

302827
8
Zej



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

Escuela de Química
con estudios incorporados a la U.N.A.M.

SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*Trypanosoma cruzi* EN TRES COMUNIDADES DEL MUNICIPIO DE CHILON, ESTADO DE CHIAPAS.

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

ANGEL HERRERA MANJARREZ

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 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.

I N D I C E

CAPITULO I INTRODUCCION

1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Objetivos.....	2
1.3. Hipótesis.....	2

CAPITULO II ANTECEDENTES

2.1. Definición.....	3
2.2. Antecedentes históricos.....	3
2.3. Epidemiología.....	6
2.3.1. Agente etiológico.....	6
2.3.2. Huésped.....	8
2.3.3. Ambiente.....	9
2.3.4. Mecanismos de transmisión.....	10
2.4. Ciclo de vida.....	11
2.4.1. Ciclo de vida en el huésped invertebrado.....	11
2.4.2. Ciclo de vida en el huésped vertebrado.....	11
2.5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.....	12
2.6. Métodos de diagnóstico.....	13
2.7. Estado de Chiapas.....	16
2.7.1. Localización geográfica.....	16
2.7.2. Condiciones de la vivienda.....	16

CAPITULO III
PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diagrama.....	19
3.2. Material, Reactivos y Equipo.....	20
3.2.1. Material biológico.....	20
3.2.2. Material de laboratorio.....	20
3.2.3. Reactivos.....	21
3.2.3.1. Preparación de soluciones y medio de cultivo.....	22
3.3. Metodología.....	24
3.3.1. Obtención del extracto crudo antigenico del <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
3.3.2. Prueba de E.L.I.S.A.....	24

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Resultados.....	26
4.2. Discusiones.....	40

CAPITULO V
CONCLUSIONES..... 43

BIBLIOGRAFIA	44
---------------------------	-----------

C A P I T U L O I

I N T R O D U C C I O N

1.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas es un problema que reviste características importantes de Salud Pública en varios países Latinoamericanos, donde las encuestas realizadas han reportado una alta incidencia de individuos afectados por este mal. (1,27)

En nuestro país, no se conoce con certeza el número de personas infectadas, ni el número de personas en riesgo de adquirir la enfermedad. Una de las zonas consideradas como endémicas en la República Mexicana es el Estado de Chiapas, donde los estudios realizados por Goldsmith y colaboradores en el año de 1983, reportaron una alta incidencia de individuos seropositivos a anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi*, lo que sugirió que la Enfermedad de Chagas podría ser una parasitosis muy importante en esa zona. Es por esta razón que se seleccionó el Municipio de Chilón para llevar a cabo una investigación sobre la seroprevalencia de anticuerpos en los habitantes de dicho lugar, en el cual con anterioridad se han reportado casos de infecciones en humanos. (14,23)

A pesar de que desde entonces se han seguido realizando estudios relacionados con esta enfermedad, es necesario, desde el punto de vista sero-epidemiológico, conocer más datos acerca de la prevalencia de este mal en comunidades del Estado antes mencionado para apreciar las repercusiones a nivel de Salud Pública que pueda llegar a tener a largo plazo esta enfermedad.

Este conocimiento puede ser empleado además, para evaluar el riesgo de propagación, evitar la aparición de la

enfermedad en otras zonas del país y para establecer los sistemas de control más convenientes.

1.2. - OBJETIVO

- a) Determinar el grado de seropositividad a anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en comunidades del Municipio de Chilón, Chiapas por medio de la prueba de E.L.I.S.A.
- b) Describir el perfil seroepidemiológico que se presenta en una población definida ubicada en una zona considerada como endémica de enfermedad de Chagas.

1.3. - HIPOTESIS

- a) Si en el Municipio de Chilón, Chiapas existen las condiciones epidemiológicas que favorezcan la transmisión de la enfermedad de Chagas, entonces la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* deberá presentar valores elevados.

C A P I T U L O I I

ANTECEDENTES

2.1.- DEFINICION

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es una antropozoonosis provocada por un parásito hemoflagelado denominado *Trypanosoma cruzi*, que causa una parasitosis hemática y tisular, ésta última afecta principalmente a las células del miocardio, esófago y colon, donde produce daño crónico e irreversible; se considera una de las seis enfermedades tropicales más importantes del mundo. (9,25)

La enfermedad de Chagas, al igual que otras muchas parasitosis, está considerada como una "enfermedad de la pobreza", ya que afecta principalmente a individuos de zonas rurales, en donde la endemia se mantiene debido a las precarias condiciones socioeconómicas de la población, situación que favorece la proliferación de los triatominos, aunque actualmente, la enfermedad se ha encontrado en zonas urbanas y suburbanas debido al factor migratorio de la población. (17,28)

En América Latina, la enfermedad de Chagas es considerada como un problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) reportó que en el año de 1981, existían aproximadamente 24 millones de personas infectadas y aproximadamente unas 65 millones de personas mas en riesgo de ser infectadas. Es predecible, dadas las condiciones de crisis socioeconómicas, que estas cifras sean aún mayores en la actualidad. (27)

2.2.- ANTECEDENTES HISTORICOS

La enfermedad de Chagas fue descubierta por Carlos

Chagas en el año de 1909 en la localidad de Mina Gerais, Brasil cuando dirigía una campaña profiláctica contra el paludismo. (9)

El descubrimiento comenzó con el agente transmisor, un artrópodo hematófago estricto denominado comúnmente barbeiro que interesó a Chagas por el grado con el que se encontraba en las viviendas y la frecuencia con la que se alimentaba del hombre; al examinar microscópicamente las heces del barbeiro, encontró gran cantidad de protozoarios flagelados móviles a los que consideró como una forma intermedia de un hemoparásito humano y de animales domésticos y del que el insecto era el vector transmisor. (9,35)

Carlos Chagas envió algunos insectos a el Dr. Oswaldo Cruz al Instituto Manguinhos, el cuál los puso en contacto con macacos *Callitrix penicillata* los cuales después de tres a cuatro semanas, desarrollaron la presencia de tripanosomas en sangre periférica. Al poco tiempo, Chagas observó un flagelado idéntico a los observados en el macaco en un frotis sanguíneo de una niña enferma que presentaba fiebre, hepatoesplonomegalia y edema generalizado, correlacionando así al parásito con la enfermedad. (9,35)

En nuestro país, Luis Mazzotti en el año de 1940, reportó los dos primeros casos de Tripanosomiasis americana en humanos, estos eran procedentes de la localidad de Real del Carmen en el Estado de Oaxaca, donde se encontraron además, triatomas (*R. prolixus*) infectados con *Trypanosoma cruzi* (19). Veinticinco años después, Francisco Biagi reportó los dos primeros casos comprobados de miocarditis causada por este hemoflagelado. (4)

Actualmente en la República Mexicana, se considera como área potencial para la transmisión de la enfermedad a todo el

territorio que se encuentra a menos de 1,800 m sobre el nivel del mar, ya que dentro de esa altura es donde se han encontrado triatomas infectados por el parásito. (17,28)

Se han reportado casos autóctonos de la enfermedad de Chagas en los Estados de Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Veracruz, Yucatán y en el Distrito Federal .(5,12,24,29,31 32,33,35)

Los estudios epidemiológicos que se han venido realizando hasta ahora, indican que esta enfermedad se encuentra propagada en zonas localizadas al Sur de la República Mexicana, como son los Estados de Chiapas y Oaxaca, donde existen comunidades que alcanzan el 25 y 50% de seropositividad respecto de anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* respectivamente. (12,13,28)

La información previa que se tiene sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas en el Estado de Chiapas corresponde a cuatro informes: una primera encuesta realizada en 1972 en la población de Palenque y sus alrededores donde no se encontró seropositividad alguna (Goldsmith y cols., Datos no publicados). En 1976, la Comisión Nacional para la erradicación del Paludismo reporta el hallazgo de 24 casos de Tripanosomiasis al encontrar en frotis de sangre periférica al agente etiológico de la enfermedad y, en el mismo año, Ortega y colaboradores reportan un alto porcentaje de positividad en los xenodiagnósticos realizados en dos comunidades del Estado antes mencionado. Es en esta última encuesta, donde se confirma además la presencia de infecciones humanas en el Norte y Noreste del Estado, específicamente en los Municipios de Palenque, Tumbalá y Chilón; en 1982, se realiza una encuesta seroepidemiológica por Goldsmith y colaboradores en el Municipio de Tumbalá, donde reportan alta

seropositividad a anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi*. (12
14, 23, 24)

Desde ese entonces, no se han realizado estudios epidemiológicos, por lo que en la actualidad resulta de gran importancia conocer la prevalencia que tiene la enfermedad de Chagas en Municipios de zonas consideradas como endémicas con la finalidad de establecer y reevaluar la importancia que tiene esta parasitosis en estas zonas.

