

5 - FRECUENCIA DE ANIMALES:
 DOMESTICOS: SI _____ NO _____ REPTILIANO: SI _____ NO _____
 1 2 1 2
 PAVIDOMICILIO SI _____ NO _____
 1 2
 (ESPECIFICAR)

(E. A. FAMILIAR)

1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

SI

NO

INTRODUCCION

SI

1

NO

2

(ESPECIFICAR)

OBJETIVOS

SI

1

NO

2

(ESPECIFICAR)

ENCUESTA

(NOMBRE COMPLETO)

B I B L I O G R A F I A

1. Tay, J.; Lara, R.; Velasco, O.; Gutiérrez, M.
Parasitología Médica.; 2a. edición.; Ed. Méndez-Cervantes. Méx.
1985; pp 105-127, 411-413.
2. Schmidt, G.D.; Roberts, L.S.
Fundamentos de Parasitología.; 1a. edición.; Ed. Interamericana,
Méx. D.F.; 1984; pp 74-79.
3. Freeman, B.A.
Tratado de Microbiología de Burrows.; 21a. edición.; Ed. Inter-
americana, Méx. D.F.; 1984; pp 818-819.
4. Brener, Z.; Zigman, R.; Alvarena, M.J.
"Life cycle of Trypanosoma cruzi in the vector".
Pan American Health Organization. Trypanosomiasis Research Scien-
tific Publication.; No.318; 1975; pp 83-88.
5. Velasco, O.; Guzmán-B, C.
"Importancia de la enfermedad de Chagas en México".
Revista Latino Americana de Microbiología; Vol. 28.; 1986; pp
275-283.
6. Tay, J.; Ortega, M.
"Estado actual de nuestros conocimientos sobre transmisores de
enfermedad de Chagas en México. Reporte de nuevas localidades".
Revista de la Facultad de Medicina (Méx.); Vol. 15, No.3; 1972;
pp 221-226.
7. Tay, J.; Ontiveros, D.; Ortega y Torres, J.
"Estado actual de los conocimientos sobre infección en vertebra-
dos por la enfermedad de Chagas en México".
Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana; Vol.67, No.4; 1969;
pp 310-314.
8. Cerisola, J.A.; Rabinovich, A.; Alvarez, M.
"Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre".
Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana; Vol.73; 1972;
pp 203-221.

9. Goldsmith, R.S.; Zárate, R.
"El potencial de la transmisión de la enfermedad de Chagas por la transfusión sanguínea. Hallazgo serológico entre donadores en el estado de Oaxaca".
Salud Pública de México; Vol.20; 1978; pp 141-159.
10. Bayona, C.; Velasco, O.; Ramirez, J.; Gutierrez, M.; Guzmán, C.
"La enfermedad de Chagas en donadores de sangre del Hospital Universitario de Puebla, México".
Aceptado para su publicación en Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana; 1985.
11. Velasco, O.; Gudíño, I.; Tinoce, O.; Guzmán, C.
Memorias X Congreso Nacional de Química Clínica. Acapulco, Gro. México.; Abril 25-30, 1987; p 73.
12. Howard, J.E.; Rubio, M.
"Enfermedad de Chagas congénita. I. Estudio clínico y epidemiológico de 30 casos".
Boletín Chileno de Parasitología; Vol.23; 1968; pp 107-112.
13. Schzufis, G.A.; Száriman, A.
"La enfermedad de Chagas congénita".
Medicina (Buenos Aires).; Vol. 37; 1979; pp 47-53.
14. Koberle, P.
"Pathogenesis of Chaga's disease".
Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chaga's disease; Ciba Foundation, New Series.; No.20; 1974; pp 137-152.
15. Hudson, L.
"Immunobiology of Trypanosoma cruzi infection and Chaga's disease".
Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.; Vol.75, No.4.; 1981; pp 493-498.
16. Rosenbaum, M.B.
"Chagasic myocardiopathy".
Progress in Cardiovascular diseases; No.7; 1964; pp 199-225.
17. Cerisola, J.A.
"Chemotherapy of Chagasic infection in man".
P.H.A.O. Scientific Publication; No.347; 1977; pp 35-47.

