

19
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE RESERVIOS DOMESTICOS DE

Trypanosoma cruzi

EN LA JURISDICCION SANITARIA 2,
JOJUTLA MORELOS, MEXICO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
PRESENTA

JACOBO BAUTISTA BOBADILLA

MEXICO, DF.

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.

CONTENIDO

RESUMEN	3
1.0 INTRODUCCION	4
1.1 Clasificación del vector.....	11
1.2 Agente etiológico.....	13
1.3 Morfología.....	14
1.4 Ciclo de vida de <u>Trypanosoma cruzi</u>	19
1.5 Ecología.....	20
2.0 Hipótesis	25
3.0 Justificación	25
4.0 Objetivos	27
5.0 Zona de estudio	28
6.0 Material y Método	33
6.1 Material.....	33
6.1.1 Material Biológico.....	33
6.1.2 Colecta de sangre de los animales.....	33
6.1.3 Elaboración de medios de cultivo.....	33
6.1.4 Inoculación experimental en ratón.....	34
6.1.5 Tinción de frotis.....	34
6.1.6 Elaboración de pruebas serológicas....	36
6.1.7 Estudio histopatológico.....	37
6.1.8 Xenodiagnósticos.....	37

6.2	Metodología.....	38
6.2.1	Cultivos.....	42
6.2.2	Curvas de crecimiento (parasitemia)....	43
6.2.3	Frotis.....	43
6.2.4	Métodos serológicos.....	46
6.2.5	Técnicas histológicas para detección de amastigotes.....	47
6.2.6	Xenodiagnóstico.....	48
7.0	RESULTADOS.....	49
7.1	Localidades muestreadas.....	49
7.1.1	Toma de muestras en medios de cultivo.....	49
7.2	Obtención de aislados.....	49
7.3	Frotis.....	54
7.4	Pruebas serológicas.....	54
7.5	Estudio histopatológico.....	61
7.6	Xenodiagnóstico.....	61
8.0	Discusión.....	67
9.0	Conclusiones.....	72
10.0	Comentarios.....	73
11.0	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	74

RESUMEN

Por la escasa información que hay sobre reservorios domésticos de Trypanosoma cruzi no solo en México, sino a nivel mundial, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar, mediante distintas técnicas parasitológicas, la presencia de mamíferos reservorios para la enfermedad de Chagas en la Jurisdicción Sanitaria 2 de Jojutla, Estado de Morelos.

Se visitaron 23 comunidades de dicha localidad en las cuales se colectó sangre venosa de un total de 76 animales domésticos, la cual se utilizó para preparar cultivos, establecer curvas de crecimiento (parasitemia) en Mus musculus (ratón), frotis, métodos serológicos y técnicas histológicas para detección de amastigotes, se efectuaron en el campo xenodiagnósticos a distintos ejemplares.

De estas localidades se obtuvieron dos aislados de T. cruzi, cuyas curvas de parasitemia presentaron un comportamiento distinto.

En el estudio histopatológico se encontraron afectados no únicamente el corazón y el músculo sino también el cerebro, lo cual no había sido reportado con anterioridad.

1.0 INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una infección causada por el protozooario flagelado Trypanosoma cruzi, registrado en 1909 por el investigador Carlos Chagas. Originalmente fue descrito como Schizotrypanum cruzi, sin embargo a raíz de diversos estudios en este año, el mismo autor lo transfirió al género Trypanosoma.

Este padecimiento está limitado al continente americano y su distribución abarca desde Canadá hasta Argentina siendo más frecuente en algunos países (3), (9), (12).

Trypanosoma cruzi, se desarrolla en sangre y varios órganos de sus hospederos como: corazón, músculo y bazo, entre otros (6),(17), (19). En un 50% de los casos humanos se observa edema bpalpebral unilateral, conocido como signo de Romaña, el que es indoloro con hiperemia, escasa secreción conjuntival y dacriocistitis del ojo infectado , además se encuentra adenopatía local, en la que están comprometidos los ganglios cercanos al sitio de penetración del parásito, con linfadenopatía selectiva y desaparición espontánea en un periodo de 15 días. (14),(31), (43), (56).

En un 25% de los casos se presentan lesiones cutáneas llamadas chagomas de inoculación, que aparecen en cualquier parte del cuerpo como nódulos subcutáneos, acompañados de microadenitis regional y localizados en el sitio de penetración del parásito. Los principales signos del padecimiento son: fiebre de 38°C. hasta 40°C., hepatoesplenomegalia, poliadenitis generalizada, anasarca, diarrea, patologías bronquiales, cardiomegalia y en raras ocasiones se complica con meningoencefalitis; en este período de la fase aguda se encuentran tripomastigotes en la sangre periférica (14), (31), (32), (56). Se consideran sitios de penetración del parásito las vías orales, mucosa conjuntival y cutánea lesionada (8), (32), (48), (56).

Los vectores de la enfermedad de Chagas son hemípteros triatóminos que presentan hematofagia obligada (en animales vertebrados), y hábitos nocturnos (40). En el grupo de los triatóminos se ha observado el canibalismo, cuando la alimentación es escasa (13). Estos artrópodos se conocen en el país con numerosos nombres pero los más frecuentes son el de chinche hocicona o besucona y chinche voladora (55).

Hay aproximadamente cien especies de triatóminos, muchos de estos viven en regiones tropicales y sólo cincuenta y dos pueden infectar con T. cruzi, treinta y seis están relacionados con viviendas humanas y solamente se ha comprobado que doce de éstos son vectores (40). Los que tienen importancia epidemiológica en Sudamérica

son: Triatoma infestans, Rhodnius prolixus, Panstrongylus megistus, Triatoma dimidiata, entre otras adaptadas a la vida intradomiciliaria (10) (12). En México son de importancia: Triatoma barberi, Triatoma dimidiata, Rhodnius prolixus, Triatoma pallidipennis y Triatoma longipennis , enlistados en el orden que les corresponde según su frecuencia.

Cuando el triatómino pica, generalmente la persona o animal está dormida y al picar, su saliva tiene efectos anestésicos y acción anticoagulante (13), defeca y en las deyecciones se encuentra el flagelado. Es importante señalar que la transmisión del parásito se facilita en aquellos triatóminos que tienen el hábito de alimentarse y defecar al mismo tiempo (36), por esta razón en el hombre, T. cruzi es transmitido, principalmente por "contaminación" con las heces fecales de los triatóminos a través de la piel; otras vías de infección son: por transfusión sanguínea, por vía transplacentaria, por leche materna, por contacto accidental con sangre contaminada o cultivos y por transplante de órganos (7), (29).

Los miembros de la familia Trypanosomatidae son parásitos de mamíferos actuando algunos de estos como reservorios. En el continente Africano los hospederos que actúan como tal son : el ganado vacuno, búfalo de agua, cabras, antílopes y caballos, siendo refractarios a la infección los perros y los cerdos. En América del Sur son los ciervos, ganado vacuno y búfalo los que desempeñan dicho papel (15), siendo T. vivax Ziemer, 1905 el que afecta a estas especies, la enfermedad producida por este

protozoario es benigna en el Este de América Central, es la especie más importante de las cuatro que afectan al ganado vacuno y búfalo de agua; en este último se estudió el curso de la enfermedad, observando que los animales infectados padecían una serie de parasitemias bajas y pérdida continua de peso, y , finalmente, la muerte (50). En general el gato y el perro no son susceptibles a la infección natural o artificial por esta especie de tripanosomátido.

Geográficamente, T. congolense Broden, 1904 se encuentra ampliamente distribuido en Africa Tropical, y es el causante más importante de tripanosomiasis animal en Africa del Este, los hospederos que actúan como reservorios son todos los animales domésticos, y animales salvajes tales como antílopes, cebras, facoceros e incluso el elefante, de igual forma Bruce et al., 1911, describen en Africa Central a T. simiae, especie polimórfica semejante a T. congolense, que ocasiona, generalmente una enfermedad aguda y mortal tanto en cerdos como en caballos, pero en ovejas y cabras se presentan únicamente infecciones ligeras (16), así mismo, estos autores estudian en los cerdos la anatomía patológica de la infección aguda y crónica de T. simiae .

Plimmer y Bradford en 1899 describen a T. brucei como un organismo que se encuentra ampliamente distribuido en Africa tropical, entre las latitudes 15° N y 25° S , afecta principalmente a equinos, en donde la fase aguda de la enfermedad tiene una duración de dos a cuatro semanas, mientras que la fase

crónica puede prolongarse por varios meses. En el ganado vacuno, los tripanosomas se localizan extravascularmente, y producen reacciones inflamatorias de la piel, tejido subcutáneo, corazón, sistema nervioso central y ojos (21). Estos autores consideran que las infecciones naturales con T. brucei al ser prevalentes, y a menudo aparecer mezcladas con T. congolense y T. vivax, pueden ser más importantes como causa de enfermedad de lo que se pensaba, de igual forma ambos comentan sobre la infección de T. gambiense en ganado vacuno, cabra, oveja, caballo, perro y gato.

T. rhodesiense es patógeno para el ganado vacuno, caballos, cabras y ovejas, mientras que en perros la infección experimental produce una enfermedad similar a la observada en el hombre (22). Peruzzi en 1928 estudió con detalle la tripanosomiasis ocasionada por T. gambiense y T. rhodesiense en monos (33).

Para América Central y América del Sur, siendo las áreas enzoóticas Argentina, Bolivia y Paraguay, se señala que T. equinum Voges, 1901 parasita principalmente a equinos en los cuales ocasiona el "mal de caderas " ; mulas y burros son menos susceptibles mientras que perros, ganado vacuno, ovejas y cabras, en este orden pueden sufrir infección leve. La capibara (Hydrochoerus capybara) puede contraer la enfermedad y servir, además, como reservorio del parásito (15).

Tejera en 1920 describe a T. rangeli como parásito que afecta al hombre, perro, gato, zarigüeya y mono, y actualmente se le considera como una especie común en los tres primeros

frecuentemente mezclado con infecciones producidas por T. cruzi en América del Sur. Parece que este tripanosoma no es patógeno para los mamíferos, y su importancia radica en su posible confusión con T. cruzi .

Las especies de Trypanosoma de diversos primates incluyen a T. minasense Chagas, 1909 de marmotas y distintos monos en América del Sur; T. diasi Dean y Martins, 1952 de capuchinos en Brasil y T. primatum Reichenow, 1928 de chimpancés y gorilas en el Oeste y Centro de Africa.

La especie más patógena de la familia Trypanosomatidae y que ataca tanto a humanos como animales vertebrados de sangre caliente y en algunos casos de sangre fría, es T. cruzi Chagas, 1909; la distribución de este organismo abarca principalmente a América del Sur, sin embargo lo podemos encontrar desde Canadá hasta Argentina, actualmente. Una amplia variedad de animales pueden estar infectados y servir como reservorios de la enfermedad, tal es el caso de perros, gatos, cerdos, zorros, hurones, ardillas, zarigüeyas y monos, calculando que más del 35 % de los perros de América del Sur se encuentran parasitados (28). También en Estados Unidos de Norteamérica se ha detectado el parásito y se diagnostica la enfermedad en zarigüeyas, mapaches, mofetas y zorros en los estados del suroeste hasta Maryland. Se ha detectado que 14 especies de mamíferos en dicho país son parasitadas por T. cruzi registrándose casos fatales en perros de los estados del suroeste (60).

Para América del Sur los principales reservorios son el armadillo y la zarigüeya y en Estados Unidos, tanto las ratas como los mapaches pueden ser focos importantes.

Hasta el año de 1985 la Organización Mundial de la Salud afirma haber encontrado cerca de 150 especies de mamíferos silvestres como reservorios de T. cruzi a nivel mundial (49).

Los estudios realizados sobre reservorios en México son muy escasos, en ellos se mencionan como domésticos a Canis familiaris (perro), así como pequeñas especies silvestres de las cuales son: Dasyopus novemcinctus maximus (armadillo), Rattus norvegicus (rata), Mus musculus (ratón) y Sciurus vulgaris (ardilla) , (53), (54).