2.3. - EPIDEMIOLOGIA

2.3.1. - Agente etiológico

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es un protozooario hemoflagelado cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

(35)

Phylum	<i>Protozoa</i>
Subphylum	<i>Sarcomastigophora</i>
Clase	<i>Zoomastigophora</i>
Superclase	<i>Hastigophora</i>
Orden	<i>Kinetoplastida</i>
Suborden	<i>Trypanosomatina</i>
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>
Género	<i>Trypanosoma</i>
Sección	<i>Stercoralia</i>
Especie	<i>cruzi</i>

El *Trypanosoma cruzi* tiene en su ciclo biológico tres estadios: amastigote, epimastigote y tripomastigote, esta es la nomenclatura moderna, ya que anteriormente se designaban como formas de *Leishmania*, de *Crithidia* y de *Trypanosoma* respectivamente. (11, 25)

AMASTIGOTE: estas son formas redondas u ovoides que miden aproximadamente de 2 a 7μ de diámetro y poseen un núcleo exéntrico y un cinetoplasto en forma de bastón que da origen al rizoplasto; no presentan flagelo libre, ya que éste se encuentra reducido y embebido en el citoplasma. Se reproducen por fisión binaria asexual en el citoplasma de la célula huésped; al romperse la célula penetran a otras originando "nidos" de amastigotes. (11,25,35)

EPIMASTIGOTE: esta fase es fusiforme, mide aproximadamente de 15 a 20μ de longitud y presenta un núcleo central grande un cinetoplasto anteronuclear, una pequeña membrana ondulante y flagelo libre. Esta forma se encuentra en la parte anterior del intestino de los triatomas transmisores y en los cultivos *in vitro* para tripanosomátidos. (11,25,35)

TRIPOMASTIGOTE: esta forma se encuentra tanto en el huésped vertebrado (tripomastigote sanguíneo) como en el huésped invertebrado (tripomastigote metacíclico); tiene forma de "c", "u" o "s", mide entre 20 y 25μ de longitud y posee un núcleo central grande. En el tripomastigote, el cinetoplasto está localizado en la región posterior, y de ahí emerge el flagelo que recorre todo el cuerpo, dando lugar a la membrana ondulante, que queda libre en la región anterior. Esta fase del parásito predomina en la parte posterior del intestino y en el recto del insecto transmisor. (11,25,35)

Se ha comprobado que el *Trypanosoma cruzi* presenta variaciones de tipo morfológicas, fisiológicas, ecológicas y patogénicas que han permitido poder identificar cepas diferentes y es por éso que se ha propuesto considerarlo como COMPLEJO CRUZI. (35)

2.3.2. - Huésped

El *Trypanosoma cruzi* presenta dos huéspedes, un invertebrado (transmisores) y otro de tipo vertebrado (reservorios silvestres, peridomésticos, domésticos y el hombre).

HUESPED INVERTEBRADO: el huésped invertebrado de *Trypanosoma cruzi* es el responsable de la transmisión ciclo-propagativa de tipo contaminativa, está constituida por insectos pertenecientes a:

Orden *Hemiptera*
Familia *Reduviidae*
Subfamilia *Triatominae*

que se encuentran agrupados en 5 tribus, 14 géneros y 114 especies aproximadamente. (1,35)

En la República Mexicana existen aproximadamente unas 32 especies de triatóminos pertenecientes a 7 géneros (*Rhodnius*, *Triatoma*, *Dipetalogaster*, *Paratriatoma*, *Panstrongylus*, *Belminus* y *Eratyrus*); por su mayor distribución geográfica y domesticidad, las especies mexicanas de mayor importancia son: *Triatoma barberti*, *Triatoma dimidata*, *Triatoma phyllosoma*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma picturata*, *Rhodnius prolixus* y *Dipetalogaster maximus*. (31,35)

HUESPED VERTEBRADO: este tipo de huésped abarca a dos grupos, los reservorios (silvestre, peridoméstico y doméstico) y al hombre.

D Reservorios: se consideran reservorios a todos los animales infectados por el parásito y que mantienen a éste en la misma fase en que se encuentra en el hombre. (9,35)

Entre los reservorios más importantes se encuentran:

a) Marsupiales como el tlacuache, y la zarigüella; que muestran un índice de infección natural por *Trypanosoma cruzi* entre el 25 y 75%

b) Dientes como el armadillo; que presentan un índice de infección natural superior al 50%

c) Roedores como las ratas, ratones silvestres, etc que con una frecuencia del 10 al 20% albergan al parásito en forma natural.

d) Murciélagos

e) Carnívoros como el perro, gato, etc.

f) Bovinos

¿D) Hombre: la susceptibilidad a la enfermedad es universal, no influyen la edad, sexo o raza.

La edad es importante en el pronóstico de la enfermedad de tipo aguda, ya que esta es más grave y en muchas ocasiones mortal en personas menores de 10 años. (1,9)

2.3.3.- Ambiente

Los sitios donde se encuentran con mayor frecuencia los triatóminos, vectores de la enfermedad de Chagas son en las grietas, agujeros o hendiduras en paredes (generalmente de adobe o ladrillo sin pegar) y techos de la vivienda humana; se encuentran también en establos, gallineros, basura, etc., por lo que como se mencionó anteriormente, esta enfermedad es propia de áreas rurales, en donde predominan condiciones precarias de vivienda. (1,20,25)

Los triatomas se pueden encontrar también en focos naturales (silvestres), como son en la base y cavidades del tronco de los árboles, en las ramas de las palmeras, en cuevas o cavidades subterráneas producidas por animales silvestres, etc. (1)

2.3.4. - Mecanismos de transmisión

La transmisión del parásito se efectúa por varias vías. En las regiones con incidencia elevada, la enfermedad de Chagas se transmite con facilidad ante la presencia de personas susceptibles, vectores domiciliarios activos y parásitos viables. (7)

El mecanismo de transmisión más importante, desde el punto de vista epidemiológico, inicia con la picadura del triatoma (indolora) quien al hacerla defeca, eliminando así gran cantidad de tripomastigotes metacíclicos, que contaminan la herida al penetrar por las escoriaciones de la piel ocasionadas por el rascado o a través de las mucosas, pasando entonces al torrente sanguíneo donde se dirigen a células blanco en diversos tejidos. (25,26)

Otra vía de transmisión que ha adquirido carácter importante es la constituida por las transfusiones de sangre, ya que éste es un procedimiento terapéutico muy empleado donde los individuos infectados asintomáticos pueden ser donantes sanguíneos. Esta forma de transmisión quedó ya demostrada en países de Sudamérica y, en nuestro país está empezando a tomarse en cuenta. (21,25,26)

Existen otras vías de infección cuya incidencia es menor que las anteriores (pero no por eso dejan de ser importantes) como son:

- a) Transmisión transplacentaria; que fue intuida por Carlos Chagas y demostrada por Salvador Mazza, existiendo reportados en la literatura mundial más de cien casos de enfermedad congénita. (1,3,26)
- b) Por la leche materna; solamente se halla reportado un caso comprobado y los resultados en modelos murinos han sido confusos. (3)
- c) Transplantes de órganos; pudiera ocurrir que el órgano a

transplantar contuviese nidos de amastigotes que se convertirían en formas infectivas en el organismo receptor. (1)