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

18. Meirovich, C.; Montrull, L.; Gallerano, R.H.; Sosa, R.R.
"Alopurinol en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica".
Archivos Brasileños de Cardiología.; Vol.41, No.3; 1983; pp 321-3.
19. Brener, Z.
"Immunity to Trypanosoma cruzi".
Advances in Parasitology.; Vol.18; 1980; pp 247-292.
20. González, C.S.; Menes, S.; Schmañis, G.A.; Szóriman, A.
"La detección de Aglutininas Específicas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas".
Medicina (Buenos Aires); Vol.36; 1976; pp 364-375.
21. Hanson, W.L.
"Immunology of American Trypanosomiasis".
Immunology of Parasitic Infections; editado por Sydney & Cohen,
Blackwell Scientific Publications, Londres, Inglaterra.; 1976;
cap. 17; pp 222-233.
22. Schenone, H.; Alfaro, E.; Rojas, A.
"Bases y rendimiento del Xenodiagnóstico en la infección chagásica humana".
Boletín Chileno de Parasitología.; Vol.29; 1974; pp 24-26.
23. Knieria, F.; Sandoval, J.; Muñoz, E.
"Reacción de Hemaglutinación Indirecta en la enfermedad de Chagas crónica".
Boletín Chileno de Parasitología.; Vol.28; 1973; pp 54-57.
24. Pirini, A.; Vera, L.; Fioratti, V.
"Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Estudio Comparativo de diferentes técnicas".
Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.
Vol.22, No.5; Sept-Oct 1980; pp 242-245.
25. González, G.R.; Américo, S.A.
"La utilización de la reacción de Aglutinación Directa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Bancos de Sangre".
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.; Vol.11, No.4; 1977;
pp 353-356.

26. Camargo, M.E.; Amato-Neto, V.
 "Anti-Trypanosoma cruzi antibodies as serological evidence of recent infection".
 Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.
 Vol.40, No.4; Jul-Ago. 1974; pp 200-202.
27. Mazzotti, L.
 "Dos casos de enfermedad de Chagas en es estado de Oaxaca".
 Gaceta Médica de México. Vol.70; 1940; pp417-420.
28. Mazzotti, L.; Díaz, E.
 "Resumen de los casos publicados sobre la enfermedad de Chagas en México".
 Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural; Vol.10,
 Nos. 1-4; 1949; pp 103-111.
29. Biagi, F.; et al.
 "Enfermedad de Chagas en Tutuapan, Edo. de México".
 Prensa Médica Mexicana.; Vol.23, Nos.11-12; 1958; pp 463-465.
30. Goldsmith, R.S.; Ortega, M.; Zárate, R.J.
 "Encuesta seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en Chiapas, México".
 Archivos de Investigación Médica.; Vol.14, No1; 1982; pp 43-50.
31. Biagi, F.; Tay, J.; Guzmán, C.; Fong, F.;
 "Tetitlán, Guerrero: foco endémico de la enfermedad de Chagas".
 Revista de la Facultad de Medicina (Méx.); Vol.6, No.9; 1964;
 pp 625-631.
32. Velasco, O.; Tay, J.; Luna, V.A.
 "La enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, República Mexicana. Presentación de 3 nuevos casos humanos."
 Revista de Investigación en Salud Pública (Méx.); Vol.34; 1974;
 pp 107-113.
33. Cuartero, C.M.; Ponce, D.
 "Cinco nuevos casos de la enfermedad de Chagas en Zacatecas y Jalisco, República Mexicana".
 Revista de Investigación en Salud Pública.(Méx.); Vol. 27;
 1976; pp 29-36.
34. Tay, J.; Navarrete, C.E.; Corominos, E.R.; Biagi, F.
 "La enfermedad de Chagas en el mpie. de Tuxpan, Edo. de Michoacán, México".
 Revista de la Fac. de Medicina.(Méx.); Vol.8, No.4; 1976; 263-70.