En cuanto al estudio de este padecimiento en México, según el Dr. Reyes (40), fue el Dr. Mazzotti en 1940 quien informó por primera vez de su existencia, de igual forma el Dr. Dias et al. en 1947 dan a conocer a Didelphis marsupialis (tlacuache) como el primer reservorio de T. cruzi en Agua Buena, Michoacán; así mismo en 1949 Mazzotti y Dias informan sobre la infección en Dasyopus novemcinctus y en Canis familiaris. Ese mismo año el Dr. Beltrán descubrió como reservorio a Rattus norvegicus , (53), (54) .

En 1970 Velasco encontró a Canis familiaris como reservorio de T. cruzi . Por otra parte aunque en México no se ha encontrado a ningún cerdo (Suis domesticus) infectado con T. cruzi , Mazzotti y Brumpton en 1939 señalaron haberlo infectado experimentalmente.

El vector de la enfermedad de Chagas en México es el insecto hematófago cuya ubicación taxonómica según Jeannel, 1991 in Ryckman, 1984 (42) es :

1.1 CLASIFICACION

Phylum : Arthropoda

Subphylum : Mandibulata

Clase : Insecta

Subclase : Pterygota

Orden : Hemiptera

Suborden : Heteroptera

Superfamilia : Reduvidoidea

Familia : Reduviidae

Subfamilia : Triatominae

Género : Triatoma

Especies : T. barberi , T. dimidiata ,

T. pallidipennis , T. longipennis

Los triatóminos según sus ciclos pueden ser localizados en el área silvestre, peridomiciliaria e intradomiciliaria. En ésta última se puede localizar en techos, paredes y en el suelo, (Figura 1).

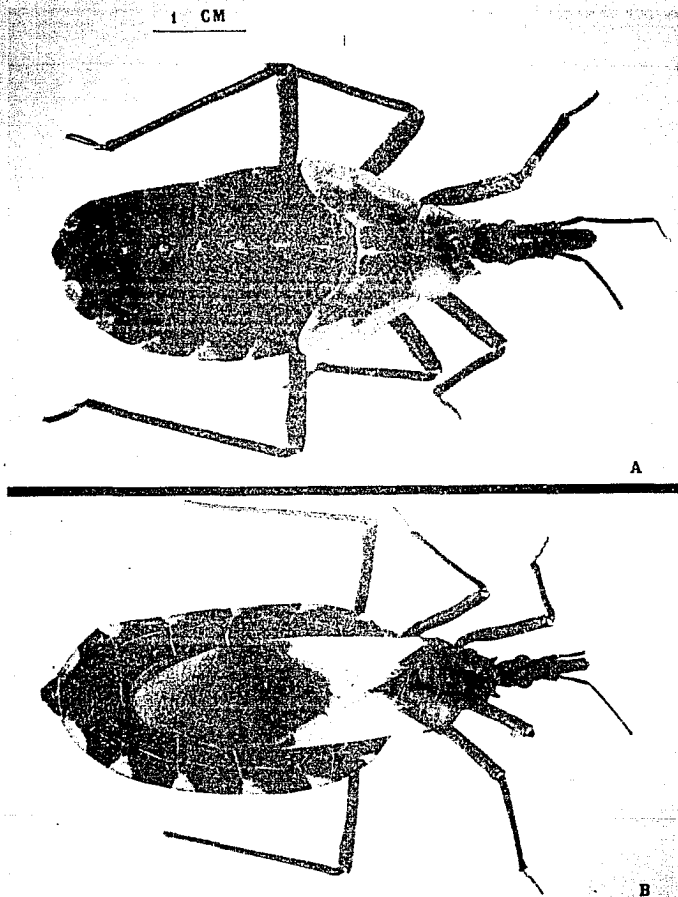


Figura 1.- Foto que ilustra la morfología externa de *T. pallidipennis* : a) ninfa de quinto estadio y b) adulto. Cortesía M. en C. Norma Bautista-López.

1.2 AGENTE ETIOLOGICO

El agente etiológico de esta enfermedad es Trypanosoma cruzi,
cuya ubicación taxonómica según Levine, et al . 1980 (26) es:

Reino : Protista Haeckel, 1866

Subreino : Protozoa Goldfuss, 1818, emend. von Siebold, 1845

Phylum : Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963

Subphylum : Mastigophora Diesing, 1866

Clase : Zoomastigophorea Calkins, 1909

Orden : Kinetoplastida Honigberg, 1963

Suborden : Trypanosomatina Kent, 1880

Familia : Trypanosomatidae Doflein, 1901

Género : Trypanosoma Gruby, 1843

Especie : T. cruzi Chagas, 1909

1.3 MORFOLOGIA

T. cruzi posee una forma alargada, foliácea de más de 20 μm de longitud, su núcleo único contiene un cariosoma central. El movimiento se realiza por medio del flagelo que se origina del blefaroplasto y corre a lo largo del cuerpo formando el borde de la membrana ondulante, y finalmente queda libre en el extremo anterior. El cinetoplasto, cuerpo filamentosos constituido por una masa compacta de ADN, yace dentro de la mitocondria única que abarca toda la célula (51). EL ADN del cinetoplasto está arreglado en maxi y mini círculos, esta última característica es variable y de importancia taxonómica (52).

Trypanosoma cruzi es un parásito polimórfico ya que durante su ciclo de vida pasa por las siguientes formas: amastigote, promastigote (Figura 3), epimastigote (Figura 4) y tripomastigote (Figura 5).

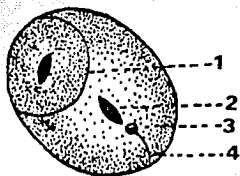


Figura 2.- Amastigote. Su forma es redonda u ovalada, de 1.5 a 4 μm de diámetro mayor, con un blefaroplasto y cinetoplasto anteriores al núcleo central. El flagelo se reduce a una fina fibrilla (11) (48). Los amastigotes son las formas de multiplicación del parásito en el vertebrado; se desarrollan en músculos y otros tejidos en conglomerados, formando nidos de amastigotes (60).

1.- Núcleo

2.-Cinetoplasto

3.- Blefaroplasto

4.- Flagelo

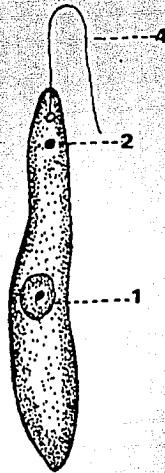


Figura 3.- Promastigote. Su aspecto es fusiforme, mide de 14 a 20 μm de longitud y de 1.5 a 4 μm de anchura, presentan un núcleo central; el cinetoplasto se encuentra cerca del extremo anterior del cuerpo y el flagelo emerge anteriormente (48). Esta forma se puede encontrar en el interior del intestino del triatómino y en medios de cultivo (53).

- 1.- Núcleo
- 2.- Cinetoplasto
- 4.- Flagelo

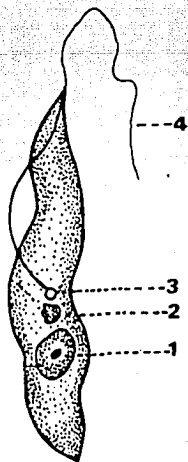


Figura 4.- Epimastigote. Su aspecto es fusiforme de 20 a 25 μm de longitud y 2 a 4 μm de anchura; el cinetoplasto es prenuclear, su núcleo es central, el blefaroplasto se encuentra cerca del núcleo, el flagelo se adhiere al cuerpo formando una membrana ondulante corta en la porción anterior para salir libre en dicho extremo del cuerpo. Estas formas se dividen activamente en el intestino de los triatóminos para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, de igual forma se dividen en los medios de cultivo (48).

- 1.- Núcleo
- 2.- Cinetoplasto
- 3.- Blefaroplasto
- 4.- Flagelo

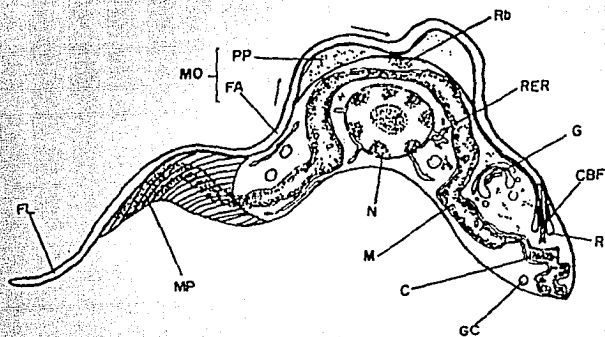


Figura 5.- Tripomastigote. Es delgado de 16 a 20 μm de longitud y su terminación posterior es puntiaguda. El cinetoplasto es subterminal, el flagelo emerge por un costado del cuerpo, va paralelamente a una larga membrana ondulante y queda libre en el extremo anterior (11). Se encuentra en la porción rectal del intestino del insecto (tripomastigote metacíclico); y en la sangre de los vertebrados se localiza el tripomastigote sanguíneo.

MO = membrana ondulante

C = cinetoplasto

MP = microtúbulos de la película

CBF = cuerpo basal del flagelo

N = núcleo

FA = flagelo adherido

PP = pliegue de la película

FL = flagelo libre

R = reservorio

G = golgi

Rb = ribosomas

GC = gránulo citoplásmico

RER = retículo endoplásmico rugoso

M = mitocondria

Tomada de Vickerman, 1972. (58).

1.4 CICLO DE VIDA DE Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi presenta un ciclo de vida complejo que involucra dos fases: una en el hospedero vertebrado (hombre y otros mamíferos silvestres y domésticos), y la otra en el hospedero invertebrado (triatómino).

La primera fase se inicia con la penetración de tripomastigotes metacíclicos (formas infectantes). Cuando un triatómino infectado pica a un individuo sano, succiona tal cantidad de sangre que empuja el contenido intestinal y obliga al insecto a defecar durante la alimentación. Los tripomastigotes metacíclicos expulsados, se encuentran en las materias fecales y penetran la piel a través de la herida de la picadura ó por la piel íntegra, al rascar también son arrastradas por las uñas del individuo hacia otros sitios. Estos tripomastigotes invaden rápidamente las células de los tejidos en donde pierden el flagelo y la membrana ondulante, transformándose en amastigotes, los cuales se multiplican activamente dando origen a gran cantidad de tripomastigotes que al romper las células que los alojan, quedan libres y se diseminan, extendiéndose así la infección a cualquier órgano del cuerpo a través del torrente sanguíneo.

La segunda fase principia cuando los triatóminos ingieren sangre con tripomastigotes circulantes de un humano o un reservorio mamífero. En el tubo digestivo del insecto, los tripomastigotes evolucionan transformándose en promastigotes y epimastigotes, los cuales se dividen activamente en el intestino medio del insecto, y se dirigen a la parte terminal del mismo, donde se convierte en tripomastigotes metacíclicos. Estas formas infecciosas son posteriormente eliminadas con las heces del vector.

La transmisión se inicia nuevamente con la penetración de tripomastigotes metacíclicos al hospedero (10) (20) (37) (54) (Figura 6).

1.5 ECOLOGIA

Es un hecho que la infección se propaga con mayor facilidad cuando las condiciones ecológicas son favorables para la entrada y permanencia de las chinches infectadas en las viviendas humanas, especialmente en medios rurales (36), por lo que se considera necesario resaltar algunos hechos generales en cuanto a la importancia de la ecología del vector de la enfermedad de Chagas.

Se distinguen tres tipos de ciclos de transmisión de T. cruzi (10) .

