



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE LA ENFERMEDAD  
CHAGAS NEONATAL POR INMUNOCROMATOGRFÍA STAT-  
PAK Y ELISA  
EN EL ESTADO DE CHIAPAS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA  
BERENICE ABURTO ROJAS**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesor: ABEL GUTIÉRREZ RAMOS</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesor: ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: JOSÉ CORDERO HERNÁNDEZ</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PARASITOLOGÍA. HOSPITAL  
INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO**

**SUSTENTANTE :**

**BERENICE ABURTO ROJAS**



**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PARASITOLOGÍA  
CON LA ASESORÍA DE LA DRA. ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO**

# ÍNDICE TEMÁTICO

## Capítulo 1: Introducción

- 1.1 Planteamiento del problema
- 1.2 Objetivos
  - 1.2.1 Objetivo general
  - 1.2.2 Objetivos particulares
- 1.3 Hipótesis

## Capítulo 2: Marco Teórico

- 2.1 Enfermedad de Chagas
- 2.2 Epidemiología
- 2.3 Agente causal
  - 2.3.1 Ciclo de vida
- 2.4 Vector
- 2.5 Manifestaciones clínicas
  - 2.5.1 Fase aguda
  - 2.5.2 Fase crónica
- 2.6 Reacción inmunitaria
- 2.7 Diagnóstico
  - 2.7.1 Diagnóstico en la fase aguda
  - 2.7.2 Diagnóstico en la fase crónica
- 2.8 Tratamiento
- 2.9 Antecedentes de Chagas congénito
  - 2.9.1 Definición
  - 2.9.2 Epidemiología
  - 2.9.3 Características epidemiológicas específicas de la infección congénita con *T. cruzi*
  - 2.9.4 Rutas de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi*
    - 2.9.4.1 Ruta transplacentaria hematogena
    - 2.9.4.2 Invasión de trofoblastos por el parásito
    - 2.9.4.3 Invasión parasitológica de la placenta a través de áreas carentes de trofoblastos
    - 2.9.4.4 Transmisión del parásito a través de lesiones en la placenta
    - 2.9.4.5 Migración de parásitos dentro del tejido coriónico/estromal
    - 2.9.4.6 Otras rutas posibles para la transmisión materno-fetal de
    - 2.9.4.7 Momento exacto de la transmisión materno-fetal de
  - 2.9.5 Factores involucrados en el desarrollo y transmisión transplacental de la infección con en fetos/recién nacidos.
    - 2.9.5.1 Carga parasitaria materna e infección congénita.
    - 2.9.5.2 Inmunidad materna y otros factores involucrados en la infección congénita.
    - 2.9.5.3 Coinfección materna e infección congénita.
    - 2.9.5.4 Capacidad de la respuesta inmune y otros factores en el feto durante la infección congénita

### **Capítulo 3 :Fundamento de las metodologías empleadas**

- 3.1 Prueba de Chagas Stat-Pak
- 3.2 Prueba de ELISA
- 3.3 Extracción de DNA
- 3.4 Técnica de PCR
- 3.5 Electroforesis

### **Capítulo 4: Metodología**

- 4.1 Material y Métodos
  - 4.1.1 Población de estudio
  - 4.1.2 Determinación del tamaño de muestra
  - 4.1.3 Datos generales, clínicos y obstétricos de las madres y datos antropométricos de los recién nacidos
  - 4.1.4 Diagrama de flujo para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénito
  - 4.1.5 Determinación de anticuerpo anti-*T. cruzi* en mujeres embarazadas
  - 4.1.6 Presencia del DNA del parásito en sangre venosa del recién nacido por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
  - 4.1.7 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los niños después de 8 meses de nacidos de madres seropositivas a la enfermedad de Chagas

### **Capítulo 5: Resultados y discusión**

- 5.1 Población de estudio
- 5.2 Datos generales, clínicos y obstétricos de las madres y datos antropométricos de los recién nacidos
- 5.3 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en mujeres embarazadas
- 5.4 Presencia del DNA del parásito en sangre venosa del recién nacido por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
- 5.5 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los niños después de 8 meses de nacidos de madres seropositivas a la enfermedad de Chagas

### **Capítulo 6: Conclusiones**

### **Capítulo 7: Bibliografía**

## **Pies de tablas**

- 2.1** Cambios epidemiológicos ocasionados por la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas, 1990-2000-2006
- 2.2** Distribución de tres especies de Triatominos en toda la República Mexicana
- 2.3** Principales reportes epidemiológicos en mujeres embarazadas y casos congénitos de infección con en países de América Latina.
- 2.4** Estimaciones de la OMS sobre mujeres embarazadas y casos congénitos infectados con en países de América Latina para el año 2005.
- 5.1** Tabla Distribución de madres participantes en el estudio en los Hospitales de Chiapas
- 5.2** Distribución de edades en madres positivas a la Enfermedad de Chagas
- 5.3.** Relación de seropositividad y Tiempo de residencia
- 5.4.** Relación de seropositividad y Número de gestaciones
- 5.5.** Relación de seropositividad y Cesáreas.
- 5.6** Relación de seropositividad y Abortos.
- 5.7** Relación de seropositividad y FUR.
- 5.8** Relación de seropositividad y Hemoderivados.
- 5.9** Distribución de sexo de los RN.
- 5.10** Edad gestacional por Capurro de los RN
- 5.11** Frecuencia de Alteración Hepática en RN en Chiapas
- 5.12** Frecuencia de Alteraciones Digestivas en RN en Chiapas
- 5.13.** Absorbancia a 490nm de los sueros de madres seropositivas por la prueba de Stat-Pak en Chiapas de los Municipios de Tapachula y Palenque.
- 5.14** Frecuencia de mujeres positivas por la prueba de ELISA Ag. Total

## **Pies de figuras**

**2.1** Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

**2.2** Rutas de la transmisión de a través de placenta.

**3.1** Interpretación de los resultados de la Inmunocromatografía para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en sangre, suero o plasma.

**3.2** Método de ELISA para la identificación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de mujeres embarazadas.

**3.3.** Gráfica con los pasos de la PCR.

**5.1** Porcentaje de óbitos en madres seropositivas a la enfermedad de Chagas en comparación con madres seronegativas

**5.2** Porcentaje de RPM en madres seropositivas a la enfermedad de Chagas en comparación con madres seronegativas

**5.3** Porcentaje de alteraciones cardíacas en hijos de madres seropositivas a la enfermedad de Chagas.

**5.4** Gráfica de la prueba ELISA Ag Total de madres e hijos infectadas por *T. cruzi* en el estado de Chiapas, de los municipios de Tapachula y Palenque

**5.5** Gráfica de la prueba ELISA Ag recombinante de madres e hijos infectadas por *T. cruzi* en los municipios de Tapachula y Palenque

**5.6** Amplificaciones del DNA extraído de sangre venosa de los recién nacidos de madres positivas a usando los iniciadores Tcz1/Tcz2 del municipio de Tapachula.

**5.7** Amplificaciones del DNA extraído de sangre venosa de los recién nacidos de madres seroreactivas a usando los iniciadores Tcz1/Tcz2 del municipio de Palenque.

**5.8.** Amplificaciones del DNA extraído de sangre venosa de los recién nacidos de madres seroreactivas a usando los iniciadores Tcz1/Tcz2 del municipio de Palenque.

**5.9** Prueba de ELISA Ag total en hijos de madres seropositivas después de 8 meses de nacidos.

**5.10** Prueba de ELISA Ag Recombinante en hijos de madres seropositivas después de 8 meses de nacidos.



## Capítulo 1: Introducción

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al hombre a través de la infección con deyecciones de un triatomino hematófago parasitado. Además del vector, existen otros mecanismos de transmisión: la vía transfusional y la vía vertical o congénita.<sup>1</sup> Estas dos resultan ser de gran importancia tanto para áreas endémicas como no endémicas, debido a las migraciones de individuos infectados, lo que obliga a todo el personal de salud a capacitarse en el diagnóstico de esta enfermedad. En la transmisión congénita la mujer embarazada infectada, ya sea en forma aguda o crónica puede transmitir el parásito al feto en un porcentaje que varía según la región estudiada y la población; sin embargo, no todos los hijos de madres chagásicas adquieren la infección, dado que no se conocen aun los mecanismos por los cuales se produce. Además, los factores nutricionales, placentarios, parasitarios y/o si la madre tiene conjuntamente VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) o cualquier estado de inmunosupresión aumentan el riesgo de transmisión<sup>2</sup>. La mayoría de los niños infectados nacen asintomáticos y solo un pequeño porcentaje presentan signos y síntomas característicos de la infección. Lo más importante para establecer el diagnóstico de Chagas congénito, es conocer y suponer su existencia, porque solo si se piensa en esta posibilidad, se llegara al diagnóstico de los niños infectados cuando son asintomáticos. Los neonatos sintomáticos son diagnosticados tempranamente, dado que su condición clínica así lo exige para ser tratados a la brevedad.<sup>3</sup> El diagnóstico de Chagas congénito en el recién nacido infectado esta dado por la demostración del parásito en sangre, por medio de técnicas parasitológicas directas como micro-hematocrito y PCR (Polymerase Chain Reaction), e indirectas en suero como ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pudiendo realizarse esta última únicamente después de 8 meses de edad cuando los anticuerpos detectados son del niño y no de la madre. En los recién nacidos sintomáticos las manifestaciones clínicas de Chagas neonatal son: agrandamiento del hígado o bazo, ictericia, prematurez y taquicardia persistente. Es importante que las mujeres embarazadas de zonas endémicas se realicen pruebas de laboratorio para detectar la infección de forma temprana, administrar tratamiento oportuno en los casos positivos en RN (recién nacido), e implementar estrategias de Salud

Pública en el diagnóstico de esta enfermedad implementándola como prueba obligatoria en el control prenatal.

### **1.1 Planteamiento del problema**

La enfermedad de Chagas congénita es la tercera vía de transmisión del parásito *T. cruzi* al humano. Su importancia va en aumento a causa del éxito en los programas de prevención y control en la transmisión por el insecto vector y a través de transfusiones sanguíneas. Representa un problema de Salud Pública porque no se cuenta con ningún tipo de intervención para su control y la oportuna atención de los recién nacidos positivos a la infección con el parásito.

En América Latina, se estima que existen cerca de dos millones de mujeres en edad reproductiva infectadas con *T. cruzi*; de las cuales entre 4 y 8% transmitirán la infección al feto por vía transplacentaria, por consecuencia, se calcula que nacerán 15,000 niños con Chagas congénito al año y la gran mayoría asintomáticos. En México, los estudios más recientes indican una prevalencia materna de 7.32% en zonas endémicas, y una transmisión materno-fetal de 4.08%.<sup>4</sup>

En vista de que son pocos los estudios que se han realizado en México para determinar la magnitud de la tasa de transmisión congénita por *T. cruzi*; es importante conocer la magnitud en la transmisión madre-hijo, identificar los casos congénitos y administrar el fármaco en los casos positivos para que con base en su eficacia terapéutica, se logre entre un 90 y 100% de cura total antes del primer año de vida del recién nacido. Además, es necesario desarrollar estrategias de prevención a todos los niveles.

En este trabajo se demuestra la importancia de establecer una estrategia que permita la identificación de mujeres infectadas y la tasa de transmisión de la infección a sus recién nacidos infectados por la vía vertical. Es necesario informar a las Organizaciones de Salud del país, sobre la presencia de casos positivos, evidenciando la magnitud del problema con la finalidad de proporcionar tratamiento a los niños positivos para otorgarles el 100% de posibilidad de cura, evitando así la morbilidad y mortalidad de estos niños.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas mediante pruebas inmunológicas así como la tasa de transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en el estado de Chiapas.

### 1.2.2 Objetivos particulares

- Identificar anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en suero de mujeres embarazadas del estado de Chiapas en el Hospital General de Tapachula y en el Hospital General de Palenque empleando la técnica de ELISA e Inmuncromatografía (Stat-Pak) .
- Determinar la frecuencia de mujeres embarazadas con anticuerpos anti-*T. cruzi* en el estado de Chiapas en los municipios de Tapachula y Palenque.
- Determinar la presencia del parásito *T. cruzi* en sangre venosa de recién nacidos de las madres seropositivas por medio de la prueba de PCR.
- Identificar anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en el suero de niños de madres seropositivas después de 8 meses de nacido empleando la técnica de ELISA.
- Determinar el porcentaje de la transmisión vertical de *T. cruzi* en niños nacidos de madres seropositivas al parásito, del estado de Chiapas en los municipios de Tapachula y Palenque.
- Proporcionar al Hospital donde asiste a consulta el niño infectado el tratamiento específico.

## 1.3 Hipótesis

Si mediante pruebas inmunológicas identificamos a mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi*, es posible reconocer los casos de recién nacidos infectados por la transmisión vertical para ser tratados en tiempo y forma.

## Capítulo 2: Marco Teórico

### 2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es un problema de Salud Pública en América Latina que afecta a 8 millones de personas aproximadamente; se calcula una incidencia de 200 000 nuevos casos por año.

El médico e investigador Carlos Chagas aisló por primera vez el agente causal en un paciente humano y en 1909 describió el cuadro clínico del trastorno, denominado en su honor enfermedad de Chagas.

En la actualidad, la importancia de la enfermedad de Chagas se mide por el efecto económico que produce en los países afectados, los daños potenciales de vida productiva perdidos por las personas enfermas y los costos de los servicios de salud utilizados en su tratamiento y control, ya que se trata de un padecimiento invalidante que impide al sujeto llevar una vida normal a temprana edad por las alteraciones orgánicas que ocasiona.<sup>5</sup>

### 2.2 Epidemiología

La enfermedad de Chagas se encuentra presente en México y América Latina, sus manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son variables entre una zona endémica y otra. La forma ideal de cuantificar la magnitud real como problema de Salud Pública es a través de los siguientes indicadores: presencia de vectores, seroprevalencia y sangre infectada en bancos de sangre. Las cifras actuales no reflejan la verdadera magnitud del problema, la mayoría corresponden a estudios aislados y a aproximaciones estadísticas que no reflejan la dimensión real del problema en una región geográfica o de un país. Sobre la validez de los datos existentes, se puede afirmar que cifras como 100, 40 o 28 millones de personas en riesgo; o 30, 18 o 15 millones de infectados en América latina han sido y son producto de aproximaciones.<sup>6,7</sup>

Como resultado del aumento de la migración, cada vez se están reportando nuevos casos en Estados Unidos, Canadá, Europa, España, Australia y Japón, por lo que es considerada un problema de Salud Pública.<sup>8</sup>

La población en riesgo se define a partir de la presencia del insecto vector en los domicilios; y la población infectada, se conoce a partir de encuestas parciales de

seroprevalencia en áreas restringidas realizadas en diferentes tiempos empleando diferentes métodos, criterios y planes de muestreo.

En la Tabla 2.1, se observa como han cambiado las cifras reportadas de los parámetros epidemiológicos desde 1990, 2000 y 2006. La causa de estos cambios se debe a los programas de control en la transmisión vectorial y en bancos de sangre, lo que ha favorecido en la disminución de la incidencia de la

Parámetros Epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45 000	21 000	12 500
Casos humanos de infección	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos anuales	700 000	200 000	41 200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Distribución	21 países	21 países	21 países

enferm  
edad  
de  
Chaga  
s.  
Tabla  
2.1  
Cambios

epidemiológicos ocasionados por la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas, 1990-2000-2006. Fuente: TDR/WHO, PAHO, WHO.

En la última “Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas”, realizada en el 2006 entre los 21 países endémicos, se estimó una prevalencia de 7,694 500 infectados con una tasa de 1,448%, cifra menor en 50% a las estimaciones efectuadas durante los primeros años de la década de los 90’s.

El número de nuevos casos anuales de infección debidos a transmisión vectorial es de 41,200 con una tasa de 7,775 por cada 100,000 habitantes; y el número anual de casos nuevos de Chagas congénito es de 14 385. Habría en toda la región de las Américas un total de 108,595,000 habitantes que residen en zonas endémicas y se producen cerca de 20,000 defunciones por año debido a la enfermedad de Chagas. Asumiendo que los datos de prevalencia e incidencia sean superiores a los estimados, es importante considerar que el informe del

Banco Mundial publicado en 1993, destacó que las personas infectadas por la enfermedad de Chagas se consideran como discapacitadas incapaces de realizar un trabajo, lo que se refleja como una pérdida económica para el país en donde vive la persona infectada y esto la coloca como la segunda patología tropical más importante en todo el continente.<sup>9</sup>

### **2.3 Agente causal**

*Trypanosoma cruzi*, es un parásito protozoario flagelado que es transmitido por vectores hematófagos denominados triatomíneos, comúnmente conocidos como chinches besuconas. Las rutas secundarias de transmisión incluyen la transfusión de sangre, el trasplante de órganos y la transmisión materno-fetal.<sup>10</sup>

El parásito posee un ciclo de vida complejo que incluye 3 fases morfológicas comprendidas en dos huéspedes: el vector invertebrado y el huésped mamífero. Los estadios básicos se definen por su forma, la posición del cinetoplasto respecto del núcleo y la región por donde emerge el flagelo, y los estadios son el epimastigote, amastigote, y tripomastigote; este último puede ser metacíclico o sanguíneo.<sup>5</sup>

Epimastigote: Es la forma replicativa, no infectiva para el ser humano o mamífero, y se encuentra en el intestino del vector. Es de aspecto fusiforme con 20 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud. El cinetoplasto se localiza en la posición anterior, al del núcleo y el flagelo forma una pequeña membrana ondulante. Este estadio morfológico se multiplica de manera profusa en el intestino de los triatomíneos para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos; es la forma del parásito que se replica en medio de cultivo.