35. Guzmán-Bracho, C.
"Enfermedad de Chagas en Progreso, Jiutepec, Morelos. I. Encuesta seroepidemiológica".
Tesis de Especialidad. I.S.E.T. S.S.P. 1985.
36. Tay, J.; et al.
"Enfermedad de Chagas en la República Mexicana".
Revista de Investigación en Salud Pública (Méx.); Vol.22;
1980; pp 400-450.
37. Goldsmith, R.S.; et al.
"Estudios clínicos y epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. Y un estudio completo de siete años. I. Cerro del Aire".
Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.; Vol.100, No.2;
1986; pp 145-167.
38. Memorias. VII Congreso Nacional de Parasitología.
Puebla, Pue.; Oct. 16-18.; 1980; p 8.
39. Hernández, L.
"Un nuevo caso de la enfermedad de Chagas en Tierra Blanca, Ver".
Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales,
(Méx.); Vol.25, No.2; 1965; p 181.
40. Quintal-Avilés, R.; Navarrete, E.R.
"Encuesta serológica en una población del Agro Henequenero Yucateco".
Revista de Salud Pública (Méx.); Vol.17, No.3; 1975; pp 365-369.
41. Tallaeche, A.M.
"Hallazgo de Trypanosoma (Schizotrypanum) en muestras de sangre tomadas de febriles del área palúdica en México".
Boletín Informativo de la Dirección General de Investigación de Salud Pública, S.S.A., México.; Vol.7-8; 1976.
42. Reyes, P.A.; Mendoza, N.; Marchshamer, J.; García, Z.
"Miocardiopatía congestiva y tripanosomiasis americana".
Salud Pública de México; Vol.25, No.2; 1983; pp 139-144.
43. Tay, J.; et al.
"La enfermedad de Chagas en la República Mexicana".
Salud Pública de México; Vol.22, No.4; 1980.

44. WHO-PAHO
New Letter; Special program for Research and training in Tropical diseases.; No.18; 1982.
45. Carta Geográfica del Estado de Tabasco. 1984.
Gobierno del Estado de Tabasco.
Secretaría de Comunicaciones, Asentamientos y Obras Públicas.
46. OMS.
"Encuestas Inmunológicas y Hematológicas".
Informe de un grupo de estudio.
Serie de Informes técnicos. No.181; 1951; pp 1-39.
47. Boyden, S.V.
"The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by anti-protein sera".
Journal of Experimental Medicine; Vol.93; 1951; pp 107-120.
48. Segura, E.L.; et al.
"Manual de técnicas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas".
Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chabén".
Buenos Aires, Argentina.; 1985.
49. Camargo, M.E.
"Fluorescent antibody test for the resodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi in a slide test".
Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.
Vol. 8; 1966; pp 227-234.
50. Información personal.
Dr. Oscar Velasco Castrejón. Jefe del Departamento de Parasitología del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales.
S.S.P.; México.
51. Goldsmith, R.S.; Kagan, I.B.; Rgyes, G.M.; Cedeño, F.J.
"Estudios epidemiológicos realizados en Oaxaca, México. I. Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de HAI".
Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.; Vol.71, No.6;
1971; pp 500-518.

52. Velasco, O.; Romero, L.R.; Mendiola, G.J.; Brembila, C.A.
"Contribución al conocimiento de la enfermedad de Chagas en México. I. Observaciones epidemiológicas en Tepechitlán, Zacatecas".
Revista de Investigación en Salud Pública (Méx.); Vol.30, No.3; 1970; pp 197-204.
53. Kagan, I.G.; Goldsmith, R.S.; Zárate, R.; Allana, D.
"Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas".
Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana; Vol.87, No.4; 1979; pp 309-318.