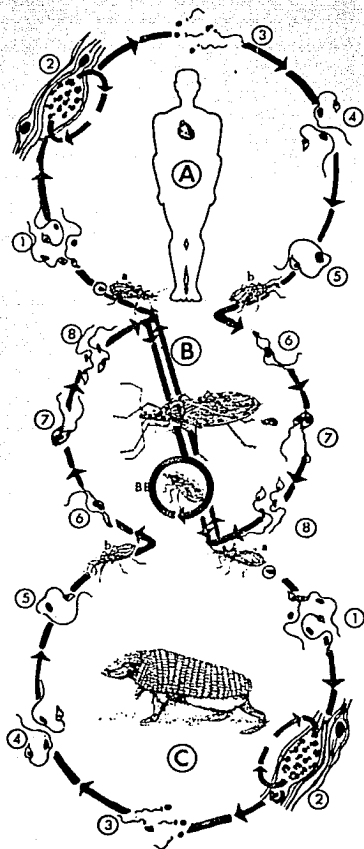


Figura 6 .- Ciclo de vida de *T. cruzi* . Piekarski, G. 1989

(34).

A) Desarrollo en el hombre

- 1.- Tripanosomas metacíclicos en heces fecales del triatómino que infectan al hombre.
- 2 y 3.- Transformación intracelular en diversos órganos en fase de amastigote con marcada multiplicación y desarrollo hacia epimastigote y posteriormente a tripomastigote.
- 4 y 5.- Formas de tripomastigote en sangre periferica.

B) Desarrollo en el intestino del triatómino.

- 6.- Tripanosomas en proceso de división recién succionados de la sangre del hombre.
- 7.- Transformación a epimastigote.
- 8.- Tripanosoma metaciclico en heces fecales del triatómino.
- BB.- Coprofagia y canibalismo que permiten la infección de triatóminos juvenes en etapa larval del desarrollo.

C) Desarrollo en reservorios (armadillo, tlacuache, perro y otros animales)

- | | |
|---|-----------|
| 1.- De hombre a hombre. | A - B - A |
| 2.- De animal a animal (reservorio). | C - B - C |
| 3.- De animal a hombre y viceversa. | C - B - A |
| | A - B - C |
| 4.- De triatómino a triatómino por medio de la coprofagia y canibalismo (34). | BB |

CICLO DOMESTICO

Es mantenido por el hombre, animales domésticos (perro, gato) y triatóminos domésticos o intradomiciliarios.

El doméstico es indudablemente el más importante de los ciclos para mantener la transmisión de la enfermedad de Chagas en áreas semirurales desde que el hombre y los animales reservorios conviven juntos en la casa (13).

CICLO SILVESTRE

Comprende algunos roedores, armadillos y otros mamíferos silvestres y triatóminos de hábitos silvestres, estos últimos actúan como vectores de la enfermedad propagándola a los animales silvestres (vertebrados) que fungen como reservorios (13).

CICLO PERIDOMESTICO

Es considerado como un enlace entre los dos anteriores. Está integrado por los vertebrados como el tlacuache que habitan en los alrededores de las casas y por triatóminos de hábitos silvestres, que están en proceso de adaptación a la vivienda humana (13).

Es un hecho que la vivienda rural reúne todas las condiciones necesarias para la instalación y desarrollo del triatómino. Con materiales tales como barro, ramas, piedras, etc., e incluso elementos improvisados que favorecen la producción de grietas y, sumadas a condiciones de falta de higiene, tales como la permanencia de animales domésticos dentro de las casas por la noche, falta de ventilación e iluminación, se da un hábitat inmejorable para los triatóminos de hábitos domiciliarios (28).

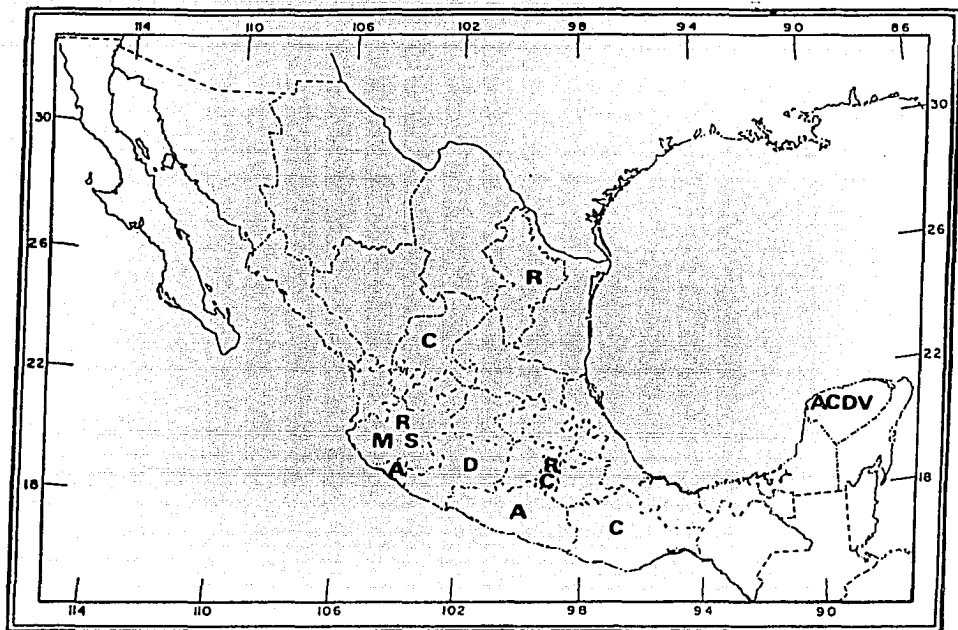
2.0 HIPOTESIS

Debido a la presencia de la enfermedad de Chagas y del vector asociado a ella, se espera encontrar animales domésticos que funjan como reservorios de dicha enfermedad en la Jurisdicción Sanitaria 2 de Jojutla, Morelos.

3.0 JUSTIFICACION

Los estudios realizados sobre los reservorios de T. cruzi en nuestro país son muy escasos (Figura 7); sin embargo, el hecho de que algunos animales domésticos (perro, cerdo, gato, etc.) estén parasitados naturalmente, abre perspectivas interesantes para investigar la parasitosis en animales de importancia económica.

La repercusión de la convivencia del hombre con animales reservorios, y vectores de la enfermedad, se refleja en el aumento del riesgo de infección en la población humana.



V = Bos taurus (toro)

C = Canis familiaris (perro)

A = Dasypus novemcinctus mexicanus (armadillo)

D = Didelphis marsupialis (tlacuache)

M = Mus musculus (ratón)

R = Rattus norvegicus (rata noruega)

S = Sciurus vulgaris (ardilla)

Figura 7.- Reservorios infectados con T. cruzi encontrados en México hasta 1991.

4.0 OBJETIVOS

- 1.- Conocer los índices de infección natural por T.cruzi en reservorios domésticos ó sinantrópicos en las diversas localidades del municipio de Jojutla, Morelos.**
- 2.- Realizar los estudios parasitológicos directos e indirectos en cada mamífero muestreado para evidenciar la presencia del parásito.**
- 3.- Determinar las curvas de parasitemia de las cepas aisladas en ratón.**

5.0 ZONA DE ESTUDIO

El estado de Morelos se localiza en la vertiente sur de la Sierra Volcánica transversal; forma parte de la cuenca del río Balsas, región situada entre la Sierra Madre del Sur y las montañas de la Mixteca, en Oaxaca.

Se encuentra entre los paralelos $18^{\circ} 22' 06''$ y $19^{\circ} 07' 10''$ de latitud norte y los meridianos $98^{\circ} 03' 08''$ de longitud oeste de Greenwich (Figura 8).

Morelos limita al norte con el Distrito Federal y el Estado de México, al este y sureste con Puebla, al sur y suroeste con Guerrero y al oeste con el Estado de México. Tiene una superficie de 4941 km^2 , que representan el 0.25% de la totalidad del país.

El clima es subhúmedo cálido en el sur del estado, pero a medida que es mayor la altitud, hacia el norte, se vuelve semicálido y después templado en las laderas de la sierra del Ajusco, semifrío entre 2800 m y 4000 m y frío en las cumbres del Popocatepetl. La época lluviosa del estado es en el verano y principios del otoño.

La corriente principal es el río Grande de Amacuzac, que pasa del Estado de México al de Morelos, cruzando éste en dirección oeste-sur. Los afluentes del Amacuzac en territorio morelense son: el Tetecala y Chalma (nace en el estado de México) y su afluente el Tembembe; el Yautepec (Tetlama en su curso inferior) y su afluente el Jojutla el cual aumenta su caudal con los numerosos arroyos que bajan por las barrancas de la ladera donde se asienta la ciudad de Cuernavaca (59).

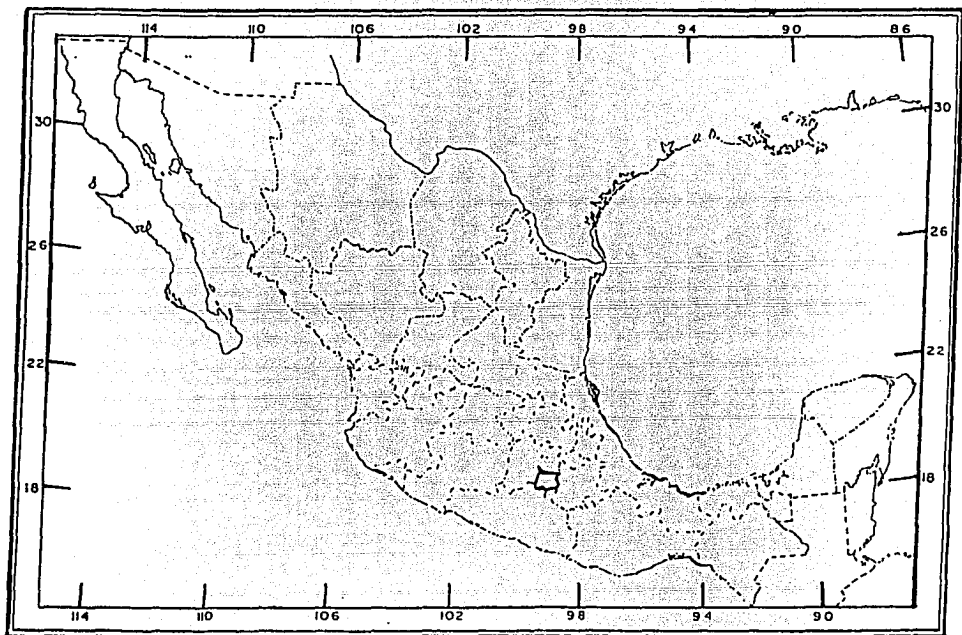


Figura 8.- Localización de la zona de estudio.

Entre las lagunas principales se encuentran: Tequesquitengo, Coatetelco y El Rodeo; el estado cuenta con numerosos manantiales de aguas termales.

Los suelos más abundantes son litosoles, regosoles, suelos derivados de cenizas volcánicas, andosoles, vertisoles, rendzinas negras y rojas, oxisoles (lateríticos) e hidromórficos(59).

La superficie total forestal es de 320,000 hectáreas, de las cuales 41,600 están arboladas; 165,300 hectáreas son arbustivas y 117,350 se destinan a otros usos, principalmente agropecuarios. Las especies que más se explotan son el pino y el oyamel.

Su agricultura es de temporal y de riego, los productos principales son: caña de azúcar, arroz, jitomate, frijol, maíz, algodón, así como frutas.

La ganadería ha alcanzado gran desarrollo durante los últimos años debido principalmente al cultivo de plantas forrajeras con alto valor alimenticio. Las principales especies que se crían en el estado son: bovinos, porcinos, caprinos, ovinos y equinos.

El estado se encuentra integrado por 33 municipios que son: Amacuzac, Atlatlahucan, Axochipan, Ayala, Coatlán del Río, Cuautla, Cuernavaca, Emiliano Zapata, Huitzilac, Jantetelco, Juitepec, Jojutla, Jonacatepec, Mazatepec, Miacatlán, Ocuituco, Puente de Ixtla, Temixco, Tepalcingo, Tepoztlán, Tetecala, Tetela del Volcán, Tlanepantla, Tlaltizapán, Tlaquiltenango, Tlayacapan, Totoloapan, Xochitepec, Yantepec, Yecapixtla, Zacatepec, Zacualpan y Temoac

(1).