- d) Accidentes en el personal de laboratorio; en este tipo de transmisión las formas de infección están bien caracterizadas, ya que se producen con mayor frecuencia por contacto con las heces de triatomas, formas de cultivo *in vitro* o al contacto con la sangre de animales previamente infectados. (1,8)

2.4.- CICLO DE VIDA

Al ser *Trypanosoma cruzi* un parásito heteroxeno, tiene una gran supervivencia debido a su capacidad de adaptación al medio ambiente; posee dos ciclos de vida, uno en un huésped invertebrado y otro en un huésped vertebrado. (30)

2.4.1.- Ciclo de vida en el huésped invertebrado

Este ciclo comienza cuando un triatoma libre de infección pica a un mamífero (incluyendo al hombre) y succiona la sangre que contiene tripomastigotes sanguíneos (fase infectiva para el insecto), los cuales pasan al intestino del triatoma transformándose en epimastigotes y esferomastigotes, que se multiplican por fisión binaria longitudinal para convertirse al final del ciclo en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante para el mamífero). (6,30)

2.4.2.- Ciclo de vida en el huésped vertebrado

Al alimentarse un triatoma infectado de la sangre de un huésped vertebrado libre de la infección, se produce la defecación del insecto sobre la piel o mucosa del huésped, depositando junto con su excremento a los tripomastigotes

metacíclicos, estos penetran en la piel introduciéndose en las células del tejido mas cercano al sitio de la penetración en donde adoptan la forma de amastigote, se multiplican intracelularmente por fisión binaria llenando la célula que posteriormente revienta, liberando amastigotes al torrente sanguíneo donde se transforman en tripomastigotes que se diseminan a otros tejidos para multiplicarse nuevamente, repitiendo este proceso muchas veces. (6,30)

El ciclo de vida se completa cuando un triatoma libre de infección, pica, succionando sangre con tripomastigotes sanguíneos, infectándose de ésta manera. (6,30)

2.5. - MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Enfermedad de Chagas presenta dos formas clínicas: la fase aguda (que se observa en un 5% de los sujetos infectados) y, la fase crónica que a su vez presenta dos variedades, asintomática o indeterminada y sintomática . (25,35)

FASE AGUDA; se caracteriza como una enfermedad sistémica febril, con fiebre intermitente, mialgias, en ocasiones miopatías, hepatoesplenomegalia y adenopatía generalizada. En una proporción que oscila entre 20 y 40% se presenta el complejo oftalmoganglionar con edema periorbital unilateral y adenopatía preauricular (Signo de Romaña), hallazgo considerado como patognomónico de la enfermedad. En casos graves puede haber miocarditis y/o meningoencefalitis, que son causa de muerte en 15% de los casos. Esta forma de la enfermedad sólo se manifiesta en un 5% de los sujetos infectados, tiene una duración entre 1 a 2 meses y cede espontáneamente. (25,35)

FASE CRONICA; se presenta de dos formas clínicas, una es asintomática y la otra sintomática.

I.- Asintomática; el sujeto no tiene manifestaciones clínicas ni alteración reconocible en ECG y puede en ocasiones, evolucionar de esta forma toda la vida. Sin embargo, el sujeto posee anticuerpos demostrables y puede cursar con parasitemia esporádica y fugaz, por lo cual es considerado como un peligro potencial si llega a ser donante sanguíneo. (25)

II.- Sintomática; en un porcentaje estimado de un 30%, los individuos infectados desarrollan miccardiopatía dilatada (como principal complicación) , presentando también insuficiencia cardíaca progresiva y muerte. Puede presentarse también un compromiso importante de tubo digestivo. (25,35)

2.6. METODOS DE DIAGNOSTICO

Existen diversos métodos de diagnóstico de la Enfermedad de Chagas según la fase clínica que presente el individuo. (25,26)

Durante la fase aguda, el diagnóstico será principalmente parasitoscópico ya que lo que se busca en este período es la identificación del agente causal, siendo favorecida por la elevada parasitemia que se presenta en esta etapa. Dentro de los métodos empleados se encuentran: (25,26,38)

- 1) Exámen en fresco
- 2) Método de concentración de Strout
- 3) Gota gruesa
- 4) Inoculación a animales de laboratorio
- 5) Xenodiagnóstico

Después de la tercera o cuarta semana de infección, la parasitemia disminuye y se inicia la producción (por parte del sistema inmune) de anticuerpos específicos. por lo tanto, en la fase crónica (clínicamente asintomático), el diagnóstico se basará en poner de manifiesto a estos anticuerpos específicos, para lo cual se han empleado las siguientes pruebas: (25,35,38)

- 1) Aglutinación directa (HA)
- 2) Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
- 3) Hemaglutinación indirecta (HAI)
- 4) Fijación de complemento (FC)
- 5) E.L.I.S.A
- 6) Inmunoblot en todas sus variantes
- 7) Xenodiagnóstico (por la parasitemia esporádica que se presenta)

Como se nota, en la fase aguda de la enfermedad, el diagnóstico será más parasitológico que serológico, mientras que en la fase crónica de la enfermedad es a la inversa, es decir, mas serológico que parasitoscóptico.

La precisión y exactitud de las pruebas inmunológicas para el diagnóstico serológico, están dadas por la valoración de dos parámetros:

- 1) Sensibilidad (probabilidad de reconocer a un infectado como positivo).
- 2) Especificidad (probabilidad de reconocer a un sano como negativo).

Para ésta investigación, el ensayo de elección para la detección de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* fue la técnica de E.L.I.S.A.

La metodología empleada fue de tipo no competitivo, siendo probablemente el más simple de los ensayos inmunoenzimáticos, es también llamado E.L.I.S.A. indirecto, donde el antígeno es acoplado a una fase sólida sobre la cual se adiciona la muestra que contiene el analito a investigar (anticuerpo) y, la reacción antígeno - anticuerpo se pone de manifiesto al añadir al sistema una anti-globulina humana específica marcada con una enzima. (16,37)

En la actualidad, el uso más frecuente de las metodologías E.L.I.S.A. en relación con las parasitosis se encuentran vinculadas a casos de (37,38) :

- a) Amibiasis
- b) Triquinelosis
- c) Esquistosomiasis
- d) Toxoplasmosis
- e) Malaria
- f) Tripanosomiasis (Africana y Americana)

La metodología E.L.I.S.A. para la Tripanosomiasis americana fue descrita por Alister Voller en 1975, donde por los resultados obtenidos, se le considera una prueba sencilla que aporta resultados muy confiables al compararlos con otras pruebas inmunodiagnósticas y, por su practicidad hace posible su empleo como prueba de elección en encuestas seroepidemiológicas en poblaciones abiertas; años mas tarde, el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, evaluó tres metodologías de inmunodiagnóstico para la enfermedad de Chagas, la contrainmunoeléctroforésis, la inmunofluorescencia indirecta y un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (E.L.I.S.A.), esto con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad de ésta última, encontrándose que la prueba tenía una alta sensibilidad y una gran especificidad, llegándose a la conclusión de que es un ensayo muy recomendable por este y otros factores. (22,36)

2.7. - ESTADO DE CHIAPAS

2.7.1. -Localización geográfica

El Estado de Chiapas se localiza en la parte Sureste del territorio nacional, al Sur del Istmo de Tehuantepec, entre los paralelos 17° 27' 25" de latitud Norte y entre los meridianos 90° 12' 12" y 94° 33' 03" de longitud Oeste. VER FIGURA 1 (2,15)

Chiapas limita al Norte con el Estado de Tabasco, al Este con el límite internacional de la República de Guatemala, al Sur y Suroeste con el Océano Pacífico y al Oeste con los Estados de Veracruz y Oaxaca. (2,15)

Por su extensión territorial (74.211 km²), ocupa el octavo lugar a nivel nacional, cubriendo el 3.8% del país aproximadamente; políticamente, la entidad se divide en 112 municipios distribuidos en nueve regiones económicas.