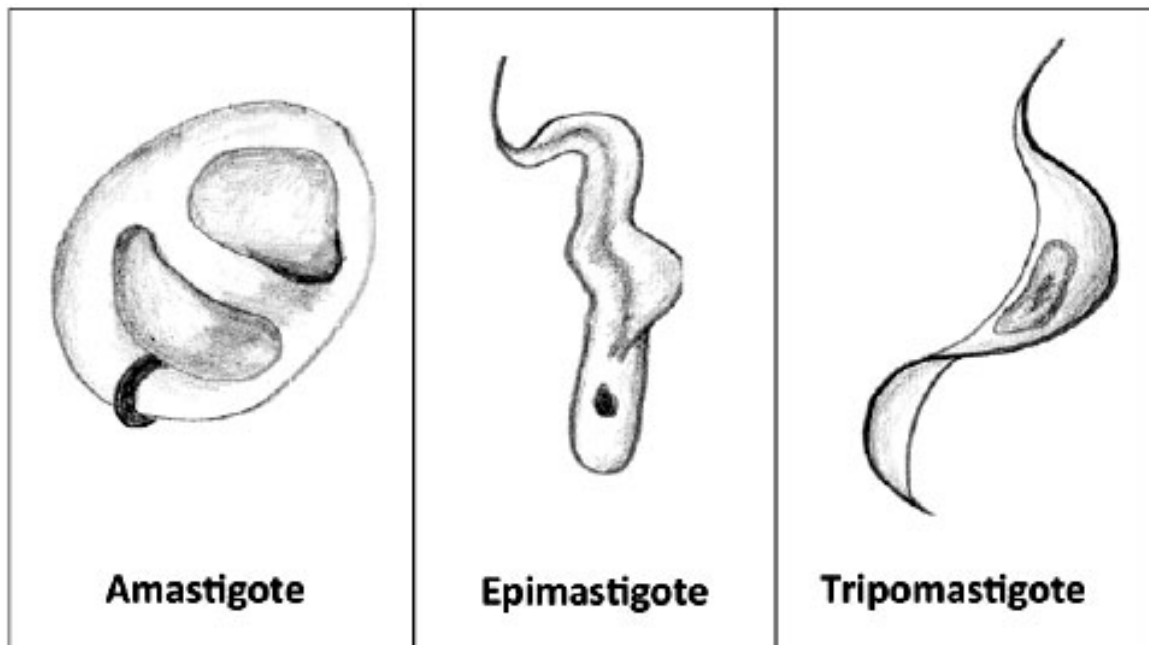
Amastigote: Forma replicativa intracelular que se reproduce en el huésped mamífero y que lo distingue de otros miembros del género. Esta forma proviene de la diferenciación de los tripomastigotes, tanto metacíclicos como sanguíneos, y tiene la capacidad de infectar a otras células. Posee una forma redonda

llamada leishmanoide, mide de 2 a 2.5  $\mu\text{m}$ , su flagelo esta secuestrado dentro de una bolsa visible y presenta un cinetoplasto anterior al núcleo.

**Tripomastigote metacíclico:** Es una forma no replicativa pero infectiva para el humano u otros mamíferos. Es producto de la diferenciación de los epimastigotes en la porción distal del intestino del vector, la cual se deposita con las heces del insecto para luego penetrar por mucosas o solución de continuidad en el huésped e infectar células.

Tiene forma alargada y mide unas 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud. Presenta un núcleo vesiculoso y el cinetoplasto de forma casi esférica posterior al núcleo. El flagelo, con su membrana ondulante, se observa a lo largo del cuerpo del parásito y surge libremente en el extremo posterior.

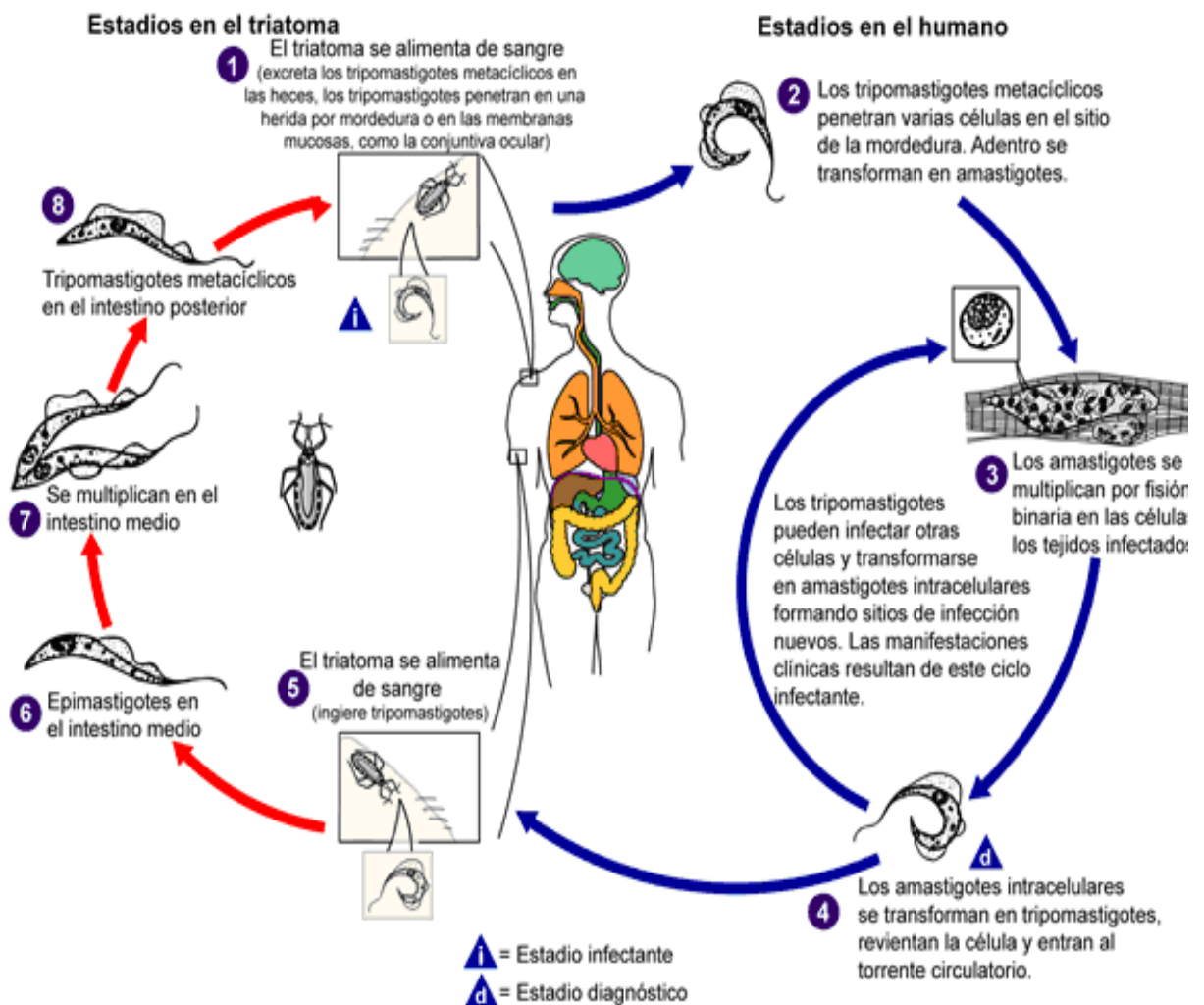
**Tripomastigote sanguíneo:** No es una fase replicativa, pero si es infectiva para el vector y el mamífero. Es el resultado de la diferenciación del Amastigote; puede infectar a nuevas células o pasar al vector invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito.



### 2.3.1 Ciclo de vida

Inicia cuando un triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes sanguíneos; éstos pasan al intestino del triatomino, se transforman en epimastigotes, se multiplican por fisión binaria y a los pocos

días se encuentran como tripomastigotes metacíclicos<sup>11</sup>. Las formas infectivas o metacíclicas se transmiten por las heces del vector infectante, las cuales son depositadas durante el proceso de alimentación del triatomino. Las formas metacíclicas se transportan en la sangre por el daño ocasionado en la piel por la probóscide del insecto al alimentarse, o por la contaminación al llevar las deyecciones hacia alguna membrana mucosa. Una vez dentro del mamífero y a través de la barrera de la piel, penetran en las células del tejido, donde se transforman en amastigotes, ahí se multiplican por fisión binaria (la replicación dentro del mamífero solo ocurre en esta fase), rompen la célula y alcanzan la circulación sanguínea como tripomastigotes sanguíneos. Los amastigotes pueden infectar nuevas células o transformarse rápidamente en tripomastigotes sanguíneos y diseminarse por vía hematógica por todo el organismo, en donde pueden invadir cualquier célula nucleada. El ciclo biológico se completa cuando un triatomino se alimenta de un mamífero infectado y adquiere el parásito que se encuentra en el torrente sanguíneo.<sup>11</sup>





## 2.4 Vector

El insecto vector o transmisor, es un artrópodo hematófago que pertenece a la clase *Insecta*, orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. Todas las especies de triatominos son consideradas como vectores potenciales de, pero los de mayor importancia epidemiológica son aquellos que se han adaptado a las viviendas humanas y que tienen intervalos de tiempo corto entre la alimentación y la defecación.

En México, se han reportado un total de 31 especies de Triatominos, muy cercanos genéticamente, aunque se distinguen niveles morfológicos y algunos presentan variaciones geográficas. Los triatominos infectados naturalmente de importancia epidemiológica para la transmisión del parásito a humanos son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzotti*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma phyllosoma* y *Triatoma picturata*.<sup>12</sup>

Tabla 2.2 Distribución de tres especies de Triatóminos en toda la República Mexicana Fuente: Taller Internacional de Epidemiología Diagnóstico y Control de la Enfermedad de Chagas. Noviembre, 2002.

ENTIDAD FEDERATIVA	ESPECIES REPORTADAS
Campeche	<i>T. dimidiata</i>
Colima	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Chiapas	<i>T. dimidiata</i>
Distrito Federal	<i>T. barberi</i>
Guanajuato	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Guerrero	<i>T. barberi</i> , <i>pallidipennis</i>
Hidalgo	<i>T. dimidita</i> , <i>T. barberi</i>
Jalisco	<i>T. dimidita</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Estado de México	<i>T. pallidipennis</i>
Michoacán	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Morelos	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Nayarit	<i>T. pallidipennis</i>
Oaxaca	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Puebla	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Querétaro	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i>
San Luis Potosí	<i>T. dimidiata</i>
Tabasco	<i>T. dimidiata</i>
Tlaxcala	<i>T. barberi</i>

## **2.5 Cuadro clínico**

La evolución de la enfermedad se caracteriza por presentar 3 fases: fase aguda, fase indeterminada y fase crónica. De los individuos infectados cursando la fase aguda, aproximadamente el 70% es asintomático. La mayoría de los pacientes permanecen en etapa indeterminada de la infección. Mientras que la fase crónica se caracteriza por alteraciones cardíacas que conducen a la insuficiencia cardíaca congestiva, crecimiento degenerado de otros órganos y muerte de un 20-40% de los pacientes infectados.<sup>5</sup>

### **2.5.1 Fase Aguda**

Dura entre 10 y 15 días, pasa inadvertida la mayoría de las veces porque puede ser asintomática, o presentar síntomas de leves a moderados o en algunos casos se manifiestan síntomas generales provocados por cualquier entidad febril de otra causa. Dentro de los síntomas generales se encuentran la cefalea, anorexia, mialgia, laxitud, vómitos, diarreas, palpitaciones, nerviosismo, artralgia, quebrantamiento general, linfadenopatías generalizadas, hepatoesplenomegalia y edema, principalmente. Se caracteriza por parasitemia elevada, reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos, reacción inflamatoria de tejidos blandos conocida como chagoma, lesión en párpados conocida como signo de Mazza-Romaña y diseminación de parásitos intracelulares en ganglios linfáticos y órganos como: bazo, médula ósea, corazón, tubo digestivo, glándulas suprarrenales, cerebro y a veces ovarios, testículos y tiroides. Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmunitaria que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este periodo dura desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los síntomas de la fase crónica y es conocida como fase indeterminada o latente que inicia entre la semana 8 a la 10 después de la fase aguda y puede durar meses e incluso años con un promedio de 10 a 20.<sup>5</sup>

### **2.5.2 Fase Crónica**

Se presenta en el 30% de los individuos infectados en fase aguda y puede adoptar diversas formas clínicas: cardíaca, digestiva, del Sistema Nervioso Central (SNC) y congénita. Se caracteriza por baja parasitemia y lesiones típicas

en el corazón y el tubo digestivo. La forma más importante es la cardiopatía chagásica, considerada como el síndrome más común y peligroso, se desarrollan auto-anticuerpos contra endocardio, vasos sanguíneos e intersticio de músculo estriado; además, se observa la presencia de nidos de amastigotes. Se desarrolla hipertrofia, dilatación de cavidades, trombosis mural, adelgazamiento apical y aneurisma ventricular con mayor frecuencia en el ápice del ventrículo izquierdo. En algunos casos, puede ocurrir muerte súbita sin desarrollo de insuficiencia cardiaca congestiva. También se desarrollan lesiones hipertróficas del tubo digestivo o megavísceras, especialmente megaesófago y megacolon. En casos graves hay presencia de destrucción neuronal que trastorna el funcionamiento peristáltico de la musculatura, ocasionando hipertrofia muscular y aumento considerable de los órganos hasta llegar a la muerte.

La forma crónica en mujeres embarazadas puede provocar abortos, partos prematuros o una infección congénita caracterizada por hepatoesplenomegalia, anemia, daño neurológico progresivo, hemorragias cutáneas y alteraciones electrocardiográficas.<sup>5</sup>

## **2.6 Reacción Inmunitaria**

La respuesta inmunitaria humoral del paciente infectado incluye la producción de inmunoglobulinas del tipo IgM durante la fase aguda de la infección; estas decrecen después para ceder el paso a la producción de IgG subclase 1, 2 y 3 e IgA, que pueden perdurar durante toda la vida del paciente.

Los macrófagos activados son una línea de defensa importante durante la infección temprana, y en algunos individuos las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés) son importantes para el control de la infección. Ambos tipos de células se asocian para controlar la infección, ya que los macrófagos unidos a *T. cruzi* secretan IL-12 y ello lleva a un incremento de la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  lo que da como resultado un control de parasitemia.

Se ha descrito inmunidad celular mediada por linfocitos CD4+ y CD8+ en la enfermedad de Chagas, pero no se ha establecido cual de las dos es más importante para el control de la infección.<sup>5</sup>

## **2.7 Diagnóstico**

Los parásitos son difíciles de observar en la sangre por lo que el diagnóstico se basa principalmente en pruebas serológicas.

Durante la fase aguda las técnicas de laboratorio utilizan una muestra de sangre, observando el parásito mediante frotis de sangre, gota gruesa o micro-hematocrito.

Para diagnóstico en fase indeterminada y crónica se pueden aplicar métodos serológicos; los más utilizados son la hemaglutinación indirecta, la prueba de ELISA, la inmunofluorescencia y la inmunodetección en soportes sólidos (Western blot).

### **2.7.1 Diagnóstico en la Fase Aguda**

Cuando la enfermedad es reciente, el diagnóstico se realiza por la búsqueda del parásito en sangre periférica empleando métodos directos, como el de concentración, los de concentración biológica y otros como la detección de antígeno o DNA del parásito. Los métodos como el examen en fresco, las preparaciones teñidas y el recuento de tripanosomas se pueden realizar en el 100% de los casos y tienen una sensibilidad del 98%.

Los métodos como la gota gruesa, la biopsia, el micro-hematocrito, el método de concentración de Strout y el de Bennet, reducen el tiempo de realización, son sensibles, pero se requiere equipo y material especial. Los de concentración biológica como el xenodiagnóstico y el hemocultivo tienen sensibilidades del 95 al 98% en fase aguda y son muy tardados. La detección de antígenos parasitarios en sangre y orina han sido propuestos, pero aún no está evaluada para incorporarse al diagnóstico de rutina. El diagnóstico indirecto mediante la búsqueda de IgM debe tomarse solo como dato orientador.<sup>13</sup>

### **2.7.2 Diagnóstico en la Fase Crónica**

El diagnóstico se realiza con métodos indirectos buscando anticuerpos de la clase IgG; los más comunes son la ELISA, Hemaglutinación Indirecta (HAI), aglutinación directa (AD), prueba de látex, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Fijación del Complemento (FC). Además, se emplean pruebas complementarias como el conteo de leucocitos, pruebas radiológicas y electrocardiográficas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece el uso de dos pruebas serológicas para dar un resultado positivo, debido a que comúnmente se

encuentran pacientes positivos en una prueba y negativos en otra. En la actualidad, la prueba de PCR es una de los últimos avances en el diagnóstico y el control del tratamiento de la enfermedad de Chagas; porque es posible detectar un parásito o un fragmento del DNA de *T. cruzi* en 20 mL de sangre con 99.9% de sensibilidad y 97.8% de especificidad en fase aguda.<sup>14,15</sup>

## **2.8 Tratamiento**

Los tratamientos farmacológicos de los pacientes infectados se basan en Nifurtimox y Benzonidazol desde 1960, y aunque su eficacia está bastante bien establecida durante la fase aguda de la infección y en los niños, su utilidad en la fase crónica y en pacientes adultos es todavía un debate y un amplio ensayo clínico se está llevando a cabo para aclarar este punto.<sup>5</sup>

La prevención en la actualidad sólo se basa en el control de vectores, que ha reducido considerablemente la incidencia de la enfermedad y la prevalencia en su mayoría.

## **2.9 Antecedentes teóricos de Chagas congénito**

### **2.9.1 Definición**

La transmisión materno-fetal del parásito *T. cruzi* induce la infección congénita, esto implica la transmisión prenatal o perinatal de parásitos vivos que persistan después de nacer. Excluyendo la transmisión postnatal de parásitos muertos, DNA del parásito, u otras moléculas liberadas del parásito que son encontrados en la sangre.