Para realizar el presente estudio se eligió el municipio de Jojutla (Figura 9), el cual está situado geográficamente entre los 18° 36' latitud Norte y 99° 10' longitud Oeste a 890 m.s.n.m. Es la ciudad y cabecera municipal del Estado de Morelos, tiene 20 000 habitantes y se encuentra en el Valle de Jojutla, que es regado por el río Tetlama el cual es afluente del Yautepec. Su nombre primitivo fue Axoxotla. Está integrado por las siguientes localidades(1):

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1.- Acamilpa | 12.- Quilamula |
| 2.- Ahuehuetzingo | 13.- San José de Pala |
| 3.- Ajuchitlán | 14.- San José Vista Hermosa |
| 4.- Higuierón | 15.- Santa Rosa Treinta |
| 5.- Huajintlán | 16.- Tehuixtla |
| 6.- Huautla | 17.- Tequesquitengo |
| 7.- Jojutla | 18.- Ticumán |
| 8.- La Tigra | 19.- Tilzapotla |
| 9.- Lorenzo Vázquez | 20.- Tlalquitenango |
| 10.- Pedro Amaro | 21.- Tlaltizapan |
| 11.- Puente de Ixtla | 22.- Xochipala |
| | 23.- Xoxocotla |

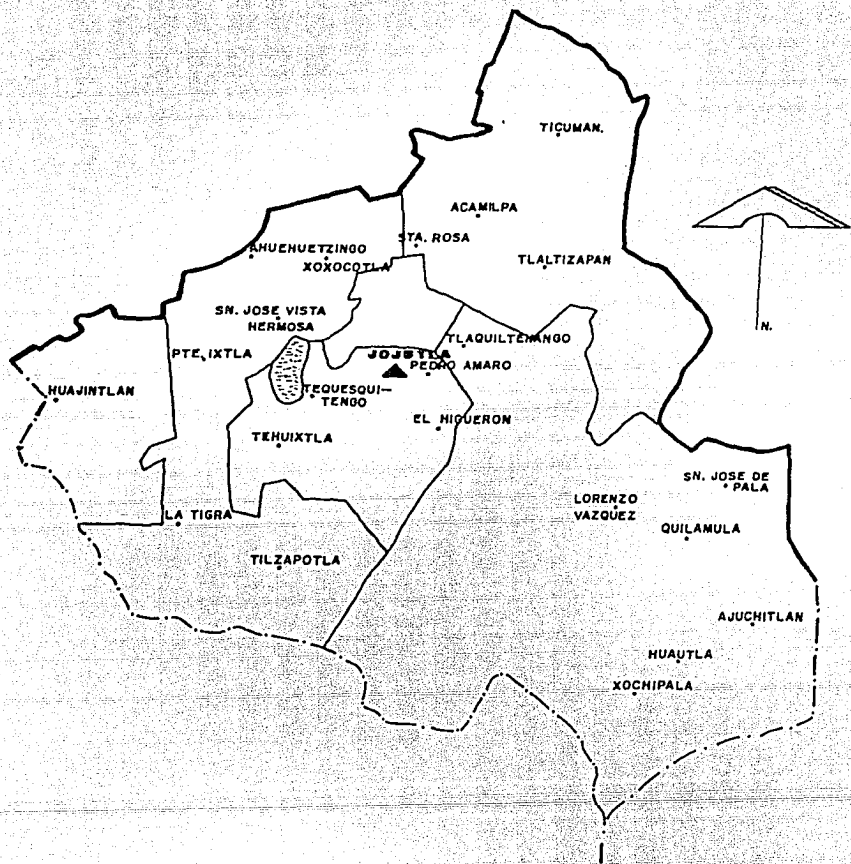


Figura 9.- Ubicación de poblaciones de la Jurisdicción Sanitaria No. II Jojutla, Morelos.

6.0 MATERIAL Y METODO

6.1 MATERIAL

6.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Mus musculus cepa CD 1 (ratón blanco)

Triatóminos de la especie Triatoma pallidipennis.

6.1.2 COLECTA DE SANGRE DE LOS ANIMALES MUESTREADOS

Tubos con medio de cultivo Novy, Mac Neal y Nicolle (NNN)

Jeringa de 5 y 10 ml.

Bozal.

Torundas con alcohol.

Cuerda de 10m y 15m.

Torundas con Xilol.

Etiquetas adhesivas.

Porta objetos.

Navaja.

Ligadura.

Papel serológico.

6.1.3 ELABORACION DE MEDIO DE CULTIVO Novy, Mac Neal y Nicolle(NNN)

Agar nutritivo ----- 14 gr

Cloruro de Sodio (Na Cl)----- 6 gr

Sangre (Borrego, Carnero, Humano)----- 50 ml

Suspender en 900 ml de agua destilada fría.

Autoclave.

6.1.4 INOCULACION EXPERIMENTAL EN RATON BLANCO.

Para incrementar los aislados se ocuparon 6 ratones blancos para cada uno.

Para estudio experimental, 10 ratones blancos para cada aislado.

El material empleado para esta técnica fue el siguiente:

Citrato al 3.4 % .	Jeringas de 1 ml.
Cajas Petri.	Cámara mortuoria.
Eter.	Algodón.
Pipeta Pasteur.	Bulbo de goma.
Guantes.	Torundas con alcohol.
Cámara de Newbauer.	Pipetas para contar glóbulos.
Solución salina isotónica.	Agua destilada.
Esteriomicroscopio Olympus con escala de aumentos de :	
0.25, 0.65 y 1.25x y oculares de 10X/18L.	

6.1.5 TINCIÓN DE FROTIS

Porta objetos desengrasados.	Alcohol.
Franela.	Cajas para tinción.
Wright.	Giemsa.

Para Impregnación Argéntica

REACTIVOS

Formol ----- 10%
Permanganato de Potasio----- 0.25%
Metanol Puro

Proteinato de Plata.

Agua bidestilada ----- 90 ml
Gelatina en Polvo ----- 1.8 gr
Solución de Nitrato de Plata----- 2%
tomar 10 ml

Acido oxálico al ----- 2%
Hidroquinona al ----- 1%
en solución de sulfato de sodio al-- 5%
Cloruro de oro ----- 1%
Tiosulfato de sodio ----- 5%
Etanol ----- 70%

Isopropanol Absoluto

Xilol

Resina sintética.

Para Tinción Wri Roth-Giems a

Metanol puro.

Colorante Wri Roth pH 6.47

Colorante Giemsa pH 7.2

Agua destilada.

6.1.6 ELABORACION DE PRUEBAS SEROLOGICAS

Buffer pH 8

Amortiguador de Buffer de Fosfatos Salino pH 8.

Eritrocitos con antígeno para T. cruzi

Eritrocitos de carnero sin antígeno.

Tubos de Wasserman.

Pipetas de 1 ml.

Espátula delgada.

Tijeras.

Papel parafilm.

Placas para microtitulación con fondo en U.

Micropipetas.

Microdiluctores de 0.025 ml.

Baño María.

Termómetro.

Congelador.

6.1.7 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

Cámara mortuoria. Formol al 10%.
Tijeras de disección rectas. Guantes.
Frascos de vidrio de 50ml. de capacidad con tapa de rosca.
Gasa cortada en cuadros de 4 cm. de lado.
Estufa para cortes histológicos y parafina.
Material para inclusión de tejidos.
Microtomo. Baño María.
Portaobjetos de 25 x 75 mm. Cubreobjetos de 22 x 22 mm.
Cajas para tinción. Canastillas para tinción.
Colorantes para técnicas de Hematoxilina-Eosina.
Microscopio Olympus.

6.1.8 XENODIAGNOSTICOS

Triatoma pallidipennis de quinto estadio y adultas.
Cajas para xenodiagnóstico.
Tul de nylon. Portaobjetos y cubreobjetos.
Solución Ringer. Pipetas de 1 ml.
Microscopio Olympus.

6.2 METODOLOGIA

Se visitó cada una de las localidades del municipio de Jojutla, Morelos (Figura 10) en busca de reservorios domésticos de T. cruzi durante 1990 - 1991, dividiendo en 7 periodos las 22 localidades de la siguiente manera:

- a) Del 13 al 16 de julio de 1990
- b) Del 06 al 13 de agosto de 1990
- c) Del 08 al 11 de diciembre de 1990
- d) Del 28 al 01 de mayo de 1991
- e) Del 22 al 26 de julio de 1991
- f) Del 14 al 18 de septiembre de 1991
- g) Del 03 al 06 de noviembre de 1991

Durante estos períodos todas las muestras recolectadas en las distintas localidades se procesaron en el laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina, algunas de ellas se procesaron con más tiempo abarcando del mes de febrero al mes de agosto de 1992 .

Se muestrearon 76 animales mamíferos domésticos en total, los cuales fueron bovinos, ovinos, porcinos, caninos y caprinos (Tabla 1), pertenecientes a los ranchos del municipio estudiado. Para la obtención de las muestras de sangre periférica fue necesario sujetar a los animales y escoger, dependiendo de la



Figura 10.- Foto que muestra las diferentes zonas de estudio; a) comunidad urbana (Jojutla), b) comunidad rural (Xochipala), c) comunidad rural (Quilamula), d) comunidad rural (Ajuchitlán).

Cortesía M. en C. Norma Bautista-López.

especie, el lugar más conveniente para efectuar la punción con jeringa; sujetar al ejemplar (como es el caso de los perros Figura 11), amarrarlo, colocar el bozal, e inmovilizarlo para la toma de sangre, procedimientos muy laboriosos en los que se utilizó un tiempo promedio de 15 minutos; en algunos casos los mismos lugareños prestaban auxilio en ésto facilitando la labor. Por otra parte, los bovinos y equinos por su tamaño, entre otras características, requieren de un manejo especial, así en el caso de los bovinos se les sujetó con cuerda por los cuernos y se les amarró a postes ó barrotes para inmovilizarlos, otra forma fue lazarlos y acostarlos para tomar muestra por la vena yugular, que fue más problemático, sobretodo por la falta de experiencia.

No se utilizó anestesia ya que los propietarios no lo permitían alegando que podría ocasionarles algún daño, aun así al efectuar punción para extraer sangre preguntaban si no les perjudicaría de alguna forma esto, incluso en forma ocasional se llegaron a molestar aunque se contaba con el permiso por parte del jefe de familia.

El volumen de sangre en cada extracción fue de 4 ml, con la cual se realizaron los diversos procedimientos.



Figura 11.- Foto en la cual se observa la toma de muestra sanguinea de un canino.

6.2.1 CULTIVOS

De los 4 ml de sangre obtenida, se inocularon 2 ml en tubos de ensaye conteniendo Medio de Cultivo NNN para T. cruzi, (4).

Preparación del Medio de Cultivo Novy, Mac Neal y Nicolle (NNN).

- Disolver perfectamente el agar y la sal en un matraz de 1000 ml y agregar 900 ml de agua destilada.
- Esterilizar en autoclave a 120° C a 15 libras durante 15' manteniendo a esta temperatura.
- Tomar sangre de borrego, conejo ó humano (las dos primeras partes se desfibrinan o se usa anticoagulante en condiciones estériles).
- Se deja enfriar el agar aproximadamente a 50°C y se añaden 50 ml de sangre agitando para homogenizar.
- Repartir en tubos de ensaye hasta la mitad, en una campana totalmente estéril, dejar que coagule la sangre en una área aparte.
- Agregar solución Ringer aproximadamente 1 1/2 veces la cantidad de fase sólida.
- Incubar de 24°C a 37°C por un período de 24 a 48 horas como prueba de esterilidad (4)(61) .

6.2.2 CURVAS DE CRECIMIENTO (PARASITEMIA)

Las dos cepas obtenidas fueron aisladas en medios de cultivo (NNN), y se inocularon en 6 ratones blancos cepa CD 1 (Mus musculus) para la obtención de mayor número de tripomastigotes sanguíneos; los ratones se sacrificaron a los 45 días y se efectuó un concentrado, obteniendo 1×10^7 tripanosomas, con esta sangre se inoculó, vía intraperitoneal 1×10^6 tripomastigotes a 20 ratones blancos cepa CD1 (10 para cada cepa).