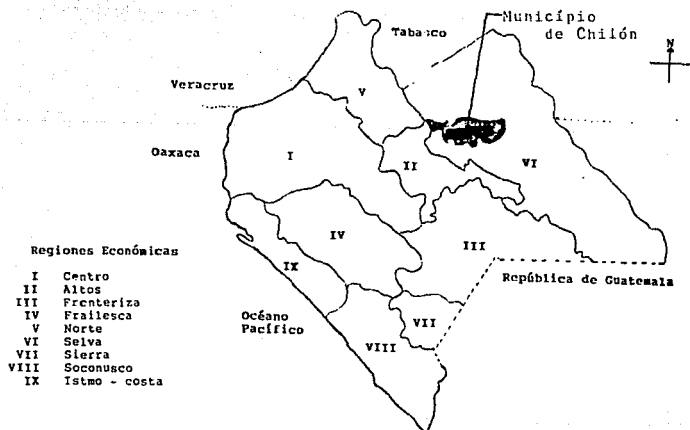
El municipio de Chilón se localiza geográficamente al Noroeste del Estado, en la región VI, denominada como selva (VER FIGURA 1), a una latitud de 17° 06' y una longitud de 92° 16', teniendo una altitud de 880 metros sobre el nivel del mar, con un clima clasificado como cálido húmedo con abundantes lluvias en verano. (2)

2.7.2. - Condiciones de la vivienda

Según reportes del X Censo General de Población y Vivienda realizado en 1980, existía un índice de hacinamiento de 5.6 habitantes por vivienda, esta proporción tiende a incrementarse en el medio rural, donde las condiciones habitacionales son más precarias, además del acelerado crecimiento de la población rural.

En lo que respecta a la composición física de las viviendas de la Entidad, los techos que predominan son de palma (11.4%), teja (29.6%), concreto (6.5%) y de otros materiales no especificados (52.5 %); en cuanto al material de los muros, el 13.2% son de adobe, el 23.6% de madera, el 17.1% de embarro, el 23.7% de tabique y el 22.4% de otros materiales. (10)

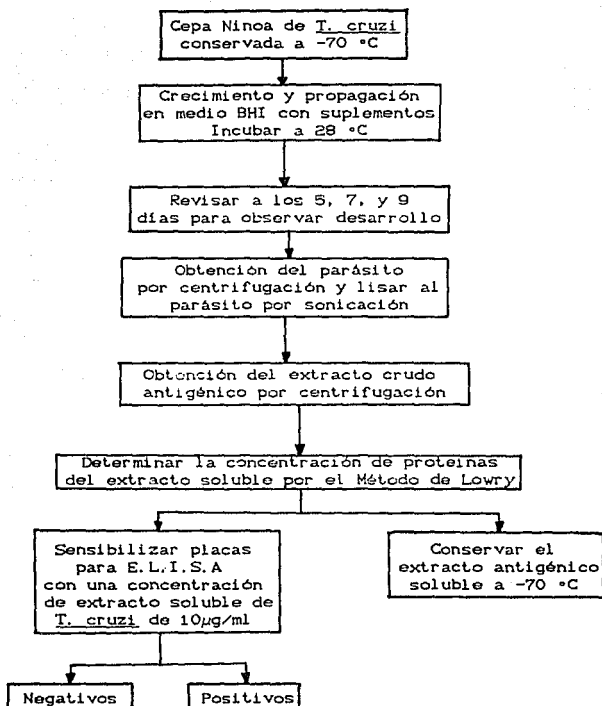
Figura 1. Localización geográfica del Estado de Chiapas



C A P I T U L O I I I

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMA



3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material biológico

- 1.- Cepa Ninoa de *Trypanosoma cruzi*, procedente de un aislamiento humano del Estado de Oaxaca
- 2.- Suero de ternera neonato
- 3.- Anti Ig G humana marcada con peroxidasa
- 4.- Sueros control (Negativo y Positivo)
- 5.- Sueros problema ; éstos fueron recolectados por el Centro de Investigación Ecológica del Sureste en tres comunidades del Municipio de Chilón, Estado de Chiapas. En total fueron 673 muestras distribuidas de la siguiente manera:
 - a) Comunidad Chabán : 250 sueros
 - b) Comunidad Tzinteeel : 228 sueros
 - c) Comunidad Xanil : 195 sueros .

Estos sueros se han mantenido a -70°C hasta el día de su análisis.

3.2.2 Material de laboratorio

- 1.- Vasos de precipitados (50, 250, 500 y 1000 ml)
- 2.- Matraces Erlenmeyer (50, 250 y 500 ml)
- 3.- Matraces aforados (100 y 1000 ml)
- 4.- Probetas (100 ml)
- 5.- Pipetas (1, 2, 5 y 10 ml)
- 6.- Embudos de cola corta
- 7.- Tubos de ensayo (13x100, 18x150)
- 8.- Pipetas Pasteur
- 9.- Portaobjetos y Cubreobjetos
- 10.- Bulbos de seguridad
- 11.- Goggles
- 12.- Cubre-boca
- 13.- Guantes de Latex
- 14.- Micropipeta sencilla (5-50 μl , 50-200 μl)

- 15.- Micropipeta múltiple de doce canales (50-200 μ l)
- 16.- Puntas para Micropipeta
- 17.- Pozos removibles Microwell para E.L.I.S.A. (Nunc Well Labs., Inc)
- 18.- Campana de flujo laminar de seguridad biológica (VECO, S.A.)
- 19.- Incubadora (LAB-LINE INSTRUMENTS, INC.)
- 20.- Microscopio (LEITZ-WETZLAR)
- 21.- Sonificador (Labsonic 1510)
- 22.- Espectrofotómetro (Shimadzu Co.)
- 23.- Desionizador de H₂O (Corning)
- 24.- REVCO Ultra low temperature freeze
- 25.- Potenciómetro (Beckman)
- 26.- Lector para placas de E.L.I.S.A (Dynatech Lab Inc.)
- 27.- Centrifuga (Beckman)

3.2.3. REACTIVOS

NOMBRE	MARCA	GRADO DE PUREZA
Folin-Ciocalteu	SIGMA	AG
FenilMetilSulfonil-Fluor(PMSF)	SIGMA	AG
Acido ϵ -amino n-caproico	SIGMA	99-100% PURO
E.D.T.A.	SIGMA	99% PURO
Tween 20	SIGMA	AG
Albúmina sérica bovina	SIGMA	96-99% PURO
o-fenilendiamina	SIGMA	AG
4-cloro, 1-naftol	SIGMA	AG
NaCl	J. T. Baker	QP
NaOH	J. T. Baker	AG
Sulfato de cobre	J. T. Baker	QP
Tartrato de sodio	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Tartrato de potasio	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Alcohol isopropilico	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Na ₂ H PO ₄	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
K ₂ H PO ₄	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.

NOMBRE	MARCA	GRADO DE PUREZA
Citrato de sodio	J. T. Baker	AG
Bicarbonato de sodio	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Carbonato de sodio	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Acido sulfúrico	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Metanol	J. T. Baker	REACTIVO A. C. S.
Acido fosfórico	Merck	AG
Acido clorhídrico	Merck	AG
Fenol	Merck	QP
H ₂ O ₂ al 30%	Merck	AG
Agar BHI	BIOXON	
Agar nutritivo	BIOXON	
Bacto-dextrosa	BIOXON	
Suero de ternera neonato	IN VITRO	

Características de los reactivos:

AG (Grado analítico); Reactivo A.C.S. (Reactivo que cumple con las especificaciones de la Reagent Chemical Association); QP (Químicamente puro)

3.2.3.1. Preparación de soluciones y medio de cultivo

a) Soluciones para la prueba de E.L.I.S.A

1.- Buffer de carbonatos (pH=9.6)

Na₂CO₃1.59 g

NaHCO₃2.93 g

Agregar agua destilada, ajustar el pH con NaOH y después aforar a 1 l.