### **2.9.2 Epidemiología**

La transmisión congénita de *T. cruzi* depende directamente de dos indicadores epidemiológicos básicos:

- La tasa de prevalencia de infección en mujeres embarazadas, y
- La incidencia de transmisión vertical.

La primera, varía en relación con el grado de endemidad de la infección por en los diferentes países y regiones estudiadas. En Argentina, la prevalencia de gestantes chagásicas se estima en 7% y en otros países endémicos como Bolivia, Perú y Paraguay oscila entre 5 y 40%.<sup>16</sup> En México, un estudio realizado en dos regiones endémicas reporto el 7.3% de gestantes infectadas.<sup>4</sup> En relación a la incidencia de infección congénita, Argentina reporta 2.4%, Brasil 1%, Paraguay y Bolivia sus valores oscilan entre 4 y 12%<sup>16</sup>; en México de 4.08%.<sup>4</sup> Esta variación es atribuida al grado de endemidad de la región y a las características inmunológicas de la población estudiada. La tasa de transmisión no se ve afectada por la zona endémica, pero si esta asociada con la severidad y mortalidad en el recién nacido. Además, es necesario estandarizar los métodos diagnósticos porque pueden subestimar o sobreestimar la incidencia de transmisión.

La incidencia en la transmisión vertical ha adquirido gran importancia debido a la urbanización de la enfermedad causada por las constantes migraciones poblacionales desde las áreas endémicas, que ha ocasionado nuevos casos en regiones y países donde no existe la transmisión vectorial. Además, los programas de control en la transmisión por vector y por transfusión sanguínea están influyendo para que la infección congénita sea la vía de transmisión más importante en países endémicos, lo que demuestra que es un problema de salud pública.

En la tabla 2.3, se reúne la información de las principales publicaciones sobre prevalencia de infección en mujeres embarazadas y del grado de transmisión congénita en ellas, durante los periodos de tiempo y áreas geográficas estudiadas. El grado de transmisión, se define como el número de casos congénitos/el número de madres infectadas con *T. cruzi*, el valor mas frecuente oscila entre 1 y 12%.<sup>17</sup>

Tabla 2.3 Principales reportes epidemiológicos en mujeres embarazadas y casos congénitos de infección con *T. cruzi* en países de América Latina.

PAÍS	ÁREA	AÑO	MUJER EMBARAZADA SEROPOSITIVA		CASO CONGÉNITO	
			n/N	%	n/N	%
ARGENTINA	BUENOS AIRES	87-97	ND	ND	71/1118	6.3
		90-91	62/729	8.5	2/38	5.3

		95-04	ND	ND	4/159	2.5
		00-06	ND	ND	47	ND
	CORDOBA	87-97	ND	ND	37/721	5.1
	SALTA	80-97	ND	ND	102	ND
		<93	149/937	15.9	6/149	4.0
		<99	34/276	12.3	3/34	8.8
		97-02	ND	ND	31/340	9.1
	FORMOSA	09	-	29.1	8/47	17.0
	SANTA FE	76-91	895/6123	14.6	9/341	2.6
	TIERRA DEL FUEGO	01-02	61	ND	3/68	4.4
	TUCUMAN	92-94	927/16842	5.5	26/364	7.1
		06-07	34/518	6.6	ND	-
BOLIVIA	COCHABAMBA	92-94	444/1606	27.6	22/444	4.9
		99-01	809/3879	20.8	47/809	5.8
	STA CRUZ	79-80	161/317	51.0	25	-
		88-89	ND	ND	78 (13)	-
		06-07	141/488	28.8	ND	ND
		<09	154/530	29.0	10/154	6.5
	TARIJA	01	73/152	48.0	8/149	5.4
		02-04	172/508	33.9	8/153	5.2
		03-04	1144/2711	42.2	61/1176	5.1
BRASIL	BAHIA	75-76	47/285	16.5	1/17	5.8
		81-82	226/2651	8.5	3/186	1.6
	GOIAS	75-04	145	-	2/278	0.7
	SAO PAULO	<99	57	-	3/58	5.17
	NACIONAL	<04	36/15873	0.2	1/36	2.77
CHILE	REGION III	82-83	31/869	3.6	0/3	0.0
	REGION IV	<84	68/453	15.0	2/61	3.3
		85-87	279/1974	15.6	2/51	3.9
		05-08	123/3324	3.7	2/80	2.5
	SANTIAGO	57-68	ND	ND	30	-
		<64	13/57	24.0	ND	ND
		79	11/402	2.7	2/11	18.2
		81-82	27/1000	2.7	3/27	11.1
	NACIONAL	82-90	ND	ND	24/336	7.1
HONDURAS	INTIBUCA	06-07	22/500	4.4	ND	ND
MEXICO	CHIAPAS, VERACRUZ	05-06	6/145	4.1	0/6	0.0
	GUANAJUATO, YUCATAN	06-07	8/988	0.8	ND	ND
	MICHOACAN	98	ND	ND	1 (16)	-
PARAGUAY	ASUNCIÓN, PEDRO	SN 91-92	172/1862	9.2	9/123	7.3
	CORDILLERA, PARAGUARI	95-04	7802/61091	12.7	104/1865	5.5
PERU	AREQUIPA	01-02	22/3000	0.7	0/22	0.0

La tabla 2.4, resume las estimaciones realizadas por la OMS/OPS en relación al número de mujeres infectadas en edad fértil y al número e incidencia de casos congénitos para cada país de América Latina durante el año 2005. Aproximadamente, 1,809,000 mujeres infectadas en edad fértil se encuentran en riesgo de transmisión congénita y 14,400 neonatos son infectados al año, la mayoría de estos se encuentran en Argentina, Bolivia y Brasil; estos promedios probablemente están sobreestimados. Por ejemplo, los estudios del 2003 al 2004 indican una prevalencia de infección en mujeres embarazadas arriba del 40% en Tarija, Bolivia (Tabla 3), donde hay una prevalencia media de 6.7% para toda Bolivia. En México, se puede hacer una comparación similar, en los estudios recientes de la enfermedad de Chagas donde se indican prevalencias más altas de las esperadas.

Tabla 2.4 Estimaciones de la OMS sobre mujeres embarazadas y casos congénitos infectados con en países de América Latina para el año 2005.

PAÍS	POBLACIÓN	PREVALENCIA PROMEDIO DE INFECCIÓN CON (%)	MUJERES EMBARAZADAS INFECTADAS (n)	CASOS CONGÉNITOS	
				n	INCIDENCIA (%)
<b>SUDAMÉRICA</b>					
ARGENTINA	38,747,000	4.129	275,900	1,800	0.263
BOLIVIA	9,182,000	6.752	229,00	1,500	0.573
BRASIL	186,405,000	1.019	460,00	5,000	0.135
CHILE	16,267,300	0.985	34,600	445	0.181
COLOMBIA	45,600,000	0.956	107,800	1,000	0.104
ECUADOR	13,228,000	1.739	58,00	800	0.274
GUAYANAS	1,397,000	1.288	5,800	20	0.070
PARAGUAY	5,898,650	2.543	61,000	600	0.342
PERÚ	27,968,000	0.686	43,700	200	0.032
URUGUAY	3,305,700	0.656	5,300	20	0.039
VENEZUELA	26,749,000	1.159	68,000	600	0.102
<b>CENTROAMÉRICA</b>					
TODOS LOS PAÍSES	39,656,200	2.034	217,440	1,300	0.123
<b>NORTEAMÉRICA</b>					
MÉXICO	107,029,000	1.028	243,000	1,100	0.051
<b>TOTAL</b>	<b>522,432,850</b>	<b>1.448</b>	<b>1,808,840</b>	<b>14,385</b>	<b>0.133</b>



### **2.9.3 Características epidemiológicas específicas de la infección congénita con *T. cruzi***

La transmisión congénita de *T. cruzi*, puede ocurrir en la fase aguda y crónica de la infección materna y se puede repetir en cada embarazo durante el periodo de fertilidad en la vida de la mujer. La mayoría de los casos de infección congénita provienen de madres con infección crónica, que fueron infectadas por el insecto vector durante su infancia o por vivir en áreas endémicas. Sin embargo, la transmisión trans-generacional (vertical) de parásitos puede ocurrir de una madre infectada a su hija, que transmitirá los parásitos a sus hijas y así sucesivamente. Todo esto puede contribuir a la formación de un grupo familiar de casos congénitos, observando los casos congénitos en hermanos. Tales características epidemiológicas específicas de la infección con *T. cruzi*, sugieren un riesgo particular de transmisión madre-progenie a través de un grupo de mujeres embarazadas infectadas comúnmente en áreas tanto endémicas como no endémicas. El interés de la infección congénita con *T. cruzi*, es su importancia como problema de salud pública que puede extenderse fácilmente a través de la migración y el tiempo.

### **2.9.4 Rutas de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi***

#### **2.9.4.1 Ruta transplacentaria hematológica**

La ruta transplacentaria es la vía obligatoria para la transmisión de *T. cruzi*, presente en sangre materna. Es la ruta que necesitan los parásitos para cruzar la barrera trofoblástica (primer línea de defensa de la placenta) u otro tejido placentario carente de la defensa trofoblástica, antes de acceder en los vasos fetales embebidos en el mesénquima y finalmente cruzar la capa coriónica (segunda línea de defensa de la placenta) (Figura 2.2).<sup>18</sup>

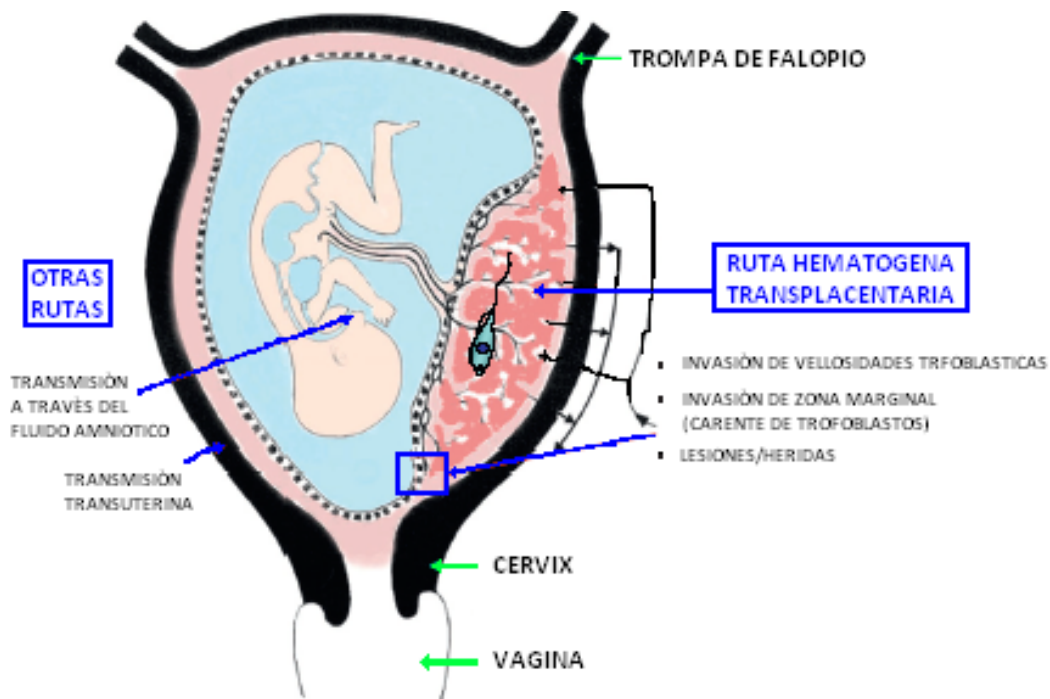


Figura 2.2 Rutas de la transmisión de *T. cruzi* a través de placenta.

#### 2.9.4.2 Invasión de trofoblastos por el parásito

Las vellosidades de la placenta humana están cubiertas por dos capas de trofoblastos: una capa exterior formada por sincitiotrofoblastos y una capa interior de citotrofoblastos (Células de Langerhans). Las extravellosidades de los citotrofoblastos también cubren estructuras no vellosas. En un grado avanzado, solo el sincitiotrofoblasto está interpuesto entre la sangre materna y el tejido fetal, desde el citotrofoblasto el número de células disminuye durante el periodo de gestación.<sup>19</sup>

Algunos estudios *in vitro* mencionan que *T. cruzi*, puede infectar y multiplicarse fácilmente dentro de las vellosidades de las células trofoblásticas humanas. El parásito induce la producción de actina cortical en el citoesqueleto de las células y la fosfatasa alcalina en placenta, esto pueden ayudar a *T. cruzi*, a invadir y multiplicarse dentro de las células trofoblásticas. En un modelo experimental usando sangre con parásitos de *T. cruzi* vivos, el DNA se identificó en el lado

fetal del tejido placentar. Sin embargo, la presencia de DNA no es una prueba de infección fetal, esto puede deberse a una contaminación transplacentar transfiriendo hebras de DNA del lado materno. Además, en el estudio se usaron cantidades enormes de tripomastigotes sanguíneos ( $10^5$ - $10^6$ /mg de vellosidad coriónica), muy superior al que puede ser esperado en mujeres embarazadas infectadas crónicamente, mostrando parasitemias debajo de 15 parásitos/mL. Estos son arriba de 3000 parásitos en los 200 mL de sangre contenida dentro del espacio intervelloso (Se estima que el peso total de las vellosidades y la superficie de la placenta a término son 273 g y 12.5 m<sup>2</sup>, respectivamente).<sup>20</sup>

El análisis histopatológico de la placenta (en casos congénitos) presenta vellositis intensa asociada a *T. cruzi*, se observan parásitos en trofoblastos vellosos, así como amastigotes en células estromales. Sin embargo, estudios realizados en Brasil, Argentina y Bolivia, en placentas de casos congénitos, no se encontró de forma común la vellositis y los parásitos no estaban o no fueron identificados en trofoblastos. Esto sugiere que los trofoblastos son una barrera potencial para *T. cruzi*, y que la transmisión al feto, cuando ocurre, toma una ruta alternativa transplacentaria.<sup>21</sup>

#### **2.9.4.3 Invasión parasitológica de la placenta a través de áreas carentes de trofoblastos**

En estudios histopatológicos, los parásitos se encontraron principalmente en placas coriónicas, membranas y cordón umbilical, asociados con coriönitis y funisitis. Estas observaciones sugieren que los parásitos presentes en el espacio intervelloso han encontrado una ruta a través de la placenta carente de defensas trofoblásticas. El análisis de biopsias seriadas realizadas en 19 placentas de recién nacidos infectados de Bolivia, mostró alta densidad de parásitos a nivel de la zona marginal, con disminución gradual de la densidad en la placa coriónica y membranas distantes.<sup>19</sup> En efecto, la zona marginal de la placenta unida a las membranas de las placas basales y coriónicas es conocida por estar constituida por células del músculo liso embebidas en la matriz fibrinoide extracelular (constituida por fibronectina, colágeno y laminina) y solo cubierto por un epitelio materno no trofoblástico. *T. cruzi* puede infectar y replicarse en células musculares y epiteliales fácilmente, del mismo modo facilita la invasión de las placas coriónicas y membranas. Además, expresa receptores de

membrana para fibronectina, lo cual puede facilitar su adhesión a la matriz presente en la zona marginal.<sup>20</sup>

#### **2.9.4.4 Transmisión del parásito a través de lesiones en la placenta**

Las lesiones en la placenta pueden también facilitar la transmisión congénita de *T. cruzi* desde la sangre materna hacia las defensas trofoblásticas. Tales lesiones son el resultado del daño inducido por fuertes respuestas inflamatorias de la placenta y también parece estar muy estrechamente relacionado al parto, particularmente durante la labor (daños ocasionados por las contracciones). Este mecanismo de transmisión puede ser relevante para la transmisión de tripomastigotes libres así como de amastigotes en células infectadas, esta vía es comúnmente usada por la transmisión del VIH a linfocitos infectados y por el micro intercambio de células fetales-maternas que frecuentemente ocurre en sangre de cordón. La determinación de esta vía de transmisión para los parásitos de *T. cruzi*, tiene como importancia practica la elección de la cesárea como forma de limitar o prevenir tal transmisión, como se ha visto en la infección con VIH maternos.<sup>24</sup>

#### **2.9.4.5 Migración de parásitos dentro del tejido coriónico/estromal**

Excepto en la microtransfusión a través de lesiones de placenta, los parásitos de *T. cruzi* han cruzado la barrera trofoblastica u otros tejidos placentarios y se encuentran dentro de tejidos coriónico/estromal de las vellosidades y/o placa coriónica, constituida por una mezcla de tejido conectivo fijado a fibras celulares, tales como los fibroblastos, miofibroblastos y macrófagos (células de Hofbauer). Los tripomastigotes de *T. cruzi* que no han sido destruidos por las células fagocíticas mesenquimales pueden sufrir nuevos ciclos de multiplicación dentro de tales células, liberando nuevos parásitos móviles que van a infectar a otras células, finalmente infectan miocitos y células endoteliales del forro de los vasos fetales embebidos en las vellosidades coriónicas, placa coriónica o cordón umbilical y ganan el acceso a la circulación fetal.<sup>25</sup>

#### **2.9.4.6 Otras rutas posibles para la transmisión materno-fetal de *T. cruzi***

*T. cruzi*, también puede atravesar placenta e infectar al feto a través de parásitos liberados de las células amnióticas hacia el fluido amniótico (FA). La presencia

de parásitos dentro de la placa coriónica y en membranas da como resultado una infección secundaria de la capa contigua de células amnióticas (Corioamnionitis). Los parásitos liberados dentro del FA pueden contaminar al feto por la vía oral o pulmonar o eventualmente al penetrar piel desde el baño fetal en FA y la continua adsorción de este. Se tienen reportes de infección con *T. cruzi*, en pulmón y piel de fetos y en recién nacidos muertos infectados.<sup>26</sup> El diagnóstico en estos casos, no se realiza por la observación del parásito al microscopio, se basa en la búsqueda del DNA del parásito en FA o en el contenido del aspirado de fluido gástrico de recién nacidos infectados asintomáticos. Esta vía de transmisión es poco común en humanos como en animales infectados experimentalmente, ya que *T. cruzi* se destruye por la acción de los péptidos anti-microbianos contenidos normalmente en FA.<sup>27</sup>