Posteriormente se efectuaron lecturas sanguíneas cada tercer día en la cámara de Neubauer, empleando pipetas para contar glóbulos blancos, se tomó la sangre seccionando el extremo de la cola de los ratones; el conteo se prolongó durante 30 días para determinar la cantidad de tripomastigotes por ml. a cada uno de los ratones (45).

6.2.3 FROTIS

Con los 2 ml de sangre restante se realizaron frotis y métodos serológicos.

Para los frotis en el extremo de un portaobjetos desengrasado se colocó una gota de sangre, con otro portaobjetos se arrastró la gota a lo largo del borde del primero, haciéndolo con un movimiento firme. Se fijó con alcohol metílico y posteriormente se procedió a la doble tinción Wright-Giemsa (25), y fueron observados al microscopio con el fin de identificar tripomastigotes.

Para efectuar gota gruesa en un portaobjetos desengrasado se colocó una gota de sangre, con el ángulo de otro portaobjetos se extendió, se dejó secar y posteriormente se procedió a la tinción indicada en el párrafo anterior (44).

La técnica descrita corresponde a un método de concentración, y se basa en el hecho de que al romper los glóbulos rojos, (desfibrinización), pierden toda su hemoglobina, lo que hace que los eritrocitos que están acumulados no impidan la observación de los parásitos que se encuentran distribuidos en varias capas (44).

En algunos casos en la tinción de frotis sanguíneo y de medios de cultivo se utilizó la Impregnación Argéntica modificada por Rugerio y Mansilla, 1991 (41) que se detalla a continuación:

La solución de Proteinato de Plata se preparó de la siguiente manera:

- Calentar 90 ml de agua bidestilada sin que hierva para disolver la gelatina.
- Dejar enfriar a una temperatura aprox. a 30°C, añadir 10 ml de la solución de nitrato de plata al 2% .Mezclar bien.
- Guardar en frasco ámbar de boca ancha.

Método de Impregnación.

- 1.- Se fijan los frotis en vapores de formol al 10% durante 10', cuidando de que no hierva.
- 2.- Sumergir los frotis en permanganato de potasio al 0.25% durante 7'.
- 3.- Lavar en agua bidestilada 3 veces durante 1'.
- 4.- Colocar en ácido oxálico al 2% durante 5'.
- 5.- Lavar en agua bidestilada 3 veces durante 1' cada uno.
- 6.- Impregnar en nitrato de plata a 37°C durante 48 horas.
- 7.- Lavar en agua bidestilada 3 veces durante 1' cada uno.
- 8.- Sumergir en hidroquinona al 1% durante 8'.
- 9.- Enjuagar en agua bidestilada 3 veces, 1' cada uno.
- 10.- Poner en cloruro de oro al 1% durante 5'.
- 11.- Lavar en agua destilada 1 vez.
- 12.- Colocar en ácido oxálico al 2% durante un periodo de 3' a 5'.
- 13.- Lavar en agua 3 veces durante 1' cada uno.
- 14.- Sumergir en tiosulfato de sodio al 5% durante 8 minutos.
- 15.- Lavar en agua destilada 3 veces, 1' cada uno.
- 16.- Colocar en etanol al 70% durante 1'.
- 17.- Poner en isopropanol absoluto 2 cambios durante 1' cada uno.
- 18.- Sumergir en xilol durante 1' una vez.
- 19.- Montar en resina sintética.

6.2.4 METODOS SEROLOGICOS (para detección de anticuerpos inducidos por la presencia de T. cruzi).

El resto de la sangre obtenida se colocó en papel serológico utilizando uno por cada animal muestreado, realizando lo siguiente:

- 1.- Listado de los papeles serológicos (números progresivos).
- 2.- Numeración de los tubos para la serología (números progresivos).
- 3.- Corte del papel serológico con la muestra de sangre, colocándolo en el tubo correspondiente.
- 4.- Adición de 0.4 ml de buffer pH 8.
- 5.- Introducción de cada uno de los círculos de papel serológico en el fondo del tubo.
- 6.- Los tubos, previamente tapados con papel parafilm se dejaron reposar durante 24 h a temperatura ambiente.
- 7.- Extracción de los papeles del elúido colocando los sueros a baño maría durante 30' a 56°C para descomplementarizar.
- 8.- Cada una de las placas para microtitulación con fondo en " U " se numeraron , llenando cada pozo con 25 microlitros de amortiguador de buffer de fosfatos salino pH 8, excepto la primera hilera.
- 9.- En cada pozo de la primera hilera se vertieron 50 microlitros del suero problema.
- 10.- Se realizaron diluciones seriadas con microdilutores de 25 microlitros, excepto la última hilera.

- 11.- En cada uno de los pozos de las placas se agregaron 25 microlitros de eritrocitos con antígeno, excepto la penúltima hilera.
- 12.- En la penúltima hilera se agregaron eritrocitos de carnero sin antígeno.
- 13.- Se agitaron todas las placas para homogenizar, dejando 2 en reposo a 4°C .
- 14.- La lectura de las placas se realizó a las 2 horas y a las 24 horas.

6.2.5 TECNICAS HISTOLOGICAS PARA DETECCION DE AMASTIGOTES

Terminado el tiempo de revisión de los ratones (30 días), se sacrificaron ó al morir antes del tiempo establecido, se les tomaron muestras de los órganos : cerebro, corazón, pulmón, estómago, intestino, hígado, bazo, músculo, riñón y ganglio, lavándolos con agua y fijándolos en formol al 10% ; posteriormente se efectuó la deshidratación, aclaración e inclusión en parafina para efectuar cortes de 7µm en el microtomo, realizando 10 cortes de cada órgano a distintos niveles que se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina y se montaron en resina (18).

De las laminillas se revisaron 100 campos de cada corte con objetivos de 40x y 100x para contar los nidos de amastigotes y determinar tropismo (46).

6.2.6 XENODIAGNOSTICO

Se escogieron al azar 5 localidades de la Jurisdicción, en las cuales se realizó en el campo xenodiagnóstico a caninos, porcinos, equinos y bovinos, utilizando Triatoma pallidipennis (quinto estadio de desarrollo y adultos, Figura 1) cultivadas en el laboratorio de Biología de Parásitos, libres de infección. Se introdujeron 5 triatóminos en cajas para xenodiagnóstico que se cubrieron con tul de nylon, y se colocaron en la parte abdominal, libre de pelo de cada uno de los animales, por un período de 30 minutos.

Se revisaron los triatóminos a los 5 días, colocando en un portaobjetos una gota de solución Ringer y las deyecciones de los mismos obtenidas al oprimir el abdomen. Esto se efectuó cada 3 días durante 3 meses, posteriormente las revisiones se hicieron cada 5 días durante 1 mes.

Este es un método que permite detectar tripomastigotes metacíclicos mediante el empleo de triatomas.

7.0 RESULTADOS

A continuación se enlistan los resultados obtenidos en cada una de las pruebas realizadas.

7.1 Localidades muestreadas

■ En la tabla I se observan las localidades revisadas y se puede apreciar que hay tres de ellas en las que no se encuentran ejemplares muestreados como son: Ticumán con 6 viviendas, Tilzapotla con 9 y Jojutla con 56 ya que no tenían ningún animal doméstico en sus casas.

7.1.1 TOMA DE MUESTRA EN MEDIOS DE CULTIVO.

En los medios de cultivo de sangre NNN se encontraron 2 positivos a los 7 días de inoculación (Figura 12), estos correspondieron a las localidades de Acamilpa, clave E.2, obtenida la muestra de un canino hembra. La segunda fue de la localidad la Tigra, clave L.T.4, de un porcino hembra .

7.2 OBTENCION DE AISLADOS.

■ En los ratones blancos CD1 inoculados con T. cruzi se pudo observar, en el transcurso que duró el estudio, lo siguiente: el aislado L.T.4 del cerdo tuvo un rango de tiempo muy corto para manifestarse y el incremento de parásitos fue constante, hasta que los ratones murieron por la parasitemia; en tanto que en el aislado E.2 del perro, la parasitemia tardó en manifestarse en los roedores, y éstos tuvieron un rango de sobrevivencia mayor como se muestra en la Tabla II y en forma comparativa en la gráfica I.

**Tabla.-I LOCALIDADES MUESTREADAS EN LA JURISDICCION SANITARIA 2
 JOJUTLA MORELOS, EN LAS CUALES SE OBSERVA EL NUMERO Y
 EJEMPLAR REVISADO.**

LOCALIDAD	BOVINO	OVINO	PORCINO	CANINO	CAPRINO	TOTAL
Acamilpa	3			3	1	7
Ahuehuetzingo			4	3		7
Ajuchitlán			2			2
Higuerón				2		2
Huajintlán	1		1	1		3
Huautla			3	2		5
Jojutla						
La Tigra			1	3		4
Lorenzo Vázquez				5		5
Pedro Amaro		1	1	1		3
Puente de Ixtla				3		3
Quilamula				1		1
San José de Pala			2	1		3
San José Vista Hermosa		1	2	3		6
Santa Rosa Treinta				2		2
Tehuixtla				6		6
Tequesquitengo			1	2		3
Ticumán						
Tilzapotla						
Tlalquitenango			1	6		7
Tlaltizapán			1	2		3
Xochipala			1	1		2
Xoxocotla				2		2

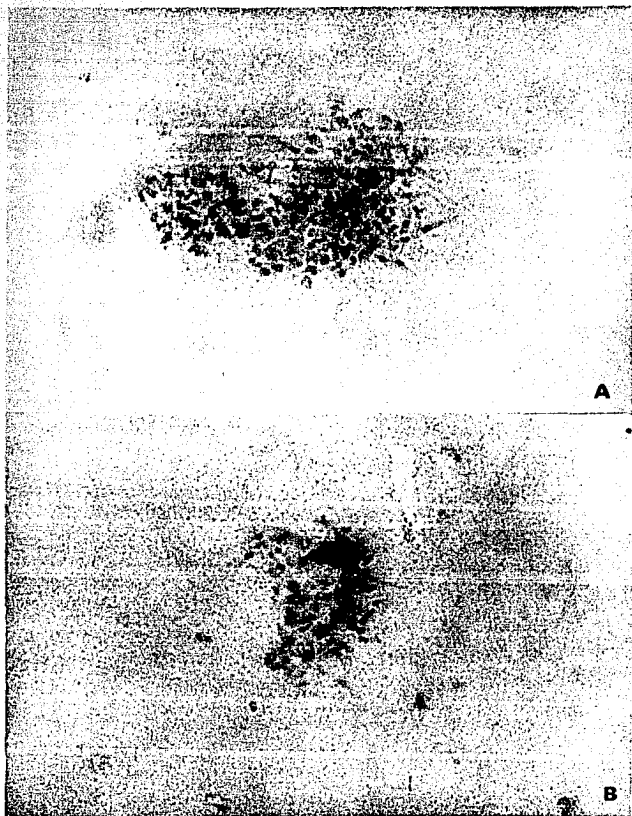


Figura 12.- Foto de epimastigotes agrupados en rosetas de los aislados en estudio, donde se observa su morfología: a) aislado Acamilpa (E.2) 40x y b) aislado La Tigra (L.T.4) 40x.