2.- Buffer de fosfatos salinos (10 %) 0.1 M

NaCl.....80.0 g

KCl.....2.0 g

Na₂HPO₄11.5 g

K₂HPO₄2.0 g

Aforar a 1 l con agua destilada; para emplearla al 1%,

tomar 100 ml de PBS 10%, agregar 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.2-7.4 con NaOH. Aforar a 1 l.

3.- PBS-Tween 0.05 M

PBS (1%).....1000 ml

Tween 20.....0.5 ml

4.- Buffer de citratos - fosfatos (pH=5)

Citrato de sodio.....2.94 g

Adicionar agua destilada y ajustar el pH con H_3PO_4 ;
aforar a 1 l.

5.- H_2SO_4 2.5 N

H_2SO_4 13.7 ml

Aforar a 100 ml con agua destilada

b) Preparación de medio de cultivo bifásico enriquecido

1.-Agar BHI.....37.0 g

Agar nutritivo.....23.0 g

Bacto - dextrosa....10.0 g

Adicionar 1 l de agua destilada, calentar hasta ebullición con agitación constante. Distribuir en matraces Erlenmeyer y esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Adicionar al medio ya solidificado, entre 25 y 30 ml de solución salina al 0.85% (pH=7.0); ésta solución ha sido esterilizada previamente a 15 libras de presión por 15 minutos.

Adicionar 10 ml de suero de ternera neonato a cada matraz y posteriormente, realizar pruebas de no contaminación (esterilidad) antes de inocular los medios.

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Obtención del extracto crudo antigénico de *T. cruzi*

- a) Inocular la cepa Ninca de *Trypanosoma cruzi* en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo BHI con suplementos para el desarrollo del parásito.
- b) Incubar a 28 °C por espacio de una semana, revisando la fase líquida del medio para observar el crecimiento y desarrollo del parásito.
- c) Cosechar el parásito entre el día 7 y 10 ; para realizar lo anterior, juntar la parte líquida del medio de cultivo filtrando por gasa estéril, centrifugar cuatro veces por 15 minutos a 5000 rpm, resuspender el sedimento cada vez en PBS 0.01 M (aproximadamente 10 ml), desechar el sobrenadante en otro recipiente para su posterior esterilización.

Agregar a el botón de parásitos resultante una solución estabilizadora de enzimas consistente en: PMSF 200 mM (200 μ l), Acido ϵ -amino n-caproico 550 mM (160 μ l), E.D.T.A 0.2 M (400 μ l) y PBS 0.01 M (8 ml).

- d) Sonicar 6 veces por 10 segundos a 50 watts de potencia para lisar al parásito.
- e) Revisar al microscopio la destrucción total del parásito.
- f) Centrifugar el extracto crudo antigénico completo antes obtenido a 10000 rpm por treinta minutos para separar el extracto soluble del insoluble.
- g) Determinar la concentración de proteínas del extracto soluble por el Método de Lowry (18) y guardar en alícuotas a -70 °C.

3.3.2. Prueba de E.L.I.S.A

Con esta prueba, se analizan los sueros de las tres

comunidades del Municipio de Chilón, Chiapas; siendo la metodología empleada la siguiente:

- a) Sensibilizar la placa con 10 $\mu\text{g/ml}$ del extracto antigénico soluble en buffer de carbonatos, agregar 100 μl /pozo; incubar toda la noche a 4 °C.
- b) Decantar y lavar 4 veces con PBS-Tween (0.05%); agregar 200 μl por pozo por un minuto.
- c) Bloquear sitios libres con PBS-Tween-Alb al 1%; agregar 100 μl por pozo. Incubar 1 hr/37 °C
- d) Decantar y lavar 1 vez con PBS-Tween (0.05%)
- e) Diluir las muestras y los controles positivo y negativo 1:400 con PBS-Tween-Alb
- f) Agregar 100 μl por pozo de las muestras y controles; éstas se analizan por triplicado. Incubar 1 hr/37 °C.
- g) Lavar 4 veces con PBS-Tween (0.05%)
- h) Agregar 100 μl por pozo del conjugado (anti-Ig G humana marcada con peroxidasa); emplear el conjugado a una dilución de 1:40000 en PBS-Tween-Alb. Incubar 1 hr/37 °C
- i) Lavar 6 veces con PBS-Tween (0.05%)
- j) El sistema de revelado consiste en : o-fenilendiamina (8 mg), buffer de citratos-fosfatos (20 ml) y H_2O_2 (8 μl); agregar 100 μl por pozo. incubar 15 minutos en oscuridad.
- k) Detener la reacción con 50 μl en cada pozo de ácido sulfúrico 2.5 N
- l) Leer a 492 nm

C A P I T U L O I V

4.1. RESULTADOS

Al obtener el extracto crudo antigénico soluble de *Trypanosoma cruzi*, se procedió a determinar la concentración de proteínas totales existentes por el Método de Lowry con una curva patrón de albúmina sérica bovina, obteniéndose una concentración de proteínas de 2.7 mg/ml, que se consideró apropiada para los requerimientos de la investigación a realizar.

Se prepararon alicuotas de este antígeno las cuáles se mantuvieron a - 70 °C y se fueron descongelando según se fuesen requiriendo.

Para obtener el valor normal de D.O. se trabajó con 45 sueros obtenidos en banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez a los cuáles se les realizó la prueba de ELISA para la búsqueda de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*, obteniéndose una α de 0.038 y una D.S de 0.028, con éstos datos, el valor de corte (normal) calculado fue una D.O de 0.12 como máximo.

Al analizar los sueros provenientes del Estado de Chiapas, se encontró que de los 873 sueros, el 31.5 % eran positivos a la prueba, de los cuales el 16.5 % pertenecían al sexo femenino y el 15.0 % al masculino. (Figura I y II)

En lo que respecta a la distribución de los seropositivos por comunidad geográfica, Tzinteeł tuvo la prevalencia más elevada con 41.5 %, seguida de Xanil y Chabán, ambas con 29.2 % respectivamente. (Figura III)

En la comunidad de Tzinteeł, donde la prevalencia total fue la más alta, el 38.6 % de los sueros fueron positivos,

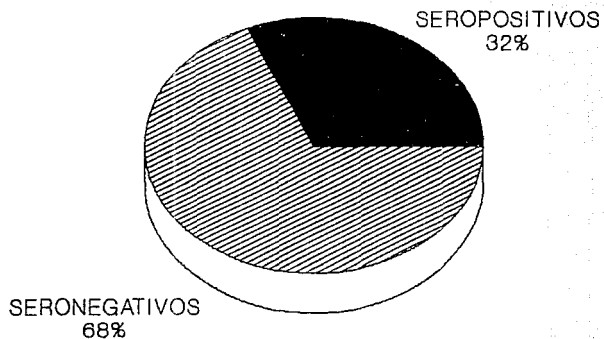
donde el 18.9 % correspondió al sexo masculino y el 19.7 % al sexo femenino. En esta comunidad, existen al menos 5 personas por familia y al menos dos integrantes fueron positivos a la prueba. (Figura IV)

La comunidad de Xanil tuvo una prevalencia de 31.8 %, donde el 14.4 % son del sexo masculino y el 17.4 % del sexo femenino. En esta comunidad, existen al menos 5 personas por familia y al igual que la anterior por lo menos dos integrantes son positivos a la prueba. (Figura V)

La comunidad de Chabán tuvo una prevalencia del 24.8 % del total de su población, de los cuales el 12.0 % pertenecen al sexo masculino y el 12.8 % al femenino. En esta comunidad existen al menos 4 integrantes por familia y por lo menos una esta infectada por *Trypanosoma cruzi*. (Figura VI)

Para su mayor apreciación, el perfil seroepidemiológico que se presenta en el Municipio de Chilón, Chiapas respecto la seroprevalencia a anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* se muestra en las Gráficas I a VI, donde se tomo en cuenta la edad y el sexo. Es importante notar la incidencia que se está presentando en individuos menores a los 10 años así como la distribución que se esta presentando por sexo en el total de la población y por cada comunidad geográfica.