La posibilidad de invasión fetal vía placenta directamente por la pared uterina (ruta transuterina) resulta estar determinada por la presencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* que se observan en la decidua de la placenta de madres que han traído al mundo a neonatos infectados.<sup>28</sup>

La transmisión post-natal del parásito a través del consumo de leche materna o alimentos contaminados tienen poca importancia epidemiológica. Solo existe un reporte que menciona un posible infante contaminado durante la lactancia. La presencia del parásito en leche durante la infección materna, pudo haber estado relacionada con la contaminación de leche con sangre materna.<sup>26</sup> En otros estudios, no se observaron parásitos en leche de mujeres infectadas crónicamente. Los tripomastigotes sanguíneos en contraste con los tripomastigotes metacíclicos, no pueden sobrevivir en el ambiente gástrico, el cual previene su transmisión a neonatos en los casos raros donde los parásitos pueden estar presentes en leche materna.<sup>27</sup>

#### **2.9.4.7 Momento exacto de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi***

Es probable que haya poca o no haya transmisión de tripomastigotes sanguíneos durante el primer trimestre del embarazo, a causa de que el espacio intervelloso placentar no está abierto. La sangre materna suministra lo que llega continuamente y lo difunde en toda la placenta solo después de la doceava semana de gestación. La ausencia de malformaciones desarrolladas en los

recién nacidos vivos infectados congénitamente con *T. cruzi*, sugiere que no hay transmisión e interacciones dañinas del parásito en las etapas tempranas de la organogénesis en el embrión.<sup>31</sup>

Los abortos, óbitos y nacimientos prematuros en mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi*, son más frecuentes en las edades gestacionales de 19 a 37 semanas de embarazo, pero no se ha demostrado que tales hechos sean una prueba responsable de la infección congénita. Los casos raros de infección aguda con *T. cruzi* reportados durante el embarazo, indican que la transmisión se da posiblemente alrededor de la veintava semana de embarazo. Sin embargo, en la mayoría de las mujeres embarazadas quienes están en fase crónica de una infección que ha sido adquirida mucho tiempo antes del embarazo, es imposible localizar el momento exacto de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi*. Se puede suponer que la transmisión de parásitos sanguíneos ocurre más frecuentemente durante el segundo y tercer trimestre del embarazo (transmisión prenatal) y quizás también más cerca al parto o durante el período de labor (transmisión perinatal) a través de las lesiones en placenta. La comparación del grado de transmisión en partos vaginales o por cesárea queda por hacerse para apreciar tal posibilidad de transmisión tardía.<sup>32</sup>

### **2.9.5 Factores involucrados en el desarrollo y transmisión transplacental de la infección con *T. cruzi* en fetos/recién nacidos.**

Los factores principales que permiten la presencia y el desarrollo de una infección congénita son el parásito mismo, la madre y la capacidad fetal para responder a la invasión del parásito.

#### **2.9.5.1 Carga parasitaria materna e infección congénita.**

La parasitemia en mujeres embarazadas, es un factor importante que favorece la transmisión congénita de *T. cruzi*. En Brasil, la transmisión materno-fetal se presenta en 8 de cada 15 casos reportados de mujeres embarazadas con infección aguda por *T. cruzi*; esto indica que es mayor el riesgo de transmisión en mujeres embarazadas que muestran alta parasitemia que en mujeres infectadas crónicamente, en las cuales, los parásitos en sangre son difíciles de detectar (53% contra 1-12%, respectivamente).<sup>33</sup> La frecuencia de hemocultivos positivos para *T. cruzi* de madres infectadas crónicamente que transmiten el

parásito, es dos veces más alta que en las madres que tienen partos de recién nacidos no infectados, con niveles de parasitemia estimados por PCR cuantitativa entre 1 a 12 p/mL. Esta asociación significativa de parasitemia con transmisión congénita fue confirmada por el uso de una técnica de concentración de parásitos en tubos de micro hematocrito heparinizados.<sup>34</sup> El xenodiagnóstico de mujeres infectadas, presenta mayor positividad en el segundo y tercer trimestre del embarazo que en mujeres no embarazadas; sin embargo, la relación con la transmisión congénita no se ha realizado.<sup>35</sup> En relación con estos resultados, se puede concluir que la parasitemia materna significativa en el espacio intervelloso es necesaria para traspasar a las defensas endógenas de la placenta (eliminando una parte de los parásitos presentes en sangre materna) y encontrar con éxito una ruta optima de transmisión.<sup>36</sup>

#### **2.9.5.2 Inmunidad materna y otros factores involucrados en la infección congénita.**

La inmunidad materna puede ser un factor limitante para la transmisión y desarrollo de la infección en los fetos. Los anticuerpos maternos de la clase IgG específicos para *T. cruzi* juegan un papel protector en las madres y en los fetos cuando los anticuerpos son transferidos a través de placenta porque contribuyen a la reducción de la parasitemia. En la placenta, aumenta la salida de parásitos opsonizados por fagocitos de la placenta.

La activación de la respuesta inmune innata en mujeres embarazadas puede contribuir a limitar la presencia y severidad de la infección congénita. Las células mononúcleares sanguíneas de madres infectadas producen niveles altos de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  bajo estimulación con *T. cruzi* que en madres no infectadas control. Esta activación celular materna sobre-regula la capacidad de su neonato no infectado para producir tales citosinas. En estudios previos encontraron que las madres que mostraban parasitemia detectable presentaban niveles altos de TNF sanguíneo y leucocitos bajos; las madres transmisoras de parásitos tenían niveles circulantes de TNF $\alpha$  a diferencia de las no transmisoras.

Estos datos sugieren mayor protección de la respuesta innata materna en las madres y su progenie, apoyando la teoría de la probable eliminación de parásitos opsonizados por monocitos activados.<sup>37</sup>

Las madres que transmiten el parásito a sus fetos, muestran baja respuesta inmune mediada por células T y producen menos IFN- $\gamma$ , los cuales contribuyen probablemente al incremento de la parasitemia. La persistencia en la reducción en la capacidad de la respuesta mediada por células T después del embarazo, así como en los grupos familiares de casos de infección congénita con *T. cruzi*, sugiere que algunas madres podrían estar predispuestas a repetir la transmisión de parásitos, lo que hace pensar en el papel de los factores genéticos que favorecen la transmisión del parásito.<sup>38</sup>

Otros factores maternos que también favorecen la transmisión congénita de *T. cruzi*, son la edad (mujeres jóvenes), si son primigestas, la mala nutrición y la pobreza. La residencia en áreas de alta densidad vectorial en donde las mujeres embarazadas se exponen a múltiples re-infecciones con *T. cruzi*, contribuye al incremento en la parasitemia materna. En estudios realizados en Bolivia, se ha visto que estos factores incrementan la morbilidad y mortalidad de la enfermedad de Chagas congénita, mientras que en Argentina es poco común.<sup>39</sup>

#### **2.9.5.3 Coinfección materna e infección congénita.**

La coinfección materna con *T. cruzi* y el VIH dan como resultado un incremento en la frecuencia y en la severidad de la enfermedad de Chagas congénita, destacando la importancia de la inmunidad materna y la alta parasitemia, en favor de la transmisión del parásito al feto. En estudios recientes, se indicó una reducción en la replicación del VIH en cultivos in vitro de placentas de humano infectadas con *T. cruzi*.<sup>40</sup>

Estudios realizados en áreas endémicas de Bolivia con *T. cruzi* y *Plasmodium vivax*, indican que las mujeres embarazadas que presentan positiva la prueba del extendido grueso de sangre para *P. vivax*, tienen parasitemia para *T. cruzi* y el grado de transmisión congénito es mayor que en las madres infectadas solo con *T. cruzi*.<sup>41</sup>



#### **2.9.5.4 Capacidad de la respuesta inmune y otros factores en el feto durante la infección congénita.**

Existe un factor crucial que limita el desarrollo de la infección parasitaria en el feto, éste está relacionado con la capacidad para montar la o las respuestas inmune específica o innata contra el parásito transmitido por su madre.

El sistema inmune innato del recién nacido está influenciado por el daño de la respuesta inflamatoria que puede llevar al parto a pre-termino. Sin embargo, como se mencionó previamente, dichas respuestas pueden ser inducidas en los neonatos por la madre cuando se infecta con *T. cruzi*. Si la producción de citosinas inflamatorias puede ser observada en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas, los niveles de marcadores inflamatorios y la activación de células NK son bastante bajas en los recién nacidos infectados congénitamente. Estos datos sugieren un aumento en el papel protector de la defensa innata en los descendientes no infectados de madres infectadas, probablemente asociado a la capacidad de sus monolitos activados para eliminar parásitos. Sin embargo, dichas defensas se ven carentes o insuficientes en neonatos infectados congénitamente.<sup>42</sup>

La respuesta inmune mediada por células T en etapas tempranas de la vida, es considerada de efectividad limitada, debido a la inmadurez relativa del sistema inmune. Inicialmente, el sistema inmune se encuentra orientado hacia un ambiente inmune Th2, el cual es esencial para la sobre-vida del feto. Las células dendríticas y células T presentan defectos cualitativos y cuantitativos durante el periodo neonatal, limitando el desarrollo de la respuesta celular Th1 CD4+ para el control de patógenos intracelulares, así como para la producción de anticuerpos. En estudios previos, se ha demostrado que los neonatos infectados congénitamente con *T. cruzi*, pueden sobreponerse a la inmadurez de su sistema inmune. Los recién nacidos infectados son capaces de montar una respuesta inmune T específica semejante a la CD8 de adultos, produciendo INF- $\gamma$ , citosina crítica en el control de la infección por *T. cruzi*. Los recién nacidos no infectados de madres infectadas muestran una respuesta específica mucho más baja. La carga parasitaria en sangre del neonato o en cordón umbilical de un caso congénito, varía de 1 a 125,000 parásitos/mL, la parasitemia establece la severidad de la enfermedad de Chagas congénita. Los recién nacidos con la

capacidad comprometida para producir INF- $\gamma$ , muestran altas parasitemias y la forma mas severa de enfermedad de Chagas congénita; esto sugiere que la respuesta mediada por células T juega un papel protector en los recién nacidos infectados congénitamente.<sup>43</sup>

A partir de estas observaciones, se puede postular que algunos recién nacidos de madres infectadas con *T. cruzi* pueden auto curarse de forma natural de su infección congénita. Esto puede tener consecuencias importantes en la interpretación de los resultados del diagnóstico de laboratorio en el neonato y en las medidas de los programas de control en salud pública relacionados con la infección congénita con *T. cruzi*. En las madres se ha visto que la cercanía familiar favorece las infecciones congénitas con *T. cruzi*; por lo que se sugiere que en algunos neonatos, la baja capacidad en la respuesta inmune promueve que los factores genéticos del huésped aumenten la susceptibilidad a la infección congénita. El genero fetal, probablemente no es un factor de riesgo para la infección congénita con *T. cruzi*, en la mayoría de los estudios se reportan frecuencias similares para ambos géneros. La complejidad básica de los factores y mecanismos de transmisión congénita de *T. cruzi* en humanos destaca el interés de producir información en estudios realizados en otros mamíferos.<sup>44</sup>

## Capítulo 3: Fundamento de las metodologías empleadas

### 3.1 Prueba Chagas Stat-Pak

Es una reacción diagnóstica inmunocromatográfica de tamizaje para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. El método emplea una combinación única de proteínas recombinantes fijadas a una membrana que retiene los anticuerpos específicos, conjugados con partículas coloreadas. La reacción diagnóstica tiene un gran nivel de sensibilidad y especificidad. La muestra se aplica en el pocillo SAMPLE. A medida que la muestra fluye lateralmente sobre la membrana, las inmunoglobulinas humanas se asocian a partículas coloreadas.

Si la muestra contiene anticuerpos anti-*T. cruzi*, estos se unirán al antígeno fijado a la membrana en el área denominada TEST, produciendo una línea rosa-púrpura. En ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* esta línea no aparece. El Chagas Stat-Pak proporciona al mismo tiempo, un control interno que detecta la presencia de IgG en la muestra. De esta manera, la muestra al continuar su migración producirá una línea rosa-púrpura en la zona CONTROL. La detección de esta línea demuestra que el reactivo está funcionando correctamente.



Figura 3.1 Interpretación de los resultados de la Inmunocromatografía para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en sangre, suero o plasma. Una sola línea color rosa-púrpura, en el área CONTROL y ninguna en el área PRUEBA indican un resultado negativo (Izquierda). La aparición de dos líneas color rosa-púrpura en el plazo de 15 minutos, una en el área CONTROL y otra en el área de PRUEBA indican un resultado positivo (Derecha).

### 3.2 Prueba de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Método para cuantificar un antígeno inmovilizado sobre una superficie sólida mediante el empleo de un anticuerpo específico ligado a una enzima de forma covalente. La cantidad de anticuerpo que se une al antígeno es proporcional a la cantidad de antígeno presente, y queda determinada por medios espectrofotométricos al medir la transformación de un sustrato transparente en un producto de color a través de la enzima enlazada.<sup>45</sup>

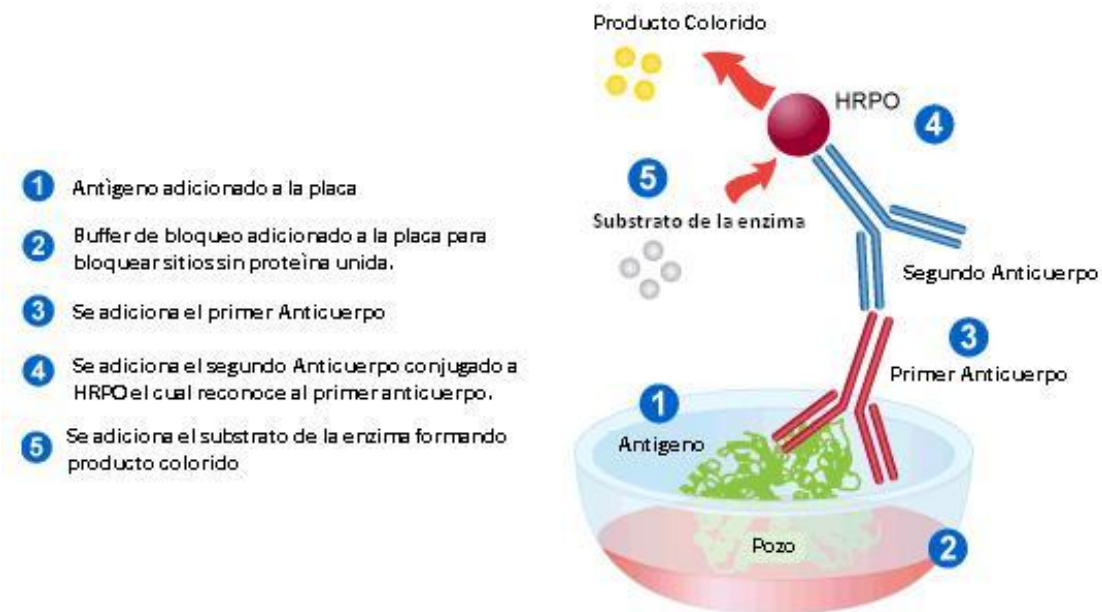


Figura 3.2 Método de ELISA para la identificación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de mujeres embarazadas.

### 3.3 Extracción de DNA

El método para aislar DNA de sangre total, se basa en 4 pasos. El primer paso en el aislamiento es el lisado de membranas y núcleos de células, se realiza en un medio alcalino, por la acción de detergentes y enzimas proteolíticas para liberar el DNA. Durante la segunda etapa se lleva a cabo la digestión con RNAsa. En la tercera etapa las proteínas celulares son removidas con una precipitación en sales, en donde las proteínas son precipitadas y en la fase acuosa se encuentran los ácidos nucleicos (DNAg). Finalmente el DNA genómico es concentrado y desalado por precipitación con isopropanol.