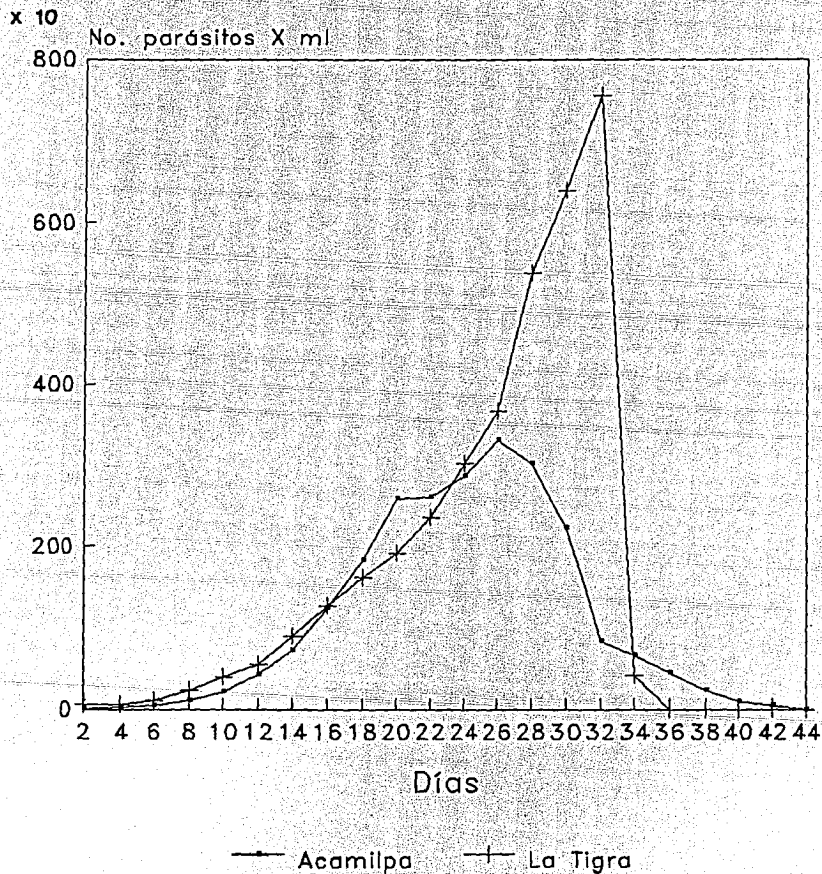
TABLA II.- COMPARACION DE LAS CURVAS DE PARASITEMIA EN RATON BLANCO INOCULADOS CON 1×10^5 TRIPOMASTIGOTES SANGUINEOS AISLADOS DE MAMIFEROS DOMESTICOS.

LOCALIDAD	1	2	3	4	5	6
ACAMILPA (E.2)	9	466	0.5	49	8	44
LA TIGRA (L.T.4)	6	905	3.0	36	6	36

CLAVES:

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 - DIAS DE APARICION | 4 - DIAS MAX. DE PARASITEMIA |
| 2 - NO. MAX. DE PARASITOS 1×10^5 | 5 - MUERTOS |
| 3 - NO. MIN. DE PARASITOS 1×10^5 | 6 - DIA DE DESAPARICION DE PARASITO |

GRAFICA I.- Curvas de parasitemia obtenidas experimentalmente en el ratón blanco Mus musculus CD 1 infectado con aislados L.T.4 y E.2.



En la gráfica mencionada se muestran las curvas de crecimiento del parásito, cepa E.2 y L.T.4, en las cuales se aprecia que la parasitemia más alta la tiene el aislado L.T.4, con un incremento de 759.2×10^5 , siendo casi el doble del aislado E.2 el cual es de 331.4×10^5 .

7.3 FROTIS.

■ De un total de 150 frotis revisados con objetivo de 40x, sólo 2 resultaron positivos (Figura 13) correspondiendo al 1.3 % positivo del total efectuado.

7.4 PRUEBAS SEROLOGICAS.

■ En la hemaglutinación indirecta la reactividad del suero se manifiesta por la formación de un manto que cubre el fondo del pozo de las cajas de microtitulación. Así mismo, la falta de dicha reactividad se evidencia por la sedimentación del antígeno en forma de un botón considerándose negativos; se tomaron como títulos positivos las diluciones de 1:16 en adelante, en la Tabla III se pueden observar los títulos obtenidos para cada especie muestreada así como la clave que se le asignó y la localidad a la que pertenece.

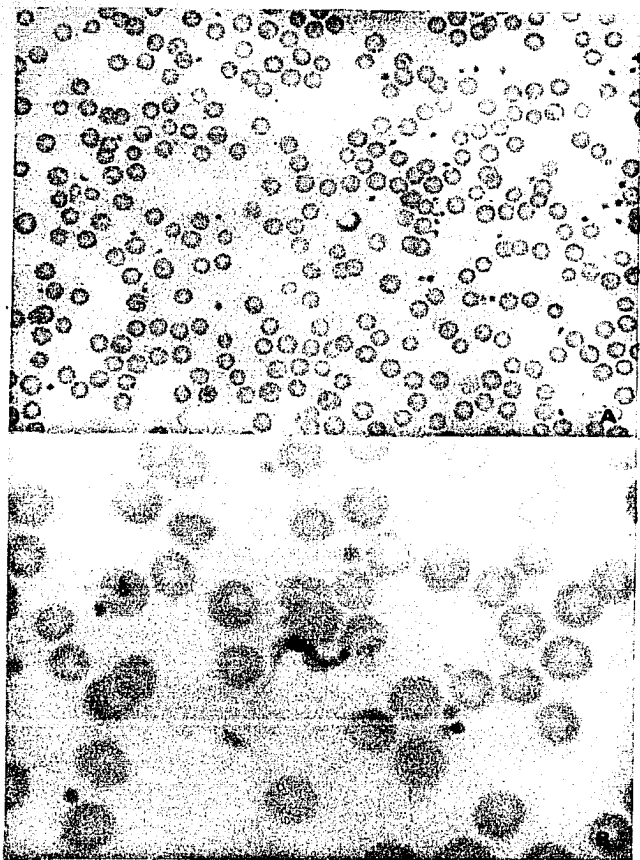


Figura 13.- Fotos de tripomastigotes sanguíneos de T. cruzi en las que se observan a) aislado Acamilpa (E.2) 40x y b) La Tigra (L.T.4) 100x.

La tabla IV muestra los resultados de la hemaglutinación indirecta en porcentaje para cada título y especie. El primer dato importante que se desprende de este análisis es que, de 76 individuos muestreados serológicamente (tomando en consideración la positividad en las diluciones 1:16), 16 (21.05%) resultaron positivos para esta prueba , 11 (14.5%) fueron para los títulos de 1:16 y 5 (6.8%) para títulos 1:32, en relación al total; también es digno de considerarse el hecho de que 24 resultaron con anticuerpos para T. cruzi con una titulación de 1:8.

TABLA III.- TITULOS OBTENIDOS EN HEMAGLUTINACION INDIRECTA PARA T. cruzi EN LAS DIFERENTES ESPECIES MUESTREADAS.

LOCALIDAD	CLAVE	ESPECIE	TITULO
ACAMILPA	E.1	CAPRINO	1:8
	E.2	CANINO	1:16
	E.3	CANINO	----
	E.4	CANINO	1:16
	E.5	BOVINO	----
	E.6	BOVINO	----
	E.7	BOVINO	1:32
AHUEHUETZINGO	A.H.1	CANINO	----
	A.H.2	PORCINO	----
	A.H.3	PORCINO	----
	A.H.4	CANINO	1:8
	A.H.5	CANINO	----
	A.H.6	PORCINO	----
	A.H.7	PORCINO	----
AJUCHITLAN	A.1	PORCINO	----
	A.2	PORCINO	1:8
HIGUERON	E.H.1	CANINO	----
	E.H.2	CANINO	----
HUAJINTLAN	H.1	CANINO	1:8
	H.2	BOVINO	1:8
	H.3	PORCINO	1:8
HUAUTLA	M.1	CANINO	----
	M.2	CANINO	----
	M.3	PORCINO	----
	M.4	PORCINO	----
	M.5	PORCINO	----
LA TIGRA	L.T.1	CANINO	----
	L.T.2	CANINO	----

	L.T.3	CANINO	----
	L.T.4	PORCINO	1:16
LORENZO VAZQUEZ	L.V.1	CANINO	1:8
	L.V.2	CANINO	1:8
	L.V.3	CANINO	1:16
	L.V.4	CANINO	1:8
	L.V.5	CANINO	1:8
PEDRO AMARO	P.A.1	OVINO	1:8
	P.A.2	PORCINO	----
	P.A.3	CANINO	----
PUENTE DE IXTLA	P.I.1	CANINO	1:32
	P.I.2	CANINO	1:16
	P.I.3	CANINO	1:32
QUILAMULA	Q.L.1	CANINO	1:8
S.JOSE DE PALA	S.J.P.1	PORCINO	1:8
	S.J.P.2	PORCINO	1:8
	S.J.P.3	CANINO	1:8
S.JOSE VISTA HERMOSA	S.V.1	CANINO	----
	S.V.2	CANINO	----
	S.V.3	CANINO	----
	S.V.4	OVINO	----
	S.V.5	PORCINO	----
	S.V.6	PORCINO	----
SANTA ROSA TREINTA	S.R.1	CANINO	----
	S.R.2	CANINO	----
TEHUIXTLA	T.1	CANINO	1:8
	T.2	CANINO	1:8
	T.3	CANINO	1:16
	T.4	CANINO	1:16
	T.5	CANINO	1:8
	T.6	CANINO	1:8
TEQUESQUITENGO	TE.1	CANINO	----

	TE.2	CANINO	----
	TE.3	PORCINO	1:8
TLALQUITENANGO	T.L.1	CANINO	1:16
	T.L.2	CANINO	----
	T.L.3	CANINO	1:16
	T.L.4	CANINO	1:16
	T.L.5	PORCINO	1:32
	T.L.6	CANINO	----
	T.L.7	CANINO	1:32
TLALTIZAPAN	TL.1	CANINO	----
	TL.2	CANINO	----
	TL.3	PORCINO	1:8
XOCHIPALA	XCH.1	CANINO	----
	XCH.2	PORCINO	1:16
XOXOCOTLA	X.1	CANINO	1:8
	X.2	CANINO	1:8

**TABLA IV .- NIVELES DE ANTICUERPOS HEMOAGLUTINANTES CONTRA
T. cruzi EN LAS DIFERENTES ESPECIES MUESTREADAS**

ESPECIE	NEGATIVO	1:4	1:8	1:16	1:32	TOTAL
BOVINO	2(50%)	0(0.0%)	1(25%)	0(0.0%)	1(25%)	4
OVINO	1(50%)	0(0.0%)	1(50%)	0(0.0%)	0(0.0%)	2
PORCINO	11(55%)	0(0.0%)	6(30%)	2(10%)	1(5%)	20
CANINO	22(44.9%)	0(0.0%)	15(30.6%)	9(18.4%)	3(6.1%)	49
CAPRINO	0(0.0%)	0(0.0%)	1(100%)	0(0.0%)	0(0.0%)	1

POSITIVOS DE 1:16

7.5 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.

■ En la Tabla V y gráfica II se muestra el promedio de amastigotes contados con objetivo de 100x para cada uno de los cortes histológicos; considerando como 100% la cifra más alta encontrada en diez niveles, siendo ésta 160.2% para el aislado L.T.4, observando que los órganos más afectados son: cerebro, corazón y músculo para el aislado L.T.4 y los dos últimos para E.2 .

(Figuras 14 y 15)

7.6 XENODIAGNOSTICO.

■ De los 30 xenodiagnósticos realizados(Tabla VI) todos resultaron negativos durante los 4 meses en que se revisaron los triatóminos utilizados para dicha prueba.