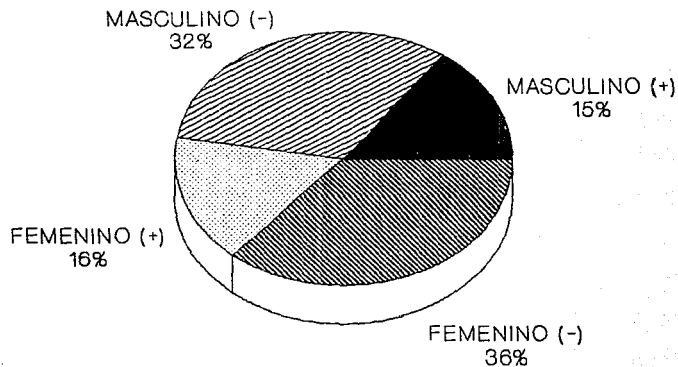
Figura I. Seroprevalencia de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi en el total de la población



28

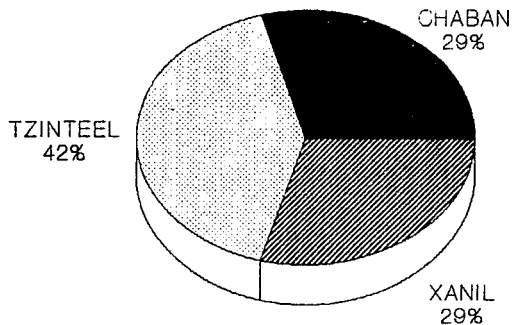
673 SUEROS

Figura II. Seroprevalencia de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi por sexo en el total de la población



(+) INDICA SEROPOSITIVOS
(-) INDICA SERONEGATIVOS

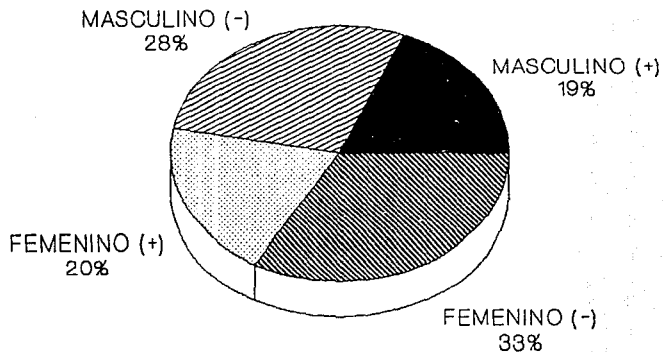
Figura III. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti - T. cruzi por comunidad geográfica



30

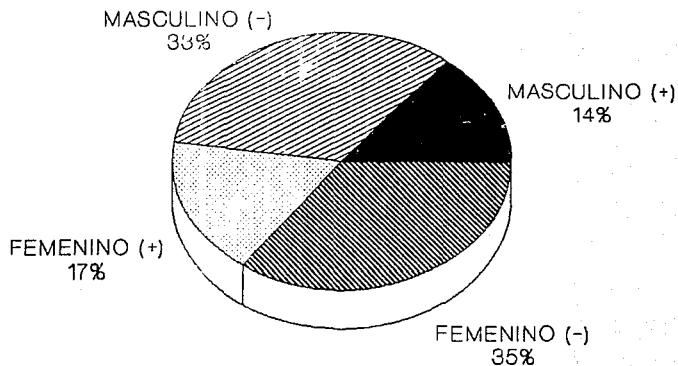
212 SEROPOSITIVOS

Figura IV. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en la comunidad de Tzinteel



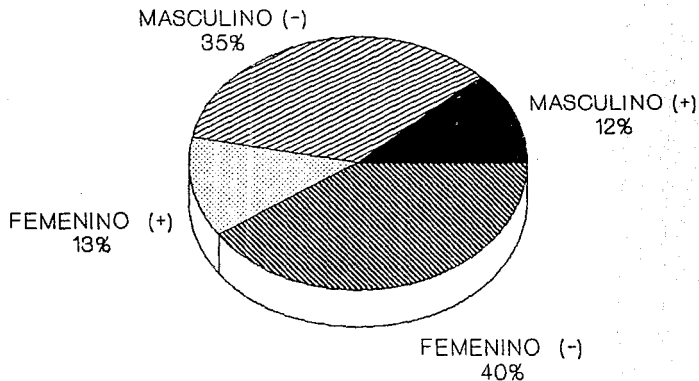
(+) INDICA SEROPOSITIVOS
(-) INDICA SERONEGATIVOS

Figura V. Seroprevalencia de anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* en la comunidad de Xanil



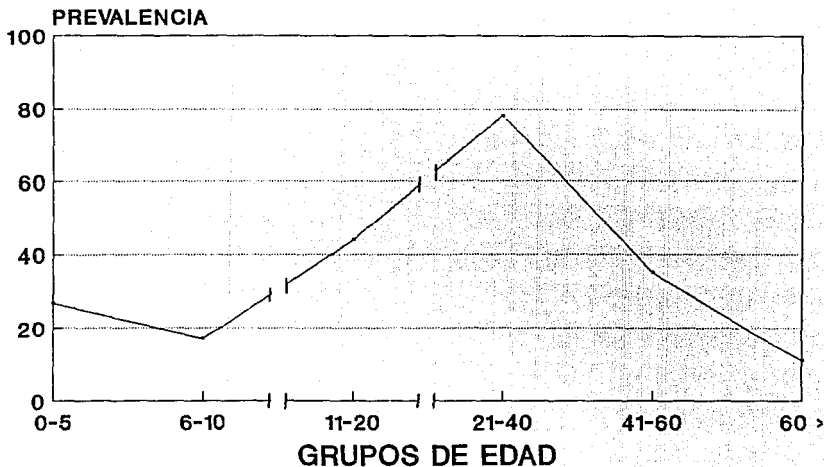
(+) INDICA SEROPOSITIVOS
(-) INDICA SERONEGATIVOS

Figura VI. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en la comunidad de Chabán

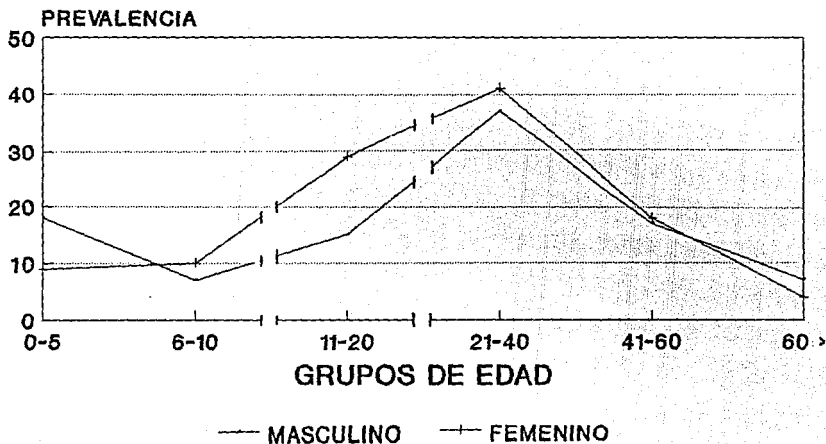


(+) INDICA SEROPOSITIVOS
(-) INDICA SERONEGATIVOS

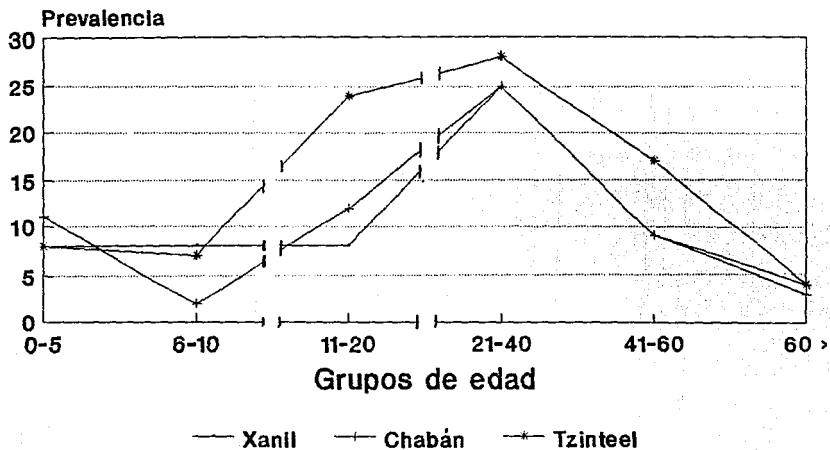
Gráfica I. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti-*T.cruzi* por grupo de edad en el total de la población