### 3.4 Técnica de PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es un método rápido para copiar y amplificar secuencias específicas de DNA, que se utiliza como técnica de análisis y preparación en todas las ramas de la Biología Molecular. Este método cuenta con el empleo de iniciadores cortos de nucleótidos complementarios a las secuencias existentes en los extremos del DNA que se va a amplificar. El programa de amplificación consiste en ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y amplificación. Su utilidad es que tras

la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad, virus, parásitos o bacterias causantes de una enfermedad o hacer investigación científica sobre el DNA amplificado.<sup>46</sup>

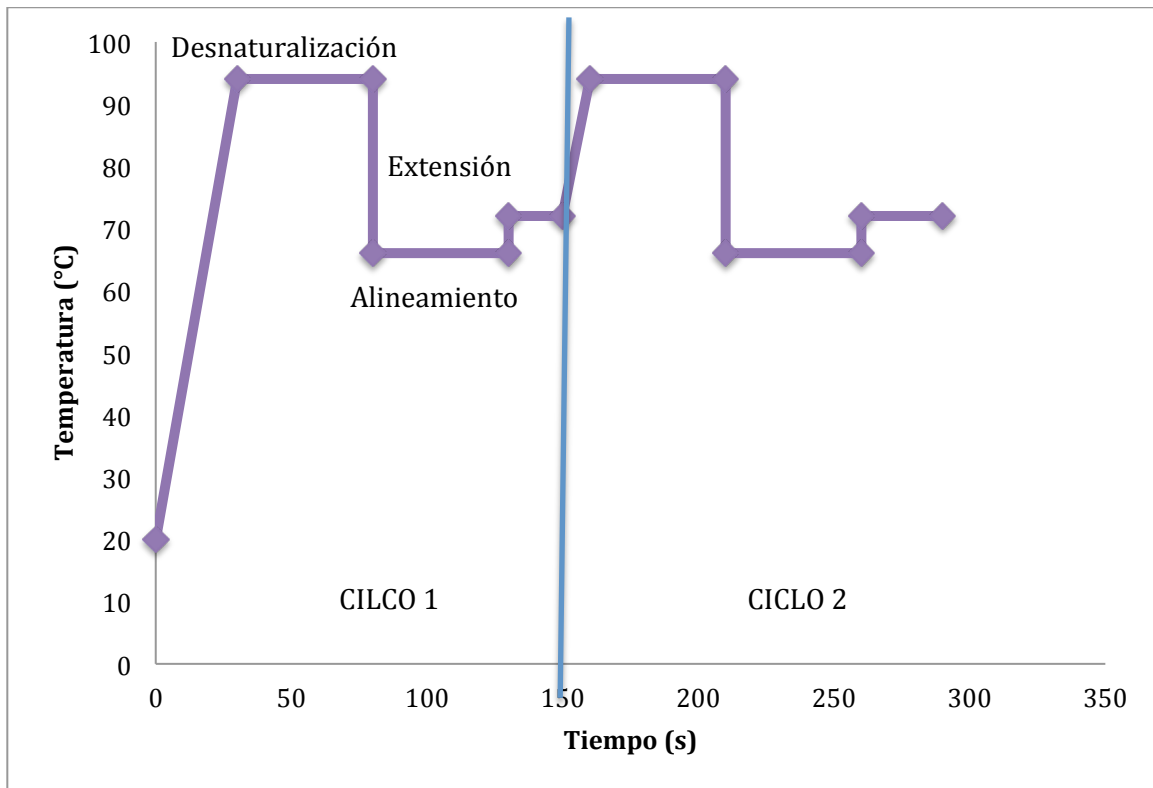


Figura 3.3. Gráfica con los pasos de la PCR.

### 3.5 Electroforesis

Es un método de laboratorio en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa. Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son colocadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo. La energía cinética de las moléculas aumenta con la temperatura, por ello a mayor temperatura mayor difusión.

## Capítulo 4: Metodología

### 4.1 Material y Métodos

#### 4.1.1 Población de estudio.

Fueron incluidas todas aquellas mujeres gestantes que aceptaron participar firmando una carta de consentimiento autorizada por el Comité de Bioética del Hospital Infantil de México Federico Gómez (Apéndice II)

El estudio se realizó en mujeres embarazadas y en los recién nacidos de madres positivas a la enfermedad de Chagas, que asistieron al Hospital General de Tapachula y al Hospital General de Palenque ubicados en áreas endémicas a la Enfermedad de Chagas en el estado de Chiapas.

El criterio de exclusión consistió en que las mujeres embarazadas no fueran extranjeras.

#### 4.1.2 Determinación del tamaño de muestra

Se calculó tomando en cuenta la prevalencia reportada en estudios previos en mujeres en edad reproductiva seropositivas en bancos de sangre para la enfermedad de Chagas en el estado de Chiapas.<sup>47</sup>

$$No. = \frac{1 - P}{P(CoV)^2}$$

Donde:

P= Prevalencia en mujeres en edad reproductiva seropositivas en bancos de sangre del estado de Chiapas 1.4%= 0.014

CoV= Coeficiente de Variación es de 0.2

$$No. = \frac{1 - 0.014}{0.014(0.2)^2} = 1760 \text{ muestras}$$

Considerando que para que un estudio tenga significancia estadística se debe tomar por lo menos el 30% de un grupo muestra.

$$1760 \text{ muestras} \rightarrow 100\%$$

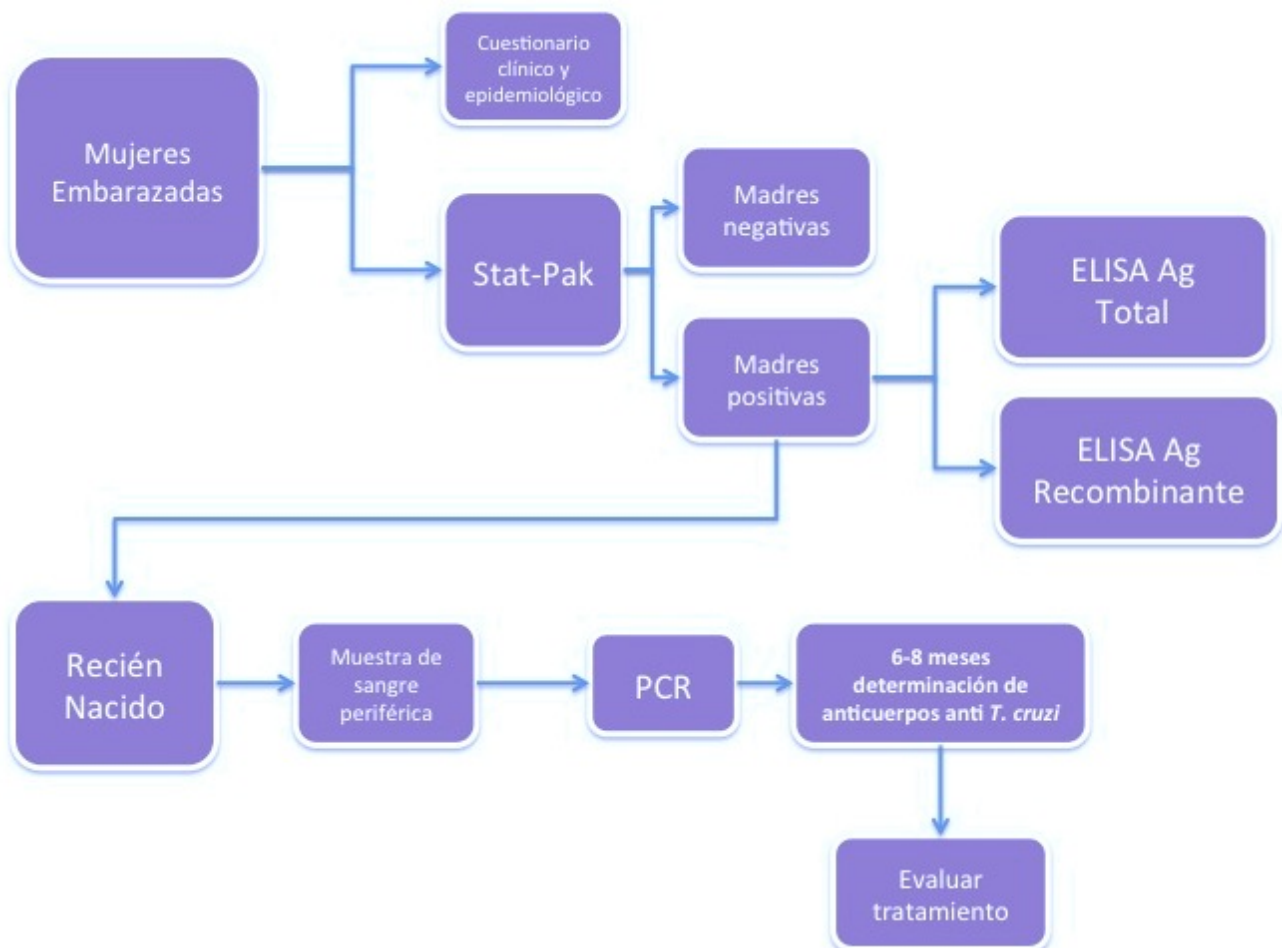
$$X \rightarrow 30\%$$

$$X = 528 \text{ muestras}$$

#### 4.1.3 Datos generales, clínicos y obstétricos de las madres y datos clínicos del recién nacidos.

Durante el trámite de ingreso al hospital, se llenó un cuestionario con los datos generales de las madres: nombre, edad, dirección, lugar de nacimiento y procedencia; además, información epidemiológica y obstétrica: conocimiento del vector-transmisor, presencia del vector-transmisor en su domicilio (se tomó en cuenta la captura intra y peridomiciliar del vector), número de transfusiones sanguíneas recibidas, número de gestaciones, resolución de los embarazos y semanas de gestación por fecha de última menstruación (FUM). En el cuestionario de los recién nacidos se incluyeron los datos antropométricos, fecha de nacimiento, sexo, Capurro, resolución del embarazo, valoración APGAR y presencia de alteraciones en hígado, corazón y/o digestivas. Se le comunicó a las madres que sus bebés podrían ser reexaminados en un futuro dependiendo del resultado.

#### 4.1.4 Diagrama de flujo para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénito.



Después de la entrevista y antes del parto de las madres que salieron positivas en la prueba de Stat-Pak, se tomaron 5 mL de sangre por punción venosa en la vena media del brazo de la madre y se colocaron en tubos BD Vacutainer para obtener el suero. Durante el parto, después del nacimiento se recogieron 3 mL de sangre venosa del recién nacido en tubos Vacutainer K2 EDTA.

#### **4.1.5 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en mujeres embarazadas.**

Tomando en consideración la recomendación de la OPS/OMS para determinar infección materna, se emplearon dos pruebas serológicas específicas para la enfermedad de Chagas: la Inmunocromatografía, que se realizó con el estuche comercial Chagas Stat-Pak™ (Chembio Diagnostic Systems, Inc.) siguiendo las especificaciones del proveedor y la prueba de ELISA con antígeno total.

- Determinación de anticuerpos anti- *T. cruzi* por ELISA Antígeno Total:
  1. Se sensibilizo la placa con una concentración de antígeno de 100 ng durante 2 horas a 37°C y se incubo toda la noche a 4°C.
  2. Después de hacer 5 lavados con PBS-T (150 µL) con pipeta multicanal, se bloqueo por 2 horas con PBS-T leche al 5% a 37°C. Al termino se lavo 5 veces con PBS-T (150 µL) para evitar inespecificidades.
  3. El primer anticuerpo se adiciono (100 µL) e incubo durante 1hora a 37°C a una dilución de 1:250 en PBS-T leche.
  4. Después de hacer los lavados con PBS-T (150 µL) se agrego el segundo anticuerpo (anti-IgG humano conjugado a peroxidasa) por 1 hora a 37°C (100 µL) a una dilución 1:10,000 en PBS-T.
  5. Para revelar la placa, después de lavar 5 veces con PBS-T (150 µL) se agrego: Buffer de citratos 10 mL + o-PD 4 mg + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.2 µL. (100 µL) durante 15 minutos en oscuridad.
  6. Por ultimo se agrego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (50 µL) para detener la reacción y se leyó la placa a 490 nm.

Se consideraron positivas todas las muestras con valor de densidad óptica mayor al punto de corte previamente determinado. (Apéndice III)



- Determinación de Anticuerpos anti-*T. cruzi* por ELISA Accutrack siguiendo las especificaciones del proveedor.(Apéndice VI).

#### 4.1.6 Presencia del DNA del parásito en sangre venosa del recién nacido por PCR.

Método:

Se utilizo para el control positivo DNA de epimastigotes cultivados en medio LIT (Apéndice IV) por un método comercial, siguiendo las especificaciones del proveedor (Apéndice V).

En muestras de sangre de recién nacidos: se extrajeron 300 µL del DNA de la muestra por un método comercial, siguiendo las especificaciones del proveedor (Apéndice V), para la amplificación por la técnica de PCR punto final, bajo las siguientes condiciones.

- Mezcla de reacción:
  - Master mix (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl, Buffer) 12.5 µL
  - Mezcla de iniciadores Tcz1/2 0.5 µL
  - DNA 3.0 µL
  - H<sub>2</sub>O c.b.p. 25 µL
- Programa de amplificación:

94°C	5min	Desnaturalización	
		Ciclo 1	
94°C	30s	Desnaturalización	} 35 Ciclos
66°C	50s	Alineación	
72°C	50s	Amplificación	

#### 4.1.7 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en niños después de 8 meses de nacidos.

La presencia de anticuerpos reactivos anti-*T. cruzi* se determinó en los niños hasta ocho meses después del nacimiento mediante dos pruebas serológicas específicas: ELISA con antígeno total y ELISA con antígeno recombinante (Apéndice VI).

## Capítulo 5: Resultados y Discusión

### 5.1 Población de estudio.

Un total de 1125 mujeres embarazadas fueron incluidos en el estudio de las cuales 22 madres fueron positivas por la pruebas de Chagas Stat-pak. De este total se encuentran distribuidas de la siguiente manera: 600 madres del Hospital General de Tapachula y 525 del Hospital General de Palenque. Los resultados se analizaron por municipio, Tapachula y Palenque.

Tabla 5.1. Distribución de madres participantes en el estudio en los Hospitales de Chiapas

	HOSPITAL	Stat-Pak		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Madres	General de Tapachula	590	10	600
	General de Palenque	513	12	525
	Total	1103	22	1125
Porcentaje	General de Tapachula	53.5%	45.45%	53.3%
	General de Palenque	46.5%	54.54%	46.7%

Se observa que del total de madres seropositivas a la prueba de Chagas Stat-Pak del estado de Chiapas el 45.45% se encuentra en el municipio de Tapachula, mientras que el 54.54% en el municipio de Palenque, lo que significa que hay mayor infección por el parásito *T. cruzi* en el municipio de Palenque, esto se puede deber a diferentes factores, como son el tipo de vivienda, la zona geográfica, el vector, la alimentación, el contacto con mamíferos, la pobreza entre otros.

De las 22 madres positivas por la prueba de Inmunocromatografía Stat-Pak hubo un 13.6% (3/22) de no participación.

## 5.2 Datos generales, clínicos y obstétricos de las madres y sus recién nacidos.

### *Edad de la Madre*

Se dividió la edad cronológica en grupos de acuerdo al SISPA (Sistema de Información en Salud para Población abierta). Obteniendo como resultados que la edad de mayor frecuencia de la Enfermedad de Chagas en las mujeres embarazadas de Chiapas es en el grupo de 20 a 35 años, ya que el 59% de madres seropositivas se encuentran en este grupo, es estadísticamente significativo ya que la  $p$  es menor de 0.05.

Tabla 5.2 Distribución de edades en madres positivas a la Enfermedad de Chagas

EDAD (años)	SEROLOGÍA		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
10-14	4	0	4
15-19	263	3	266
Madres 20-35	772	13	785
> 36	64	6	70
Total	1103	22	1125
10-14	0,4%	0,0%	0,4%
15-19	23,8%	13,6%	23,6%
Porcentaje 20-35	70,0%	59,1%	69,8%
> 36	5,8%	27,3%	6,2%

Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.001$

Probablemente esto se debe a que las madres fueron infectadas en la primera etapa de su vida, por lo que en la actualidad se encuentran en el estadio crónico con títulos de anticuerpos altos.

*Tiempo de Residencia en Chiapas:*

Se dividieron los años de residencia en rangos por estadística. Encontrando que las madres con tiempo de mas de 20 años de residencia representan el porcentaje más alto de infección. Debido a que por tratarse de una zona endémica tienen mas tiempo de exposición con el vector.

Tabla 5.3 Relación de seropositividad y Tiempo de residencia

Tiempo de Residencia (Años)	SEROLOGÍA		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
< 1	216	3	219
2 A 10	327	4	331
Madres 11 A 20	267	7	274
> 20	293	8	301
Total	1103	22	1125
< 1	19,6%	13,6%	19,5%
2 A 10	29,6%	18,2%	29,4%
Porcentaje 11 A 20	24,2%	31,8%	24,4%
< 20	26,6%	36,4%	26,8%

Prueba de Chi-cuadrado  $p = 0.450$

*Antecedentes Gineco-Obstétricos:*

*Numero de Gestaciones:*

Se dividió en tres grupos de acuerdo al SISPA Y la NOM-007-SSA-193. Se observa en la tabla 5.4 que el porcentaje mayor de madres positivas a la enfermedad de Chagas son multigestas, aunque esto no es estadísticamente significativo.

Tabla 5.4. Relación de seropositividad y Número de gestaciones

NÚMERO DE GESTACIONES	SEROLOGÍA		Total
	NEGATIVO	POSITIVO	
PRIMIGESTA	448	7	455
SECUNDIGESTA	273	5	278
Madres MULTIGESTA	382	10	392
Total	1103	22	1125
PRIMIGESTA	40,6%	31,8%	40,4%
Porcentaje SECUNDIGESTA	24,8%	22,7%	24,7%
MULTIGESTA	34,6%	45,5%	34,8%

Prueba de Chi- Cuadrada

$p = 0.556$

*Cesárea:*

El número de cesáreas es similar en madres positivas 40.9% y negativas 43.2% a la Enfermedad de Chagas, no es estadísticamente significativo.

Tabla 5.5. Relación de seropositividad y Cesáreas

CESÁREA		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Madres	No	626	13	639
	Si	477	9	486
	Total	1103	22	1125
Porcentaje	No	56,8%	59,1%	56,8%
	Si	43,2%	40,9%	43,2%

Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.827$

*Aborto:*

El número de abortos es similar en madres positivas y negativas a la Enfermedad de Chagas.