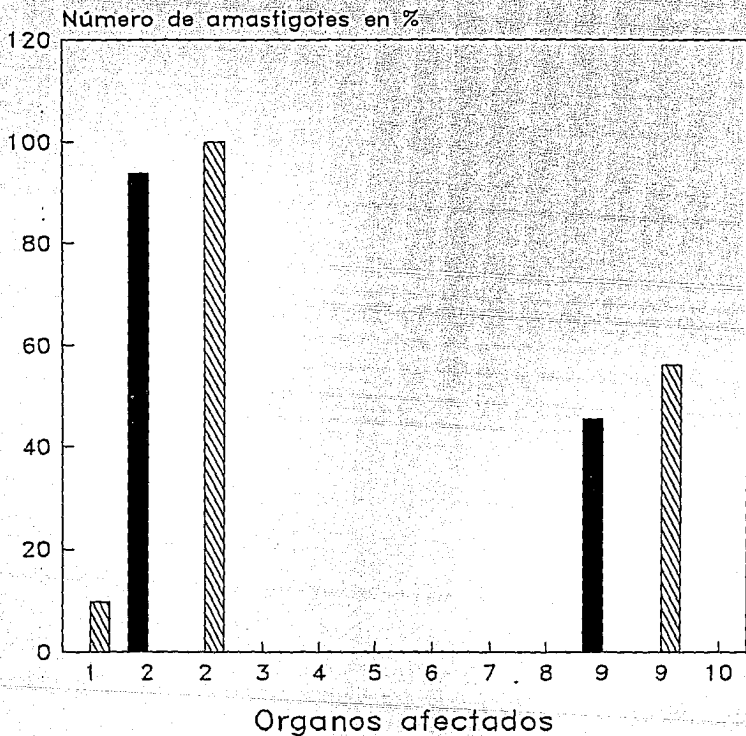
TABLA V PROMEDIO TOTAL EN PORCENTAJE DE NIDOS DE AMASTIGOTES POR CIEN CAMPOS MICROSCOPICOS EN DIFERENTES ORGANOS DE LOS RATONES BLANCOS CEPA CD 1, RECIBIENDO CADA UNO DE ELLOS UN MILLON DE TRIPOMASTIGOTES COMO INOCULO.

LOCALIDAD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ACAMILPA	---	150.2	---	---	---	---	---	---	73.1	---
LA TIGRA	15.6	160.2	---	---	---	---	---	---	90.0	---

CLAVES:

- | | |
|---------------|--------------|
| 1 - CEREBRO | 6 - HIGADO |
| 2 - CORAZON | 7 - BAZO |
| 3 - PULMON | 8 - RIÑON |
| 4 - ESTOMAGO | 9 - MUSCULO |
| 5 - INTESTINO | 10 - GANGLIO |

GRAFICA II . Tropismo de los aislados E.2 y L.T.4 hacia los diferentes órganos y tejidos del ratón blanco, Mus musculus.



■ Acamilla ▨ La Tigra

- | | | | |
|-------------|---------------|-------------|-------------|
| 1.- Cerebro | 4.- Estómago | 7.- Bazo | 10.-Ganglio |
| 2.- Corazón | 5.- Intestino | 8.- Riñón | |
| 3.- Pulmón | 6.- Hígado | 9.- Músculo | |



Figura 14.- Foto que muestra el daño tisular en ratones inoculados con T. cruzi aislado La Tigra L.T.4, a) nidos de amastigotes en cerebro 100x , b) nido de amastigotes en miocardio 40x y c) nido de amastigotes que sigue la dirección de las fibras musculares 40x.



Figura 15.- Foto que muestra el daño tisular en ratones inoculados con T . cruzi aislado Acamilpa E.2, a) nido de amastigote en miocardio 100x y b) nido de amastigote dentro del músculo (1) y amastigotes en la periferia de la fibra muscular (2) 40x.

TABLA VI.- XENODIAGNOSTICOS REALIZADOS EN LAS LOCALIDADES DE JOJUTLA MORELOS. SE UTILIZARON 5 NINFAS DE QUINTO ESTADIO DE LA ESPECIE Triatoma pallidipennis PARA CADA EJEMPLAR.

LOCALIDAD	CANINO	PORCINO	EQUINO	BOVINO
Acamilpa			4	3
Santa Rosa Treinta	3	2	2	
Tlalquitenango	1	2	1	
Xochipala	1	5		
Xoxocotla	3	2	1	

8.0 DISCUSION.

En los frotis teñidos que se hicieron con sangre de los ratones inoculados con los aislados, se logró observar la forma clásica de los tripomastigotes sanguíneos, los cuales han sido ya descritos por muchos autores desde que se evidenciaron por primera vez.

En la Tabla I referente a la toma de muestra sanguínea, destaca que la población de hospederos muestreados aparenta ser pequeña en comparación con el total de localidades y viviendas visitadas, el motivo de ésto está referido en la metodología.

En algunas poblaciones como son Ticumán, Jojutla y Tilzapotla como ya se mencionó, no se muestreó a ningún individuo por el motivo de que no les agradaba tener animales en casa o simplemente los tenían en los corrales ubicados en montes por consiguiente los perros tampoco se encontraban en la casa.

El tiempo máximo del que se disponía para permanecer en cada una de las casas de una población era de una hora y el hecho de tener que cubrir, en algunos casos, hasta diez casas habitación resultaba agotador y muy prolongado, y si a esto aunamos el tiempo invertido en buscar cada vivienda escogida al azar previamente de cada una de las poblaciones de la Jurisdicción Sanitaria No. 2 de Jojutla Morelos, éste fue insuficiente para realizar todo esto.

En nuestro país existen trabajos (6) (23) (28) (53) (55) en los que se encuentra como reservorios de T. cruzi a Didelphis marsupialis, Dasypus novemcinctus y Canis familiaris; hay uno solo en el que se menciona haber infectado experimentalmente a Suis domesticus (Mazzotti y Brumpt 1939), esto es de llamar la atención debido a que en el presente trabajo se encontró un cerdo infectado naturalmente, lo cual refuerza el hecho de que ésta especie es susceptible a ambos tipos de infección. Por otra parte, el Dr. Velasco en 1970 registra positivo a un bovino en el estado de Morelos. Resumiendo estos trabajos, es claro que existen reservorios para la enfermedad de Chagas, sin embargo, no se indica si pudieron seguir los estudios sobre la patogenicidad del parásito ó si lo aislaron en dicho momento y hasta que nivel pudieron continuar con su investigación o simplemente encontraron positivo al organismo y no realizaron un seguimiento del aislado.

Lo contrario a nuestro trabajo en el cual los dos aislados efectuados uno de Canis familiaris y el otro de Suis domesticus, siguieron un análisis detallado efectuándoles Hemaglutinación indirecta, siendo éste trabajo uno de los pocos realizados en México que utiliza está técnica para animales, ya que es muy frecuente manejarla en casos humanos para detectar sero positivos en la enfermedad de Chagas, pero no en animales.

Para efectuar dicha técnica se utilizó un antígeno elaborado (4) en el Laboratorio de Biología de Parásitos de la Facultad de Medicina de la UNAM, previamente comparado con un Ag de referencia.

Este antígeno fue aislado de triatóminos capturados en una población rural de Querétaro, y probado con Ag de otros aislados mexicanos, teniendo un título mayor de positividad en hemaglutinación; el antígeno de referencia fue el otorgado por la Dr. Elsa Segura del Instituto Fatała Chaben de Argentina, el cual está preparado con cepas de ese País.

Para efectuar los xenodiagnósticos se utilizó la técnica del Dr. Hugo Schenone para casos humanos, en la cual emplea de 5 a 10 triatóminos por persona (comunicación personal en su visita a México en el año de 1992); observando al efectuarla que en realidad los triatóminos sí se alimentaron de la sangre de equinos, bovinos, porcinos y caninos, esto se realizó con el fin de poder aislar (si es que existía el hemoflagelado en torrente sanguíneo) el parásito causante de la enfermedad de Chagas, ya que estos animales habían sido picados con frecuencia por los triatóminos, según referencia de sus dueños, y por encontrar estos hemípteros en el lugar donde se guarecen los animales. Al capturar dichos insectos y revisarlos en el laboratorio se encontraron positivos, como se menciona en Bautista, 1993 (5) ; al analizar en el laboratorio las deyecciones de los triatóminos que se utilizaron para el xenodiagnóstico, resultaron todos negativos, sin embargo, la serología efectuada en la muestra de la localidad de Acamilpa (bovinos) el mismo día que el xenodiagnóstico, fue positiva. Con esto podemos pensar que el bovino al ser picado constantemente por los insectos, por un lado generó anticuerpos para T. cruzi y probablemente el parásito se encontraba en la fase de amastigote

alojado en órganos del animal, por lo que no se detectó en su fase sanguínea; el título obtenido en la serología realizada a uno de los ejemplares fue de 1:32 una de las más altas, por lo que con este hecho se puede explicar que efectivamente éste tuvo contacto, en un determinado momento, con el parásito generando de esta manera anticuerpos.

En las curvas de parasitemia podemos ver que en el aislado E.2 (Acamilpa) de un perro se observaron parasitemias hasta de 46×10^6 tripomastigotes sanguíneos por ml, mientras que en el aislado L.T.4 (La Tigra) de un cerdo, se observó una parasitemia de 90×10^6 por ml de sangre. En el aislado E.2 la muerte de los ratones se produjo en el vigésimo sexto día; mientras que la muerte de éstos en el aislado L.T.4 se comenzó a manifestar al décimo séptimo día de efectuada la inoculación. En el aislado E.2 no se presentó agresividad de los ratones entre sí, con un comportamiento aparentemente normal. En el otro aislado L.T.4 se presentó en los animales parálisis del cuarto trasero cuando los parásitos rebasaron los 35×10^6 de tripomastigotes por ml., volviendo a estos agresivos entre sí, incluso ocasionándose daño entre ellos, observándose en general un comportamiento alterado.

Comparando los resultados obtenidos del aislado L.T.4 con los de Bautista, 1993 (5) en el cual se estudió una cepa de las deyecciones de triatóminos, siendo esta también de la localidad Acamilpa, se pudo observar en curvas de crecimiento del flagelado, que la aparición del parásito en sangre en ambos casos se dió con

un día de diferencia (Tabla II), sin embargo en la curva de crecimiento el incremento de la cepa L.T.4 fue significativamente mayor y la muerte de los ratones ocurrió en forma espontánea diez días antes que los de la otra cepa, donde se tuvieron que sacrificar al mes dichos ratones. Con esto se deduce que estos aislados, tanto de triatóminos como de reservorios domésticos tienen el mismo tiempo de aparición, pero diferente tipo de manifestación, ya sea en su crecimiento o en su virulencia, la cual aumenta al pasar de triatómino a mamífero(45).

Se hace notar que el aislado L.T.4 produjo parasitemias muy elevadas en corazón (Grafica II) y músculo, encontrando al cerebro como nuevo órgano afectado en los ratones (Figura 14). En el trabajo realizado por Salazar et al., (1978), se aisló, por medio de xenodiagnóstico efectuado a un humano, una cepa de T. cruzi, los estudios histopatológicos mostraron que el cerebro se encontraba afectado por amastigotes, al igual que en nuestro caso, con la diferencia de que nuestro aislado fue hecho de un animal doméstico (cerdo), y resultó muy patógeno para el ratón blanco. El aislado E.2 tiene un comportamiento casi igual al anterior (Tabla V).

Finalmente se desprende de este trabajo que los aislados que pasan a través de ciertos huéspedes como el hombre y en este caso al cerdo, son muy agresivos afirmando que este tipo de cepas virulentas existen en nuestro país.

9.0 CONCLUSIONES

- 1.- En vista de la escasa información que existe acerca de reservorios de T. cruzi, podemos decir que esta investigación es la primera en realizarse en México, utilizando técnicas tan detalladas como las descritas. De igual forma es la primera vez que se aísla una cepa de T. cruzi de Suis domesticus (cerdo) infectado naturalmente.
- 2.- Con este trabajo podemos afirmar que efectivamente hay reservorios peridomésticos de T. cruzi en la Jurisdicción Sanitaria 2 de Jojutla, Morelos.
- 3.- Del total de mamíferos peridomésticos muestreados, sólo en dos se aisló al parásito flagelado del torrente sanguíneo.
- 4.-Por los resultados de los estudios de serología, curvas de parasitemia e histopatología en ratón blanco se puede afirmar, que los aislados realizados pertenecen a T. cruzi .
- 5.-El aislado L.T.4 resultó ser muy virulento para el animal de experimentación.