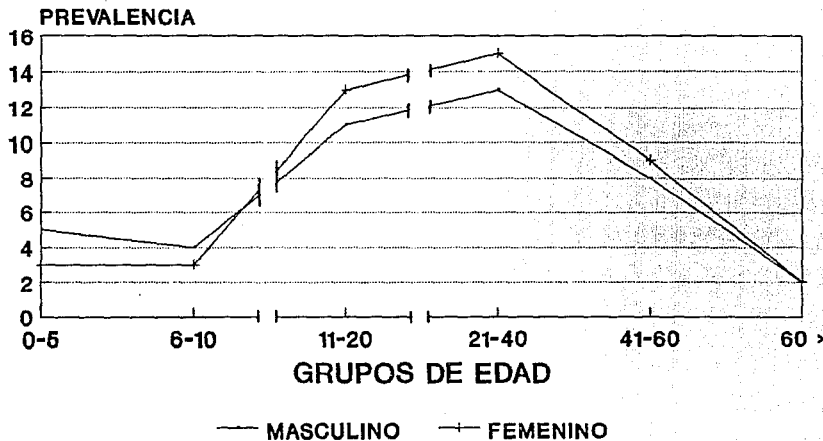
Gráfica II. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* por edad y sexo en el total de la población



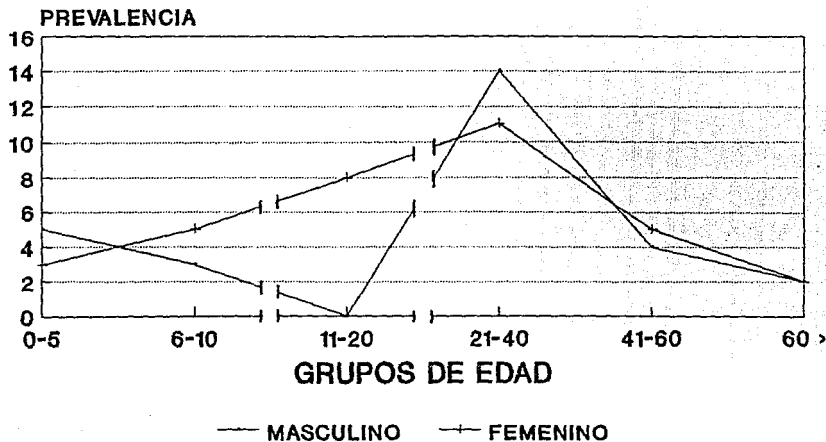
Gráfica III. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti-*T. cruzi* por edad en cada comunidad geográfica



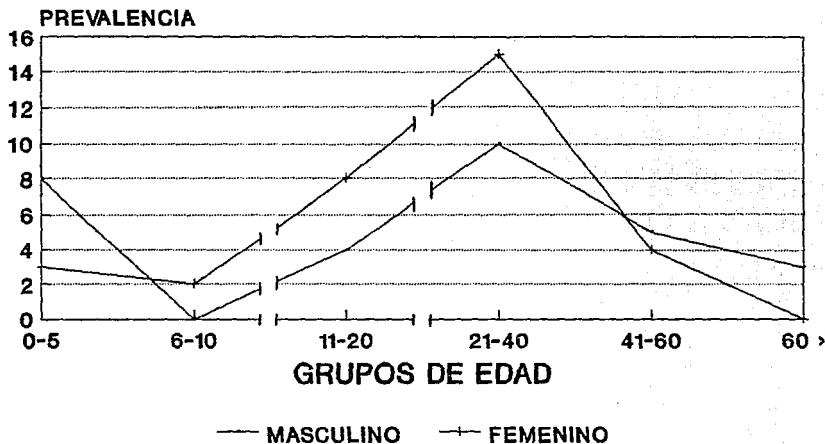
Grafica IV. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* por edad y sexo en la comunidad de Tzintzeel



Gráfica V. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* por edad y sexo en la comunidad de Xanil



Gráfica VI. Distribución de seropositivos a anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* por edad y sexo en la comunidad de Chaban



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

4.2. DISCUSION

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es un problema de salud pública que reviste gran importancia en varios países Latinoamericanos incluyendo a México. (27,35)

En la República Mexicana se han descrito varias zonas endémicas, de las cuales sobresale el Estado de Chiapas; por esta razón, el Centro de Investigación Ecológica del Sureste seleccionó al Municipio de Chilón ubicado al noreste del Estado, para llevar a cabo una investigación sobre la seroprevalencia que de anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* existe entre los habitantes de tres comunidades rurales de ese lugar ya que con anterioridad se han reportado casos de infecciones humanas en este Municipio en particular.

De los resultados obtenidos en el presente estudio, puede observarse que en las tres comunidades estudiadas, se presentó seropositividad a anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* en el 31.5 % de la población, resultado de alta significancia pues indica que casi la tercera parte de la población estuvo en contacto con el parásito.

Geográficamente, es la comunidad de Tzinteeel la que presenta una prevalencia más elevada (41.5 %) respecto a Xanil y Chabán (ambas con 29.2 %), situación que podría deberse a que la comunidad de Tzinteeel presenta condiciones sociográficas (pobreza, vivienda inadecuada y falta de buenos servicios médicos) más desfavorables que las otras dos comunidades, creando así condiciones propicias para el desarrollo y propagación de la enfermedad ya que hay que recordar que una prevalencia alta de ésta y otros tipos de parasitosis no son más que indicadores del desarrollo y

condiciones de vida de una población.

Si en el análisis de los resultados se contemplan los parámetros de edad y sexo de la población estudiada, llama la atención el hecho de que el sexo femenino es el que presenta mayor prevalencia en el total de la población, repitiéndose este patrón en todas las comunidades estudiadas, aunque aquí la diferencia porcentual no sea muy significativa, esto podría deberse a que es precisamente el sexo femenino el que se encarga de las labores domésticas y por lo tanto, puede estar en contacto más tiempo y con una mayor frecuencia con los vectores de la enfermedad de Chagas; sin embargo, no hay que olvidar a los vectores peridomésticos que pueden también transmitir al parásito.

La distribución por edades proporciona una mayor información de la sero prevalencia de ésta enfermedad e indica que la mayor frecuencia en las tres comunidades se presentó en el grupo de 21 a 40 años en ambos sexos. Aquí es importante señalar que la presencia de anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* en niños menores de 10 años es muy elevada (en ambos sexos) y, considerando que el sexo femenino presenta una alta prevalencia (especialmente el grupo de 21 a 40 años), se podría pensar que en el Municipio de Chilón se presenten otros mecanismos de transmisión diferentes al habitual, como por ejemplo la transmisión transplacentaria del parásito, situación que deberá de investigarse más a fondo.

Es importante apreciar que mientras que la enfermedad se ha mantenido mas o menos constante en las comunidades de Tzintzeel y Xanil, en lo que respecta a la Comunidad de Chabán, al parecer los mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas se están reactivando, ya que de tener una disminución notable de seropositivos hace aproximadamente

10 años, actualmente presenta una incidencia en grupos menores de 5 años bastante elevada.

Tomando en cuenta que en las viviendas ubicadas en el Municipio de Chilón se presentan aquellas características que facilitan la habitación y proliferación de triatomas, tales como: muros de vara, palma o adobe; techo de guano o lámina; piso de tierra o cemento; presencia de vectores domiciliarios y peridomésticos y de animales susceptibles a ser infectados por el parásito (incluyendo al hombre) y hacinamiento, la transmisión de la enfermedad de Chagas en una misma familia o a casas circunvecinas se ve favorecida, manteniéndose así niveles altos de seroprevalencia en la comunidad.