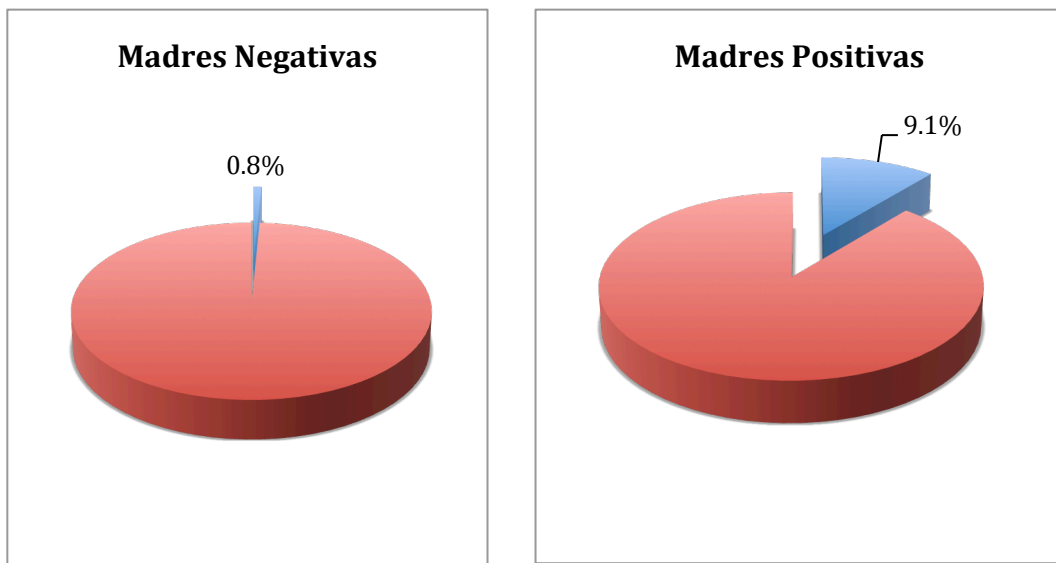
Tabla 5.6 Relación de seropositividad y Abortos.

ABORTO		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Madres	NO	998	19	1017
	SI	105	3	108
	Total	1103	22	1125
Porcentaje	NO	90,5%	86,4%	90,4%
	SI	9,5%	13,6%	9,6%

Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.516$

**Óbito:**

En cuanto a esta variable se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas comparando las madres infectadas y no infectadas y la presencia de Óbitos. El 9.1% de mujeres positivas a la enfermedad presentaron al menos un óbito, mientras que las madres negativas presentan el 0.8%. Esto según las teorías postuladas debido al número de parásitos infectantes en la barrera feto-placentaria en cualquiera de sus niveles. El riesgo relativo es 10 veces mayor en las madres seropositivas que en las madres seronegativas.



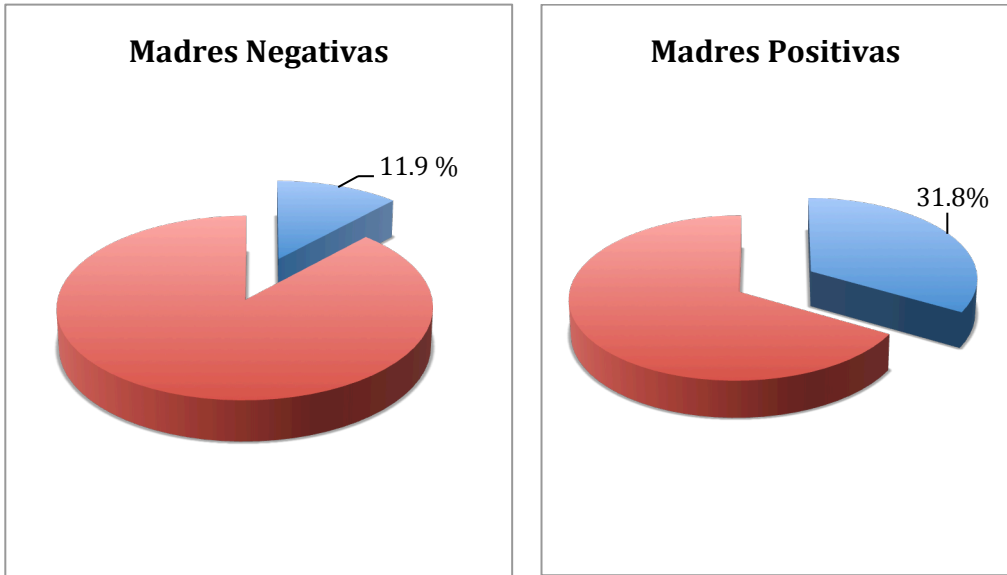
Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.000$

Figura 5.1 Porcentaje de óbitos en madres seropositivas a la enfermedad de Chagas en comparación con madres seronegativas.

Se sospecha que la infección por el parásito *T. cruzi* en mujeres embarazadas puede ser una probable causa de óbitos en mujeres seropositivas, sin embargo no se hicieron estudios para demostrar que esta sea la causa.

**Ruptura Prematura de Membranas (RPM):**

En esta variable hay diferencias estadísticamente significativas, ya que de las madres positivas el 31.8% presento RPM que es más del doble del porcentaje que presentaron las madres negativas 11.9%.



Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.005$

Figura 5.2 Porcentaje de RPM en madres seropositivas a la enfermedad de Chagas en comparación con madres seronegativas.

*Edad Gestacional por FUR:*

Se dividió en 3 grupos de acuerdo a las semanas de evolución del embarazo con base en el SISPA. No hubo alteración alguna ya que la mayoría de las madres infectadas tubo un embarazo a termino.

Tabla 5.7 Relación de seropositividad y FUR.

EMBARAZO (FUR)		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Madres	PRETERMINO	80	2	82
	A TERMINO	988	20	1008
	POSTERMINO	34	0	34
	Total	1102	22	1124
Porcentaje	PRETERMINO	7,3%	9,1%	7,3%
	A TERMINO	89,7%	90,9%	89,7%
	POSTERMINO	3,1%	0,0%	3,0%

Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.676$

*Colocación de Hemoderivados:*

Las madres seropositivas no tuvieron hemoderivados mientras que las madres negativas tuvieron 0.6%, no hay diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5.8 Relación de seropositividad y Hemoderivados.

HEMODERIVADOS		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Madres	SI	7	0	7
	NO	1096	22	1118
	Total	1103	22	1125
Porcentaje	SI	0,6%	0,0%	0,6%
	NO	99,4%	100,0%	99,4%

Prueba de Chi- Cuadrado  $p=0.708$

De los factores de riesgo estudiados en las mujeres, tales como el tiempo de residencia, el número de gestaciones, el número de abortos, cesáreas, y administración previa de hemoderivados, asociados con la serología positiva; no resultaron ser factores dominantes para aumentar la probabilidad de ser seropositivas. Se observa que el valor de  $p>0.05$  por la prueba de Chi-Cuadrado, por lo que no son estadísticamente significativos. Mientras que los datos generales de la madre, la edad asociada con la serología positiva es un factor de riesgo, ya que es estadísticamente significativa teniendo un valor de  $p<0.05$  y los datos ginecobstétricos tales como el número de óbitos y la ruptura prematura de membranas asociados con la serología positiva tienen mayor índice de presentación que en madres con serología negativa, el valor de  $p$  fue menor de 0.05.



## Sexo, Datos antropométricos y alteraciones orgánicas de los Recién Nacidos

### Sexo de RN:

Del total de hijos de madres infectadas, el 52.4% fue de sexo femenino y el 47.9% masculino sin embargo esto no representa una diferencia estadísticamente significativa con los hijos de madres no infectadas.

Tabla 5.9 Distribución de sexo de los RN

SEXO		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Recién Nacidos	FEMENINO	528	11	539
	MASCULINO	574	10	584
	Total	1102	21	1123
Porcentaje	FEMENINO	47,9%	52,4%	48,0%
	MASCULINO	52,1%	47,6%	52,0%

Prueba de Chi-Cuadrado  $p=0.685$

### CAPURRO:

Se dividió en tres grupos de acuerdo a la edad gestacional determinada por el médico pediatra que atendió a los RN. Encontrando que de los hijos de madres infectadas el 4.8% fue Pretérmino, 95.2% fue a Término y ninguno Postérmino, sin embargo esto no representa diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5.10 Edad gestacional por Capurro de los RN

CAPURRO		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Recién Nacidos	PRETERMINO	61	1	62
	A TERMINO	1040	20	1060
	POSTERMNO	1	0	1
	Total	1102	21	1123
Porcentaje	PRETERMINO	5,5%	4,8%	5,5%
	A TERMINO	94,4%	95,2%	94,4%
	POSTERMNO	0,1%	0,0%	0,1%

Prueba de Chi-Cuadrada  $p=0.979$

**PESO, TALLA Y PERIMETRO CEFALICO:**

Estas variables no arrojan datos estadísticamente significativos, los hijos de madres positivas tienen datos dentro de parámetros normales y no existe diferencia con los hijos de madres negativas.

**ALTERACIONES HEPATICAS Y DIGESTIVAS:**

Del total de hijos de madres positivas a la Enfermedad de Chiapas ninguno presentó alteraciones a este nivel. Siendo mayor la frecuencia de casos en hijos de madres negativas a la Enfermedad de Chagas.

Tabla 5.11 Frecuencia de Alteración Hepática en RN en Chiapas

A. HÍGADO		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Recién Nacidos	SI	4	0	4
	NO	1098	21	1119
	Total	1102	21	1123
Porcentaje	SI	0,4%	0,0%	0,4%
	NO	99,6%	100,0%	99,6%

Prueba de Chi- Cuadrada  $p=0.782$

Tabla 5.12 Frecuencia de Alteraciones Digestivas en RN en Chiapas

A. DIGESTIVAS		SEROLOGÍA		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
Recién Nacidos	SI	3	0	3
	NO	1099	21	1120
	Total	1102	21	1123
Porcentaje	SI	0,3%	0,0%	0,3%
	NO	99,7%	100,0%	99,7%

Prueba de Chi-Cuadrada  $p=0.811$

### ALTERACIONES CARDIACAS:

Del total de niños hijos de madres positivas para la Enfermedad de Chagas el 4.8% presento alteraciones cardiacas. Lo cual establece una diferencia estadísticamente significativa ya que fue menor la frecuencia de alteraciones cardiacas en hijos de madres negativas a la Enfermedad de Chagas.

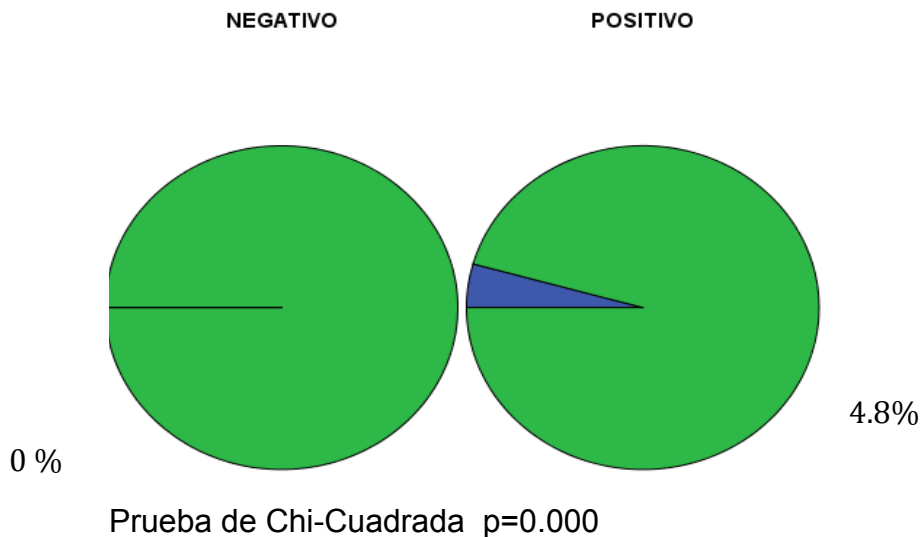


Figura 5.3 Porcentaje de alteraciones cardiacas en hijos de madres seropositivas a la enfermedad de Chagas.

Es posible que existan alteraciones cardiacas en los recién nacidos provocadas por el parásito *T. cruzi* en la infección congénita, el análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas  $p < 0.05$ . Esto puede deberse a que *T. cruzi* presenta tropismo tisular, es por esa razón que las cepas mexicanas afectan mas a tejido cardiaco, que a otros tejidos. Sin embargo no se hicieron estudios para demostrar que esto es causado por la presencia del parásito.

El sexo, CAPURRO, APGAR, los datos antropométricos (peso, talla, perímetro cefálico), las alteraciones hepáticas y digestivas no presentaron diferencias estadísticas entre ambos grupos.

### 5.3 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en mujeres embarazadas.

#### ELISA Ag Total

En la Figura 5.4 se muestra a las madres infectadas por *T. cruzi* por arriba del punto de corte para la prueba de ELISA Ag total, lo que nos confirma que son positivas a la enfermedad de Chagas.

Tabla 5.13. Absorbancia a 490nm de los sueros de madres seropositivas por la prueba de Stat-Pak en Chiapas de los Municipios de Tapachula y Palenque

Tapachula	Palenque
Abs 490nm	Abs 490nm
0.676	1.302
0.499	2.067
0.821	1.676
1.009	1.497
1.088	1.906
1.252	0.316
0.765	0.562
0.959	0.513
	0.464
	0.403
	0.444
$\chi = 0.884$	$\chi = 1.014$

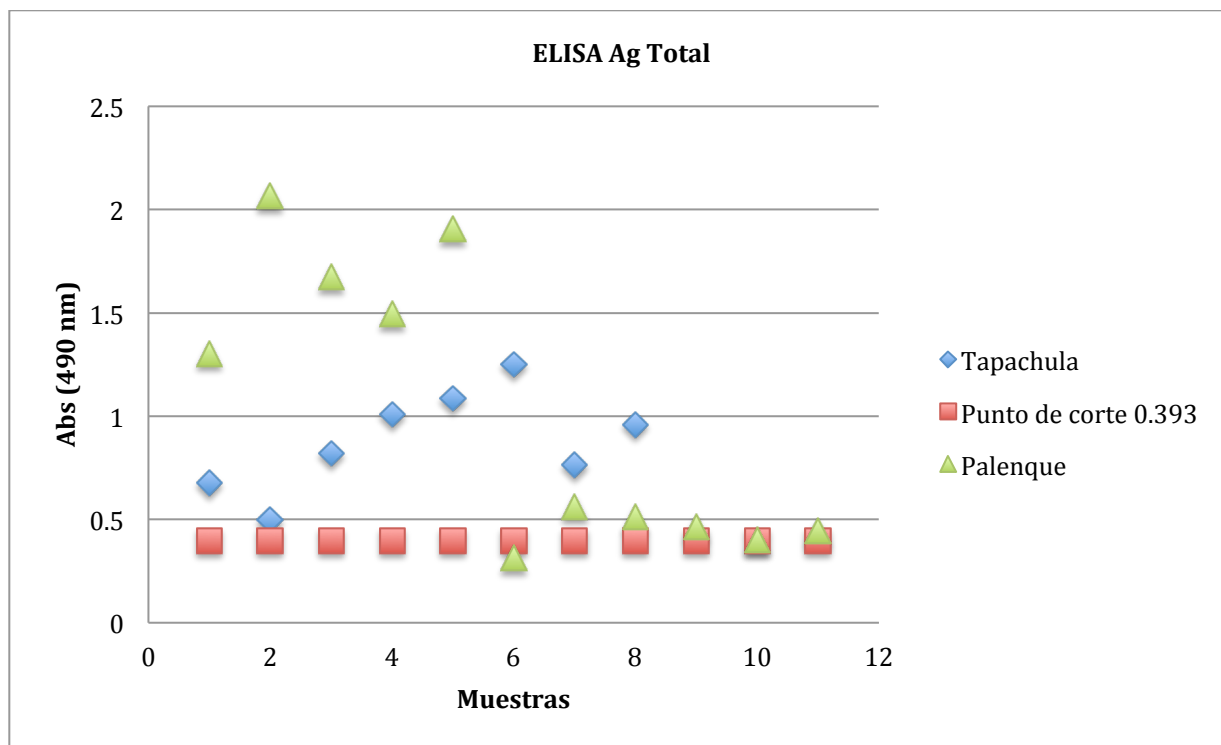


Figura 5.4 Gráfica de la prueba ELISA Ag Total de madres e hijos infectadas por *T. cruzi* en el estado de Chiapas, de los municipios de Tapachula y Palenque..

La prevalencia serológica de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas en el estado de Chiapas es de 1.6% (18/1125).

Tabla 5.14 Frecuencia de mujeres positivas con anticuerpos anti-*T. cruzi* por la prueba de ELISA Ag. Total

	Prevalencia	Porcentaje
Válidos NEGATIVA POR STAT-PAK	1103	98.0%
POSITIVO AG TOTAL	18	1.6%
NEGATIVO AG TOTAL	1	0.1%
SIN MUESTRA	3	0.3%
Total	1125	100.0%

### ELISA Ag Recombinante

Para la determinación de la anticuerpos anti-*T. cruzi* también se realizó la prueba de ELISA Ag recombinante que se muestra en la figura 5.5. El punto de corte es predeterminado por el Kit ELISA ACCUTRAK (Punto de corte = control negativo + 0.100) = (0.180 + 0.100 = 0.280).