10.0 COMENTARIOS

En vista de lo expuesto anteriormente es posible afirmar que existen animales peridomésticos que actúan como reservorios para la enfermedad de Chagas en la Jurisdicción 2 del Edo. de Morelos; en dicha zona se conjuntan, además, las condiciones geográficas y climáticas así como la presencia de hospederos definitivos e intermediarios, favorables para el desarrollo del ciclo vital de T.cruzi.

Es muy importante informar a las personas, de manera clara y sencilla acerca de esta enfermedad, como se adquiere, cual es su sintomatología, patología, entre otros., pero, sobre todo, enfatizar el aspecto profiláctico.

Enseñar, educar y ayudar son la mejor manera de concientizar a las comunidades que padecen la Tripanosomiasis americana o que están en riesgo de contraerla

11.0 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1- Aguilar, S. 1982. Geografía del Estado de Morelos. Tesis Prof. Fac. de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. p 7, 8, 9.
- 2- Aluja, S.A. de. 1985. Miocarditis por Trypanosoma cruzi en un perro. Veterinaria Méx., 16 : 41-44.
- 3- Araujo, F.G.; S.M. Batista. 1969. Observaciones sobre los Testes de Fixacao de Complemento e Imunofluorecencia Indirecta en Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao. Paulo. 11 (2): 104-110.
- 4- Bautista, N. y L. Parra. 1987. Extracción de antígenos metabólicos y somáticos de Trypanosoma cruzi de cuatro cepas mexicanas para las pruebas de fijación de complemento y hemoaglutinación indirecta. Tesis Prof. Fac. de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México 67p.
- 5- Bautista, N. 1993. Estudio de transmisores de Trypanosoma cruzi en el estado de Morelos. Tesis M. en C. Fac. de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 98 p.
- 6- Biagi, F., J. Tay., G. Guzmán. y F. Fong. 1964. Tetitlán Guerrero, foco endémico de la enfermedad de Chagas en México. Rev. Fac. Med. Méx. 6 : 626-631.
- 7- Brener, Z. 1984. Laboratory-acquired Chagas Disease and endemic disease among Parasitologists. Genes and Antigens of Parasites. Press. Florida, USA. p 3-9.
- 8- Burrows, W. 1973 Text Book of Microbiology .W.B. Saunder Co., Philadelphia. 123 p.
- 9- Camargo, M.E.; S. Hoshino-Sahimizu; V. Macedo; B.A. Pérez y C. Castro. 1977. Diagnóstico Serológico de Infecao humana pelo Trypanosoma cruzi, estado comparativo de Testes de Fixacao do Complemento, Imunofluorecencia Hemaglutinacao e Floculacao en 3624 soros. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 19 (4): 254-260.
- 10- Chagas Disease. 1977. Simposio Internacional en Nueva York N.Y., Pub. Cientifica 347 Ms/OPS, Washington, D.C. p4-11.
- 11- Cheng, T.C. 1978. Parasitología General 2a. ed. A.C. Madrid. 165p.
- 12- Cerisola, J.A; M. Alvarez; H. Lugones y J.B. Rebosolan. 1969. Sensibilidad de las Reacciones Serológicas para el

- 13- Cortés, M.J. 1986. Los transmisores de la Enfermedad de Chagas. I Seminario de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Veracruz, Méx.p 1-15.
- 14- Correa, F., R. Arias-Stella., R. Pérez Tamayo. y A. Carbonella. 1981. Texto de Parasitología. Prensa Med. Mexicana. México. 137 p.
- 15- Desowitz, R.S. 1963. Adaptation of trypanosomes to abnormal hosts. Ann. N. Y. Acad. Sci. 113 : 74-87.
- 16- Van Dijk, J.E., D. Zwart., y P. Leeflang. 1973. A contribution to the pathology of Trypanosoma simiae infection in pigs. Zbl. vet. Med. 20 : 374-391.
- 17- Galván, J.G., T.F. Moreno., S.F. Elorriaga., y M.L. López. 1984. Miocarditis Chagásica Crónica e Histopatología Suprarrenal. Infectología. 4 : 104-109 .
- 18- Gaviño de la, T.G., C.L. Juárez y H.H. Figueroa. 1984. Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. Limusa, México. p 167-182.
- 19- Houba, V. 1980. Immunologic Investigation of Tropical Parasitic Diseases. Churchill Livingstone. 89 p.
- 20- Hudson, L. 1985. Immune response to South American Trypanosomiasis and its relationship to Chagas Diseases British Med. Bull. 41 (2) : 175-180.
- 21- Ikede, B.O. and G.T. Losos. 1972. Pathological changes in cattle infected with Trypanosoma brucei. Vet. Path. 9: 272-277.
- 22- Ikede, B.O. and G.T. Losos. 1972. Pathology of the disease in sheep produced experimentally by Trypanosoma brucei. Vet. Path. 9 : 278-289.
- 23- Jones, T.C. and R.D. Hunt. 1983. Veterinary Pathology. Lea and Febiger, Philadelphia. 95 p.
- 24- Kasa, T.J., G.D. Lathrop., H.J. Dupuy., C.H. Bonney and J.D. Toft. 1979. An Endemic Focus of Trypanosoma cruzi infection in a subhuman primate research colony. J.A.V.M.A. 171 : 850-854.
- 25- Kelly, W.R. 1981. Diagnóstico Clínico Veterinario. C.E.C.S.A. México.p 23-47 .

- 26- Levine, N.D. ; J.O. Corliss; F.E.G. Cox; G. Deroux; J., Grain; B.M. Honigberg; G.F. Leedale; A.R. Loeblich; J. Lom; D. Lynn; E.G. Merinfeld; E.C. Page; G. Poljansky; V. Sprague; J. Vavra and F.G. Wallace. 1980. A newly revised Classification of the Protozoa. J. Protozool 27 : (1): 37-58.
- 27- Mitscherlich, E. und K. Wagner. 1970. Tropische und ihre Bekämpfung . Paul Parey. Berlin. p 56-60.
- 28- Neghme, R.A. 1940. La tripanosomiasis americana una enfermedad rural en Chile. Boln. Chile med. Soc. 7 : 32-37.
- 29- Ortega, M. y J. Tay. 1972. Ensayo experimental de diferentes vías de infección por Trypanosoma cruzi en el ratón blanco. Bol. Chile. Parasitol. 27 : 6-11.
- 30- Palencia, L. 1960. Coloración y gota gruesa de Giemsa-Walke para el Diagnóstico de la Tripanosomiasis Rev. Fac. Med. Méx. 7 :197-199.
- 31- Palencia, L. y E.A. Montaña. 1960. Un nuevo caso de tripanosomiasis en México. Rev. Fac. Med. Méx. 1:737-740.
- 32- Pelczar, M.J., R.D. Pedid and E.C.S. Chain. 1977. Microbiology. Mc. Graw Hill, New York. p 24-27.
- 33- Peruzzi, M.R.I. 1928. Pathologic-anatomical and serological observations on trypanosomiasis. Final Report. League of Nations International Committee on Human Trypanosomiasis 3 : 245-328.
- 34- Piekarski, G. 1989. Medical Parasitology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 362 p.
- 35- Pifano, F.C. 1954. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en la fase crónica. Estudio comparativo, entre gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inovaciones experimentales en animales sensibles. Arch. Venezol. Patol. Trop. Parasit. Med. 11 (2) : 121-156.
- 36- Pinto, D.J.C. 1984. Enfermedad de Chagas. Epidemiología Clínica Terapéutica. Programa de Salud Humana, Buenos Aires. p 9-29.
- 37- Pinto, D.J.C. 1985. Doença de Chagas e a questao de Tecnologia. Bol. Of. Sanit. Panam. 99 (3) : 244-255.

- 38- Quiroz, H. 1984. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Limusa, México. 566 p.
- 39- Ramírez, C.L., J. Tay., y P. Salazar. 1975. Cambios histopatológicos producidos en el ratón por cepas mexicanas de Trypanosoma cruzi. Rev. Inv. Salud Pública. Méx. 35 : 131-153.
- 40- Reyes, L.P. 1984. Enfermedad de Chagas en México. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 54 : 1-2.
- 41- Rugerio-Vargas, C. y H.M. Mansilla. 1991 Modification of the Silver Protein Impregnation Technique for Protozoa and Cultured Nerve Cells. Biotechnic & Histochemistry. 66:131-135.
- 42- Ryckman, R.E. 1984. The triatominae of north and central America and the west Indies: A checklist with synonymy (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). Bull. Soc. Vector Ecol. 9 (- 1) : 71-83.
- 43- Salazar, F., F.I. Ocampo. y M.H. Bolaños. 1962. Datos sobre Tripanosomiasis Americana en los departamentos fronterizos con la Republica Mexicana., Salud. Publ. Méx. 4. :207-210 .
- 44- Salazar-Schettino, P.M. e I. Haro. 1980. Manual de Técnicas para el Diagnostico Morfológico de las Parasitosis. Francisco. Méndez Cervantes, México.p 23-25.
- 45- Salazar-Schettino, P.M., M.J. Jiménez., J. Tay, y R.L. Cárdenas. 1978. Estudio comparativo de la patogenicidad de cuatro cepas de T. cruzi en el ratón blanco. Rev. lat-amer. Microbiol. 20 : 51-57.
- 46- Salazar-Schettino, P.M., J. Tay., F. Navarrete y S. Ramos. 1975. Comportamiento en el ratón de una cepa mexicana de Trypanosoma cruzi de peculiar virulencia. Rev. Inv. Salud Pública. Méx. 35 : 37-45.
- 47- Schenone, H. ; E.Alfaro y A.Rojas. 1980. Factores Biológicos y Etiológicos de la Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en Chile. Biol. Chile. Parasitol. 35 : 42-54.
- 48- Schmidt, G.D. and L.S. Roberts. 1977. Foundations of Parasitology .C.V. Mosby., St. Louis. 75 p.
- 49- Sepúlveda, A.A.J.; G.J.L. Valdespino; y H.J. Ramírez. 1986. Importancia Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas y las Leishmaniasis en México. I Seminario de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Veracruz. México. 4-11.

- 50- Shaw, J.J. y R. Lainson. 1972. Trypanosoma vivax in Brazil. Ann. Trop. Med. Parasit. 66 : 25-32.
- 51- Smith, J.D. 1976. Introduction to Animal Parasitology. Hodder and Stoughton, London. 97 p.
- 52- Stoppani, A.O.M. 1983. Bioquímica del Trypanosoma cruzi. Rev. Internacional. 8 (6) : 396-404.
- 53- Tay, J., P.S. Salazar., M.I. Bucio., R. Zárate y L. Zárate. 1980. La Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Salud Publ.Méx. 22 (4) : 409- 450.
- 54- Tay, J. 1986. Estado actual de los conocimientos sobre reservorios de Trypanosoma cruzi en la República Mexicana. I Seminario sobre la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, Veracruz, Méx. 25-34.
- 55- Tay, J., F. Biagi y B.A.M. de Buen. 1969 . Estado actual de Conocimientos sobre triatomas del Estado de Morelos, México. Rev. Fac. Med. Méx. 8 : 451-461.
- 56- Tay, J., R. Lara., O. Velasco y M. Gutiérrez. 1985. Parasitología Médica. Francisco Méndez Cervantes, México. p 37-56.
- 57- Velasco, C.O. y C.B. Guzmán. 1986. Importancia de la Enfermedad de Chagas en México. Rev. Lat. amer. Microbiol. 28:275-283.
- 58- Vickerman, K. 1972. The Protozoa. John Murray Albermate Street. London. 24p.
- 59- Vidal, R. 1980. Algunas relaciones Clima-Cultivos en el Estado de Morelos. Universidad Nacional Autónoma de México. p 10-18.
- 60- Williams, G.D., I.G. Adams., R.G. Yaeger., R.K. McGrath., W.K. Kead and R.W. Bilderback. 1977. Naturally occurring trypanosomiasis (Chagas disease) in dogs. J. Am. vetmed., ASS. 171: 171-177.
- 61- Williams, G.T. 1985. Control of Differentiation in Trypanosoma cruzi. Current topics in Microbiology and Immunology. 11 : 1-22.