C A P I T U L O V

CONCLUSIONES

- 1.- Los resultados preliminares encontrados, indican que la enfermedad de Chagas es un problema de Salud Pública en al menos tres comunidades del Municipio de Chilón, Chiapas.
- 2.- La seroprevalencia a anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* encontrada (31.5%) demuestra que la infección está presente o que una gran parte de la población ha tenido contacto con el parásito, por lo que la hipótesis planteada se ha comprobado.
- 3.- La alta seroprevalencia de anticuerpos encontrada en el grupo de niños menores a 5 años han puesto de manifiesto que la transmisión no se ha interrumpido y que aún se siguen manteniendo los ciclos de transmisión del parásito, aunque los mecanismos por los cuáles aún persiste esta transmisión no son muy claros.
- 4.- Es necesario ejercer un mayor control epidemiológico de esta zona y de otras ya estudiadas para la detección y control oportuno de la enfermedad, así como para evaluar el riesgo de propagación y los sistemas de control más convenientes.

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

- 1.- Andrade,Z., Brenner,L.: *Trypanosoma cruzi* E DOENÇA DE CHAGAS., Rio de Janeiro, Brasil., 1972
- 2.- Anuario estadístico del Estado de Chiapas., Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)., 1991
- 3.- Apt,W.: Transmisión congénita de protozoos parásitos., Bull Of Sanit Panam., Vol. 72., Núm. 6., 1972
- 4.- Biagi,F., Arce,G.: Los dos primeros casos de miocarditis chagásica comprobados en México., Arch Inst Cardiol Mex., 35 (5)., 611-623., 1965
- 5.- Biagi,F., Tay,J., Guzmán,F., Fong,F.: Tetitlán, Guerrero. Foco endémico de la enfermedad de Chagas., Rev Fac Med Mex., 6 (9)., 625-631., 1964
- 6.- Brenner,Z.: Lyfe cicle of *Trypanosoma cruzi*., Rev Inst Med Trop Sao Paulo., 13:171-178., 1971
- 7.- Brenner,Z.: Simposio sobre nuevos enfoques en la investigación de la Tripanosomiasis Americana., Boi O.P.S., LXXXIII-2., 1977
- 8.- Brenner,Z.: Laboratory - acquired Chagas' disease; an endemic disease among parasitologists., Published in GENES AND ANTIGENS OF PARASITES. A LABORATORY MANUAL., 2a. edition., 1984
- 9.- Carrada-Bravo,T.: Tripanosomiasis americana de Chagas., Boi Med Hosp Infant Mex., Vol.40., Núm.8., Agosto., 1983
- 10.- Chiapas., Coordinación general de documentación y análisis., INEGI., 1982
- 11.- Craig & Faust., PARASITOLOGIA CLINICA., Editorial Salvat., 8a. edición., Mallorca (España)., 1974

- 12.- Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Chiapas., Informe académico 1990., Editado por el Centro de Investigación Ecológica del Sureste., San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México., 1991
- 13.- Goldsmith,R., Kagan,I., Reyes-González,M., Cedeño-Pereira, J.: Seroepidemiologic studies in Oaxaca, Mexico. Search for parasitic antibody using the indirect hemagglutination test., Bol Of Sanit Panam., 69 (6):500-517., 1971
- 14.- Goldsmith,R., Ortega,M., Zárate,R., Zárate,L., Beltrán,F.: Encuesta seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en Chiapas, México., Arch Invest Med Mex., 14:43., 1983
- 15.- Heilbig., C.M.A., Chiapas, Geografía de un Estado mexicano., Tomo I., Publicación del Gobierno del Estado de Chiapas., 1976
- 16.- Kemeny,D.M., A PRACTICAL GUIDE TO E.L.I.S.A., Pergamon Press., First edition., 1991
- 17.- Kumate,J., Gutiérrez,G., Muñoz,O., Santos,J., MANUAL DE INFECTOLOGIA., Editorial Méndez Cervantes., México,D.F., 1990
- 18.- Lowry,O.H., Rosebrough,N.S., Farr,A.L., Randall,R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent., J. Biol Chem., 193:265, 1951
- 19.- Mazzotti,L.: Dos casos de enfermedad de Chagas en el Estado de Oaxaca; nota preliminar., Gac Med Mex., 70 (4): 417-420., 1940
- 20.- Mazzotti,L.: Datos para la investigación de la enfermedad de Chagas., Boletfn Epidemiológico., Tomo XIII., Núm. 1., Ene-Feb., 1949
- 21.- Monteón,V., Linares,C., Amador,F., Reyes,P.: Anticuerpos séricos a *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre en la Ciudad de México., Bioquímica., 9:6., 1987

22. - Monteón, V., Sosa, T., Reyes, P.A.: Serological test for American tripanosomiasis. A comparative study., Rev Lat Amer Microbiol., 31:35-38., 1989
23. - Ortega, M., Beltrán, F., Zavala, F.: Enfermedad de Chagas en Chiapas. Estudios clínico-epidemiológicos., Sal Publ Mex., Vol. XVIII., Núm. 3., Sept-Oct., 1976
24. - Quintanal, R., Zavala, J., Rodríguez, M.: La enfermedad de Chagas en el Estado de Yucatán, México., Rev Invest Clin (Mex), 27:255-258., 1975
25. - Romero Dávalos Alfredo., ENFERMEDAD DE CHAGAS., Editorial CIB., 1a. edición., Bolivia., 1978
26. - Sierra, J.: Enfermedad de Chagas., Infectología., 4:287., 1982
27. - Special Program for TDR., W.H.O., Núm. 18., 1982
28. - Tay, J.: La enfermedad de Chagas en la República Mexicana., Sal Publ Mex., XXII:409-450., 1980
29. - Tay, J., Biagi, F., De Buen, A.: Estado actual de nuestros conocimientos sobre triatomas y enfermedad de Chagas en Michoacán, México., Rev Fac Med Mex., 9 (2):109-121., 1967
30. - Tay., Lara., Velasco., Gutiérrez., PARASITOLOGIA MEDICA., Editorial Méndez Cervantes., México, D.F., 1981
31. - Tay, J., Ortega, M., Caplin, R.: Estado actual de nuestros conocimientos sobre transmisores de enfermedad de Chagas en México. Aporte de nuevas localidades infectadas., Rev Fac Med., Vol. XV., Núm. 3., Mayo-Junio., 1972
32. - Tay, J., Salazar-Schettino, P.M., Ontiveros, A.: Epidemiología de la enfermedad de Chagas en una población de Oaxaca, México., Bol Of Sanit Panam., 102 (4)., 1987

- 33.- Tay, J., Salazar-Schettino, P.M., Velasco, M., Haro, I., García-Yáñez, Y., Gutiérrez-Quiroz, M.: Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco, República Mexicana., Sal Publ Mex., Vol. XX:145-149., 1979
- 34.- Tellaeche, M.: Hallazgo de Tripanosomas (*Schizotripanum*) en muestras de sangre tomadas a febriles en áreas palúdicas de México., Bol Inf Dir Gen Invest Sal Publ., 5 (7-8):30-40., 1976
- 35.- Velasco - Castrejón, Oscar., LA ENFERMEDAD DE CHAGAS., Publicación técnica del I.N.D.R.E. # 8., Dirección General de Epidemiología., México, D.F., 1991
- 36.- Voller, A.: Microplate enzyme linked immunosorbent assay for Chagas' disease., The Lancet., Vol. 22 (Feb)., 1975
- 37.- Voller, A., Bidwell, D.E., Bartlett, A.: Enzyme immunoassays in diagnostic medicine., Bull W.H.O., Vol. 53., 1976
- 38.- Voller, A., De Savigny: Diagnostic serology of tropical parasitic diseases., J Immunol Meth., 46:1-29., 1981