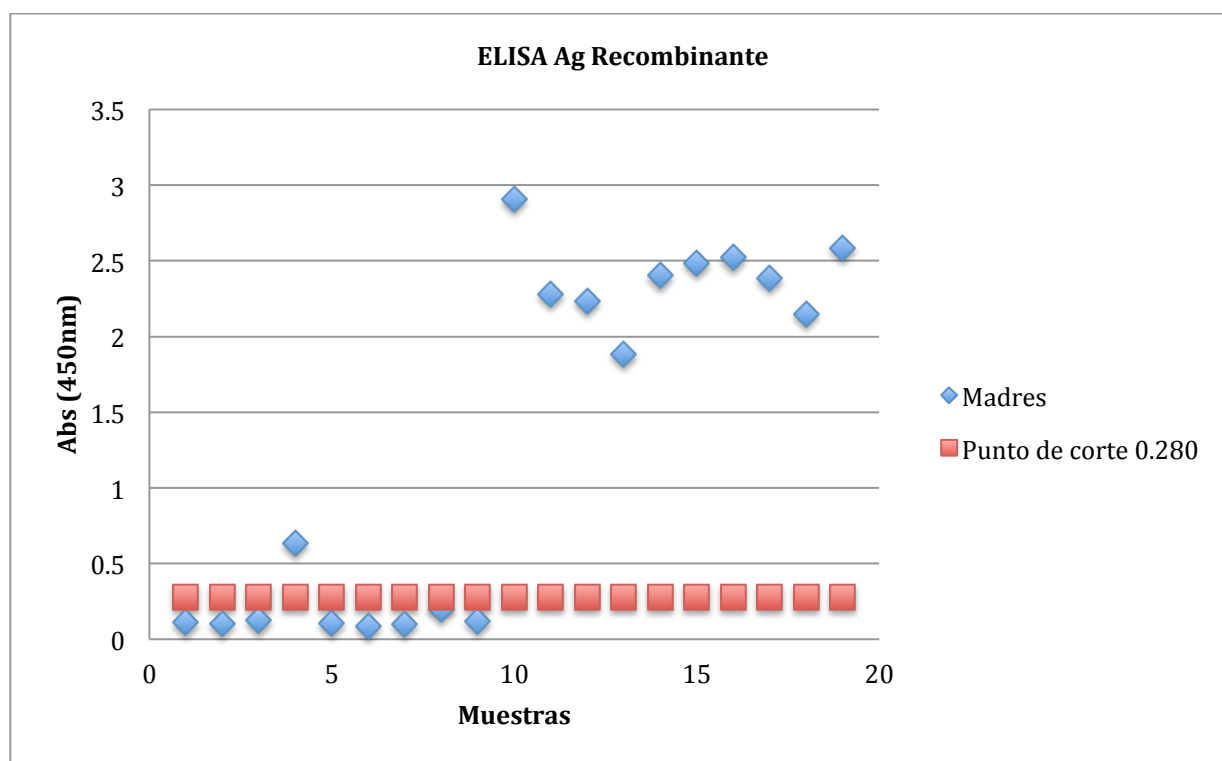


Figura 5.5: Gráfica de la prueba ELISA Ag recombinante de madres e hijos infectadas por *T. cruzi* en los municipios de Tapachula y Palenque

#### 5.4 Presencia del DNA del parásito en sangre venosa del recién nacido por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los resultados positivos en la búsqueda del DNA del parásito en los recién nacidos del estado de Chiapas en los municipios Tapachula y Palenque se presenta en las figuras 5.6, 5.7 y 5.8. Se observa la presencia de bandas de amplificación de 200 pb (pares de bases) correspondientes a *T. cruzi* en 9 de 18 niños lo que representa una frecuencia del 50% de transmisión, pero no se sabe si el parásito está vivo o muerto ya que la prueba de PCR solo detecta DNA, por lo que se tiene que hacer pruebas inmunológicas para saber realmente la frecuencia de transmisión materno-fetal.

TAPACHULA.

Electroforesis con gel de agarosa al 2%.

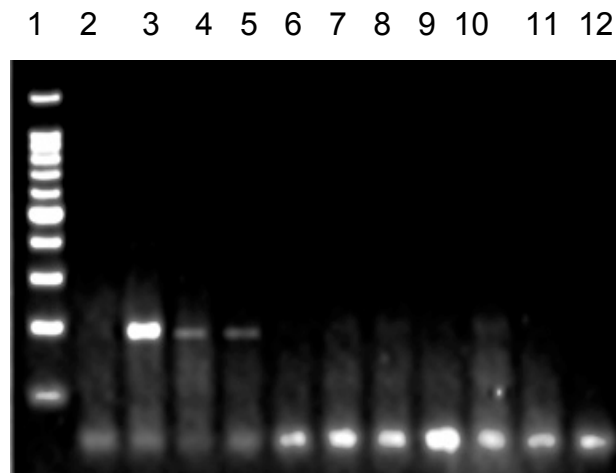


Figura 5.6. Amplificaciones del DNA extraído de sangre venosa de los recién nacidos de madres positivas a *T. cruzi* usando los iniciadores Tcz1/Tcz2 del municipio de Tapachula. Carril 1: Pesos moleculares, Carril 2 Blanco, Carril 3 Cepa *T. cruzi*, Carril 4 RN 5, Carril 5 RN 14, Carril 6 RN 15, Carril 7 RN 1, Carril 8 RN 2, Carril 9 RN 3, Carril 10 RN 4, Carril 11 RN 12, Carril 12 Blanco.

## PALENQUE

Electroforesis con gel de agarosa al 2%.

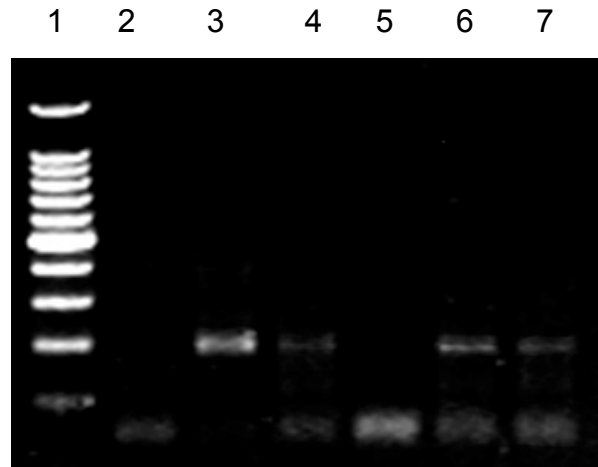


Figura. 5.7 Amplificaciones del DNA extraído de sangre venosa de los recién nacidos de madres seroreactivas a *T. cruzi* usando los iniciadores Tcz1/Tcz2 del municipio de Palenque. Carril 1: Pesos moleculares, Carril 2: Blanco, Carril 3: Cepa *T. cruzi*, Carril 4 RN 34, Carril 5 RN 37, Carril 6 RN 38, Carril 7 RN 36

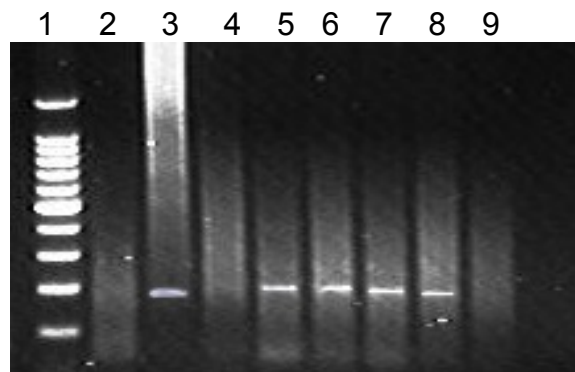


Figura 5.8 Amplificaciones del DNA extraído de sangre venosa de los recién nacidos de madres seroreactivas a *T. cruzi* usando los iniciadores Tcz1/Tcz2 del municipio de Palenque. Carril 1: Pesos moleculares, Carril 2 Blanco, Carril 3 Cepa *T. cruzi*, Carril 4 RN 28, Carril 5 RN 29, Carril 6 RN 30, Carril 7 RN 31, Carril 8 RN 32, Carril 9 RN 33.

### 5.5 Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los niños después de 8 meses de nacidos de madres seropositivas a la enfermedad de Chagas.

Se determino mediante dos pruebas serológicas la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* encontrando una frecuencia de transmisión materno fetal del 12.5%.

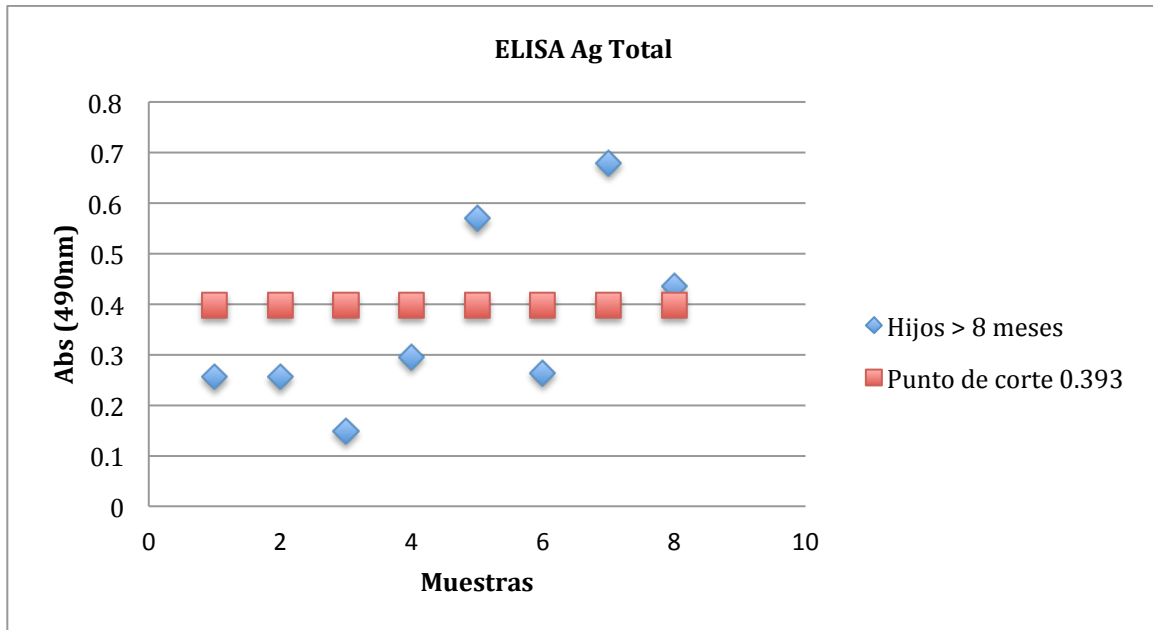


Figura 5.9 Prueba de ELISA Ag total en hijos de madres seropositivas después de 8 meses de nacidos.

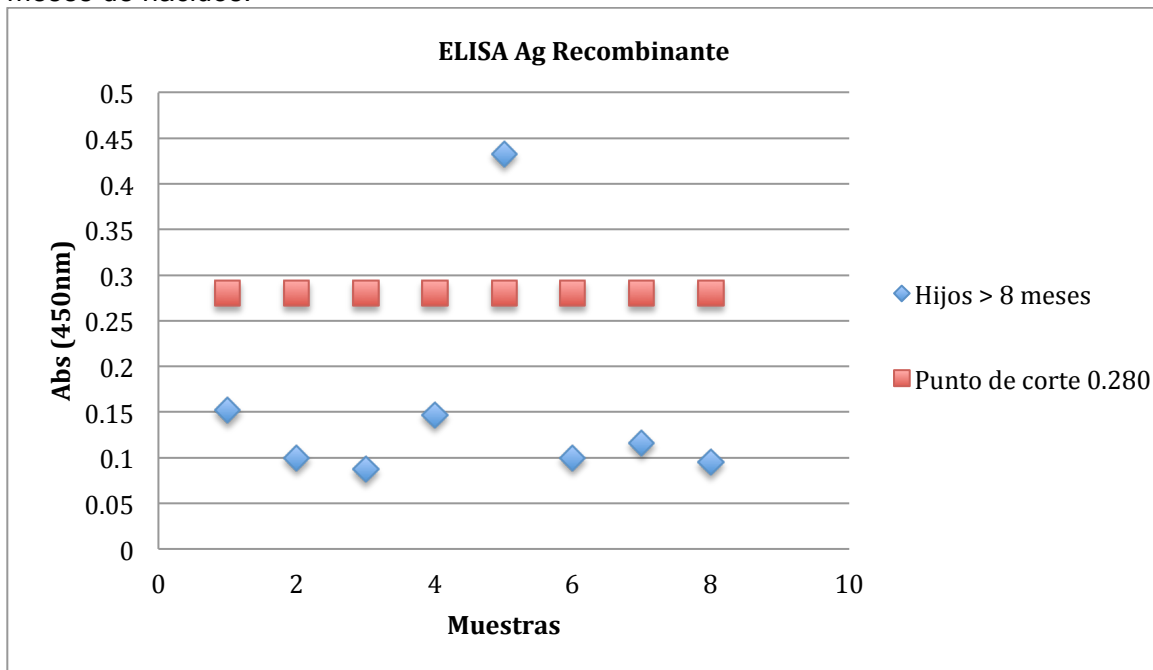


Figura 5.10 Prueba de ELISA Ag Recombinante en hijos de madres seropositivas después de 8 meses de nacidos.



## Capítulo 6: Conclusiones

La frecuencia de la Enfermedad de Chagas en madres seropositivas del estado de Chiapas fue del 1.6% (18/1125), determinado por dos técnicas, ELISA e Inmunocromatografía (Stat-Pak), mediante la identificación de anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en suero de mujeres embarazadas.

Los datos ginecobstétricos tales como el número de óbitos y la ruptura prematura de membranas fueron estadísticamente significativos asociados con la serología positiva lo que significa que tienen mayor índice de presentación que en madres con serología negativa.

Se encontró DNA del parásito por la prueba de PCR en 9 de 18 RN (50%) de madres seropositivas en los municipios de Palenque (7) y Tapachula (2) del estado de Chiapas.

Es posible que existan alteraciones cardiacas en los recién nacidos provocadas por el parásito *T. cruzi* en la infección congénita, el análisis estadístico mostró que hay diferencias significativas.

El porcentaje de transmisión materno-fetal en el estado de Chiapas fue del 12.5% (1/8) determinado por dos técnicas de ELISA, identificando anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de los hijos de madres seropositivas. Los siete RN de Palenque con PCR positivo todavía no cumplen los ocho meses necesarios para la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

Se administró el tratamiento específico Nifurtimox (Lampit) 120mg a el niño infectado por *T. cruzi*.

## Capítulo 7: Bibliografía

1. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, et al. (2012) Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. PLoS Negl Trop Dis 6(7): e1689. doi:10.1371/journal.pntd.0001689
2. Salazar SPM. Memorias del primer encuentro Internacional sobre Enfermedad de Chagas en México. UNAM 2000, 7-20.
3. Parta A. Significans of *trypanosoma cruzi* diferenciacion and selection, relationship with clinical and epidemiological varieties. RevSoc Bra Med Trop 1995; 49:370-78.
4. Jiménez EC, Campos GV. Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problema of public health little studied in Mexico. Experimental Parasitology 2012; 131:425-32.
5. Becerril MA. Parasitología Médica. Mc GrawHill 2ª edición 2008; Enfermedad de Chagas y otras trypanosomosis 11:66-75.
6. WHO. 2002. Control of Chagas disease. WHO Tech Rep Series 905. Geneva, Switzerland: WHO.
7. OPS/WHO/NTD/IDM. 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas em las Américas. OPS/HDM/CD/425-06.
8. Schmunis G. 2007. The globalización of Chagas disease. ISBT Science Series 2:6-11.

9. DR/OMS 20. 2005. Programa especial de investigación y enseñanza sobre Enfermedades Tropicales (TDR).
10. Quijano HI, Dumonteil E. Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Landes Bioscience* 2011;7:1184-91.
11. Zaman V. Atlas of Medical Parasitology. Third Edition 1992; *Trypanosoma cruzi* 1:15.
12. World Health Organization. Control of Chagas disease (Report of a WHO Expert Committee). WHO Tech. Rep. 2001; Ser. 811: 1.
13. Santos L.S., Torres R.M., Machado A.G.F., Bahia M.T., Martins H.R., Teixeira C.A., Coelho R.J.G., Albajar V.P., Martins F.O.A., Lana M. 2012. In house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 45:35-44.
14. Riera C., Verges M., Iniesta L., Fisa R., Gállego M., Tebar S., Portús M. 2012. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg.* 86:412-416.
15. Cura E., Wendel S. 1994. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. Washington D.C. U.S.A.: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional 61.

16. Moya P., Moretti E. 1997. Doença de Chagas congênita. En clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Pinto Días JC e Rodrigues Coura J. Editora Fiocruz.
17. Carlier Y., Torrico F. 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. Rev Soc Bras of Med Trop. 36:767-771.
18. Fernandez A.S., Lambot M.A., Torrico F., Alonso V.C., Cordoba M., Suarez E., Christophe N.J., Carlier Y. 2005. Las lesiones placentarias en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 38:84-86.
19. Benirschke K., Kaufmann P., Baergen R. 2006. Pathology of the human placenta. Springer Science + Business Media, New York.
20. Virreira M., Truyens C., Alonso V.C., Brutus L., Jijena J., Torrico F., Carlier Y., Svoboda M. 2007. Comparison of *Trypanosoma cruzi* Lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. Am J Trop Med Hyg. 77:102-106.
21. Carlier Y. 2005. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 38:II 105-107.
22. Akinbi H.T., Narendran V., Pass A.K., Markart P., Hoath S.B. 2004. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol. 191:2090-2096.

23. Moya P.R., Villagra L., Risco J. 1979. Congenital Chagas disease: anatomopathological findings in the placenta and umbilical cord. *Rev Fac Cienc Med Cordoba*. 37:21-27.
24. Jorg M.E. 1992. The transmission of *Trypanosoma cruzi* via human milk. *Rev Soc Bras Med Trop*. 25:83.
25. Hoft D.F., Farrar P.L., Kratz O.K., Shaffer D. 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun*. 64:3800-3810.
26. Jauniaux E., Gulbis B., Burton G.J. 2003. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the fetus –a review. *Placenta*. 24:86-93.
27. Moretti E., Basso B., Castro I., Carrizo P.M., Chaul M., Barbieri G., et al. 2005. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bras Med Trop*. 38:53-55.
28. Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., et al. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revisión meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104:1051-1054.
29. Burgos J.M., Althch J., Bisio M., Duffy T., Valadares H.M., Scidenstein M.E., et al. 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 37:1319-1327.

30. Puerto F.D., Sanchez Z., Nara E., Meza G., Paredes B., Ferreira E., et al. 2010. *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.* 82:386-390.
31. Corrales R.M., Mora M.C., Negrette O.S., Diosque P., Lacunza D., Virreira M., et al. 2009. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infect Genet Evol.* 9:278-282.
32. Brabin L. 1992. The epidemiological significance of Chagas' disease in women. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:73-79.
33. Brutus L., Schneider D., Postigo J., Romero M., Santalla J., Chippaux J.P. 2008. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop.* 106:195-199.
34. Scapellato P.G., Bottaro E.G., Rodriguez B.M.T. 2009. Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? *Rev Soc Bras Med Trop.* 42:107-109.
35. Brutus L., Schneider D., Postigo J., Delgado W., Mollinedo S., Chippaux J.P. 2007. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101:1159-1160.
36. Cuna W.R., Choque A.G., Passera R., Rodriguez C. 2009. Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns. *J Parasitol.* 95:891-894.

37. Marchant A., Goldman M. 2005. T cell-mediated immune responses in human newborns ready to learn? *Clin Exp Immunol.* 141:10-18.
38. Schijman A.G., Altcheh J., Burgos J.M., Biancardi M., Bisio M., Levin M.J. et al. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 52:441-449.
39. Torrico F., Alonso V.C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M.C., Dramaix M., et al. 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 70:201-209.
40. Grieves J.L., Hubbard G.B., Williams J.T., Vandeberg J.L., Dick Jr E.J., Lopez A.J.C., et al. 2008. *Trypanosoma cruzi* in non-human primates with a history of stillbirths: a retrospective study (*Papio hamadryas* spp) and case report (*Macaca fascicularis*). *J. Med Primatol.* 37:318-328.
41. Mjihdi A., Lambot M.A., Stewart I.J., Detournay O., Noel J.C., Carlier Y. et al. 2002. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am J Pathol.* 161:673-680.
42. Hall C., Pierce E., Wimsatt A., Hobby D.T., Meers B. 2010. Virulence and vertical transmission of two genotypically and geographically diverse isolates of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Parasitol.* 96:371-376.
43. Klein J.O., Baker C., Remington J.S., Wilson C. 2006. Current concepts of infections of the fetus and newborn infant. In: Remington J.S., Klein J.O., Wilson C., Baker C. (Eds.) *Infectious Diseases of the fetus and newborn infant.* Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 13-25.

44. Sanchez N.O., Mora M.C., Basombrio M.A. 2005. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* 115:e668-e672.
45. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Elsevier Saunders 6ª Edición 2008.
46. Karp G. Biología celular y molecular. Mc Graw Hill 4ª Edición 2005
47. Dawson SB, Trapp RG. Bioestadística médica. 2a. Ed. Manual moderno.



## Apéndice I

### REACTIVOS

#### Amortiguador Fosfato Salino, PBS pH 7.4

Cloruro de Sodio (NaCl)	136 mM
Cloruro de Potasio (KCl)	26 mM
Fosfato de Potasio Monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.7 mM
Fosfato de Sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	8 mM

#### Amortiguador de lisis de Proteínas.

Nonidet p-40%	1%
Cloruro de Sodio (NaCl)	150 mM
Tris-HCl, pH 7.6 (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> .CHI)	10 mM
Fenilmetilsulfonil Florido (PMSF, C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> FO <sub>25</sub> )	100 mM
Acido Etilendiamino Tetra acetico (EDTA)	2 mM
Aprotinina	1 µg/mL
Pepstatina	1 µg/mL
Leupeptina	1 µg/mL

#### Amortiguador de Carbonatos, pH 9.6.

Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	0.1 N
Carbonato de Sodio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.1 N

#### Amortiguador Fosfato Salino-Tween 20 (PBS-T)

PBS	400 mL
Tween20 (Polyoxyetilen-sorbitan monolaurato)	0.05% (200 µL)

#### Solución de Bloqueo al 5%.

PBS-T	50 mL
Albúmina Serica Bovina	2.5 g

**Amortiguador de Citrato Fosfato pH 5.**

Acido Cítrico (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ).	0.1 M
Fosfato de Sodio dibasico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.2 M

**Solución Reveladora de la Reacción.**

Amortiguador de Citrato-Fosfato	12 mL
o-fenilendiamina (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> )	0.0048 g
Peroxido de Hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1.4 µL

**Solución para detener la Reacción.**

Acido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4 N
---	-----

**Amortiguador de Lisis de DNA pH 8.**

Acido Etilendiaminatetra acetico (EDTA)	0.1 M
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.15 M
Dodecil Sulfato de Sodio (C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> SNa, SDS 10%)	0.5% final
Proteinasa K	0.1 mg/mL final

**Etanol Absoluto.**

Etanol Absoluto (CH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> OH)

**Acetato de Sodio:**

Acetato de sodio (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na)	3 M
--	-----

**RNAsa.**

RNAsa	200 µg/µL
-------	-----------

Es una endorribonucleasa que actúa específicamente en residuos de pirimidina de cadena sencilla en el extremo 3' del RNA y corta la unión fosfato del nucleótido adyacente. Los productos terminales son pirimidina 3' fosfato terminal.

Solución STOCK de RNAsa	Concentración Final	
Volumen		
Tris-base 1 M pH 7.5 (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> )	10 mM	100 mL
Cloruro de Sódio (NaCl) 5 N	15 mM	30 mL

RNAsa	0.002 g	200 mg/mL
H <sub>2</sub> O c.b.p		1 mL

Hervir la solución 10 minutos

#### **Amortiguador Tris-EDTA (TAE 50X) pH 8.**

Tris-HCl (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> ).HCl)	10 mM
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	1 mM

#### **Amortiguador Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE 50X) pH 8.**

Tris-HCl (NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> ).HCl)	90 mM
Ácido Bórico H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	90 mM
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	2 mM

#### **Amortiguador Jugo Azul.**

Glicerol (HOCH <sub>2</sub> CH (OH)CH <sub>2</sub> OH)	50% (v/v)
Dodesil Sulfato de Sodio SDS(C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>24</sub> SNa)	0.1% (v/v)
EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	0.1 M
Azul de Bromofenol	
( <sup>3'</sup> , <sup>3''</sup> , <sup>5'</sup> , <sup>5''</sup> -tetra bromofenol sulfonftalein)	0.025% (p/v)
Xilenciano (C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na)	0.025% (p/v)

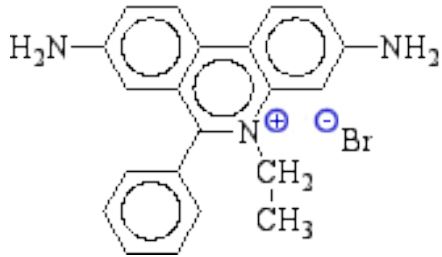
#### **Solución de Bromuro de Etidíó.**

Solución de Bromuro de Etidíó. 10 mg/mL

Se usa para teñir geles de agarosa a una concentración final de 3.3 µg/mL.

El bromuro de etidíó es una sustancia mutagénica, cancerogénica y venenosa que ingresa por vía oral, cutánea y subcutánea; por lo que se debe tener extremo cuidado al utilizando, evitando su ingestión, inhalación o absorción por la piel, por ello siempre se deben usar guantes. Su descomposición por calor genera gases tóxicos de óxido nítrico. Después de usarse debe llevarse a cabo una descontaminación del material; adicionar agua para reducir la concentración, adicionar permanganato de potasio 0.5 M, mezclar y adicionar ácido clorhídrico 2.5 N, mezclar y desechar la solución.

También se puede descontaminar con hidróxido de sodio 10 N durante 10 minutos o bien con carbón activado.

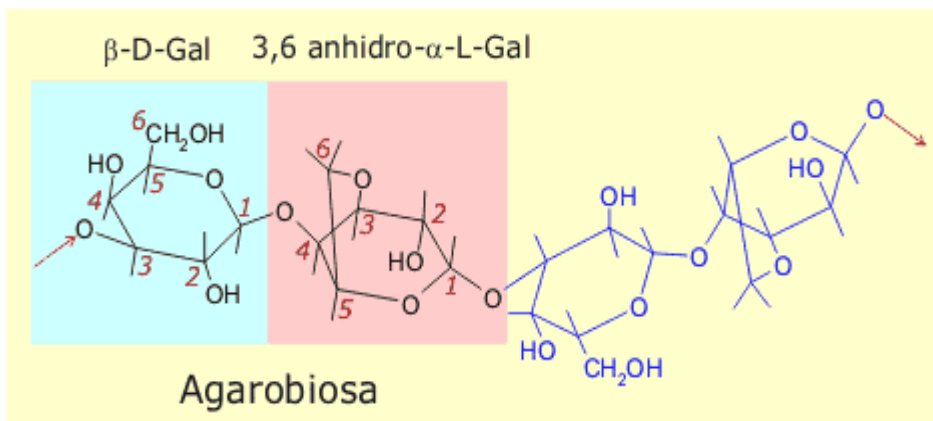


**Figura** Estructura del Bromuro de etidio.

**Agarosa.**

Agarosa. (Grado Biología Molecular.) 1.5%

Es extraída de algas marinas, es un polímero lineal cuya estructura es:



**Figura** Estructura de la agarosa.

La polimerización de la agarosa forma una matriz y su densidad es determinada por la concentración de agarosa.

## Apéndice II

### Carta de consentimiento informado

Numero de folio: \_\_\_\_\_

### Hospital Infantil de México Federico Gómez

### Carta de Consentimiento Informado

Fecha (dia/mes/año) \_\_\_\_\_

**Título del Proyecto:** "Transmisión materno-fetal de: un problema de salud poco estudiado en México"

#### ¿Por qué se hace este estudio?

En el sureste de nuestro país donde se encuentra el estado de Chiapas muchas personas incluyendo las mujeres embarazadas pueden estar infectadas por el parásito llamado *Trypanosoma cruzi*, que provoca la enfermedad de Chagas. Este parásito se transmite frecuentemente por la picadura de una chinche, sin embargo las personas infectadas no lo saben porque solo presentan síntomas hasta que la enfermedad ya esta muy avanzada. Las mujeres embarazadas pueden transmitir el parásito a sus recién nacidos y por esto, la estamos invitando a usted que esta embarazada a participar en este estudio.

#### Propósito del estudio

Se quiere conocer si usted esta infectada con este parásito y en caso de que así fuera, también se quiere conocer si su hijo ha nacido infectado por este parásito.

#### ¿Cómo participara la madre en este estudio?

1. Se obtendrá una gota de sangre para buscar al parásito. El resultado se conocerá en los próximos 15 minutos.
2. Si el resultado es positivo a la enfermedad y si usted acepta participar, se le tomarán 10mL de sangre venosa.

#### ¿Cómo va a participar su hijo en el estudio?

1. Si usted acepta participar inmediatamente después de que nazca su hijo se le tomarán 2mL de sangre del cordón umbilical. Este procedimiento no representa ninguna molestia ni riesgo para su hijo. En la sangre colectada se buscara si esta presente el parásito.
2. En caso de que se encuentre el parásito a su hijo se le citara en 4 ocasiones. En la primera visita que será a los 7 días el médico le iniciara tratamiento, proporcionándole un medicamento y explicándole la forma en que debe dárselo a su hijo. En la siguientes 2 visitas que serán a los 3 y 6 meses al niño se le continuara su tratamiento y se le obtendrá sangre de su talón en cada cita 20 gotas aproximadamente para saber si el parásito se encuentra todavía en la sangre del niño. En la ultima visita a los 9 meses, se obtendrán 2mL de sangre por punción venosa del antebrazo para investigar si el parásito ha sido eliminado o no.



## HISTORIA CLÍNICA MATERNA

Número de folio: \_\_\_\_\_

### 1. Datos de Identificación:

I. Nombre: \_\_\_\_\_

ii. Edad: \_\_\_\_\_

iii. Dirección:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

iv. Teléfono(celular): \_\_\_\_\_

v. E-mail: \_\_\_\_\_

vi. Tiempo de residencia actual: \_\_\_\_\_

vii. Edad gestacional: \_\_\_\_\_

### 2. Datos epidemiológicos:

i. Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

ii. Procedencia: Local: \_\_\_\_\_

Foránea: \_\_\_\_\_

iii. Ha visitado otros lugares en:

a) las dos últimas semanas

b) el último mes

c) el último año

iv. Lugares que ha visitado:

País \_\_\_\_\_ Estado \_\_\_\_\_

Municipio \_\_\_\_\_ Localidad \_\_\_\_\_

v. ¿Has tenido contacto con chinches?                      Sí                      No

vi. ¿Existen familiares o vecinos con enfermedades transmitidas por chinches en su localidad?                      Sí                      No

vii. ¿Has recibido transfusiones sanguíneas?                      Sí                      No

viii. Antecedentes de muertes inusuales en perros y gatos producidas por chinches.                      Sí                      No

### 3. Datos Clínicos

i. ¿Has presentado estos signos o síntomas?

Fiebre	Si	No
Temperatura	Si	No
Cefalea	Si	No
Mialgias	Si	No
Artralgias	Si	No
Dolor recto-ocular	Si	No
Inflamación del párpado	Si	No
Exantema	Si	No
Prurito	Si	No
Hepatomegalia	Si	No
Esplenomegalia	Si	No
Alteraciones cardiacas	Si	No
Nódulos	Si	No
Lesiones de membranas mucosas	Si	No
Ictericia	Si	No

4. Datos gineco-obstétricos:

viii. Número de gestaciones \_\_\_\_\_

ix. Resolución de los embarazos:

Parto \_\_\_\_\_ Cesáreas \_\_\_\_\_ Aborto \_\_\_\_\_  
Óbito \_\_\_\_\_

x. Semanas de gestación por FUR \_\_\_\_\_

xi. Membranas:

Integras	Si	No
RMP	Si	No
Amniorexis	Si	No
Corioamnioitis	Si	No



1. Datos de identificación:

iv. Fecha de nacimiento (dd/mm/aa) \_\_\_\_\_

v. Sexo del producto:            Femenino            Masculino

vi. Edad gestacional del embarazo modificado \_\_\_\_\_

vii. Valoración de Ballard modificado \_\_\_\_\_

viii. Resolución del embarazo:

Parto                      Vivo                      Mortinato

Cesárea                  Vivo                      Mortinato

vi. Valoración del APGAR a 1 minuto \_\_\_\_\_ 5 minutos \_\_\_\_\_

vii. Valoración de Silverman-Andersen \_\_\_\_\_

2. Somatometría

i. Peso al nacer (g) \_\_\_\_\_

ii. Talla al nacimiento (cm) \_\_\_\_\_

iii. Perímetro cefálico (cm) \_\_\_\_\_

iv. Alteraciones en hígado \_\_\_\_\_

v. Alteraciones en corazón \_\_\_\_\_

vi. Alteraciones digestivas \_\_\_\_\_

vii. Alteraciones neurológicas \_\_\_\_\_

viii. Anasarca \_\_\_\_\_

ix. Petequias \_\_\_\_\_

x. Síndrome de dificultad respiratoria (SDR) \_\_\_\_\_

## Apéndice III

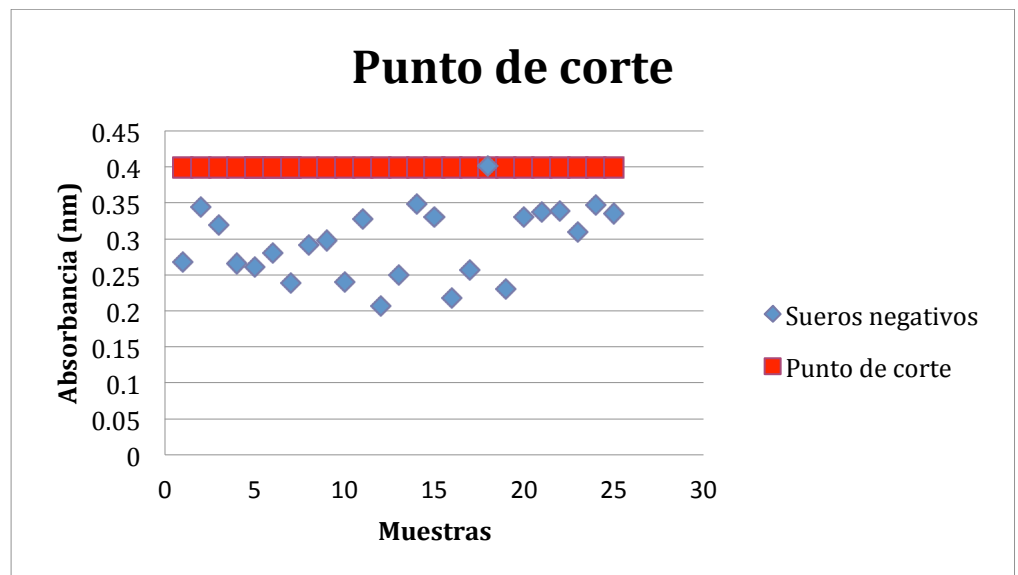
### Punto de corte

El punto de corte se determinó para la prueba de ELISA con Antígeno total con el promedio de 25 muestras de sueros de pacientes negativos para la enfermedad de Chagas más 2 Desviaciones estándar.

$$\text{Punto de corte: } (\bar{\chi} + 2DS) = (0.295 + 0.098) = 0.393$$

Tomando así como positivo cualquier valor por arriba de 0.393 y negativo cualquier valor por debajo de 0.393.

Muestras	Abs
1	0.268
2	0.344
3	0.319
4	0.266
5	0.261
6	0.28
7	0.238
8	0.292
9	0.298
10	0.24
11	0.328
12	0.206
13	0.25
14	0.349
15	0.33
16	0.218
17	0.257
18	0.390
19	0.23
20	0.331
21	0.337
22	0.339
23	0.309
24	0.348
25	0.335



Promedio 0.295  
Desvest 0.049

## Apéndice IV

### Medio LIT

Liver infusión	1.75g
Triptosa	2.5g
NaCl	2.0g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.0g
Glucosa (Dextrosa)	1.0g
H <sub>2</sub> O	500mL

Después de pesar cada reactivo para el medio se disuelven en agua y se filtran con papel whatman, posteriormente se ajusta el pH a 7.2 con NaOH o HCl 1N. Se esteriliza y se complementa el medio con suero bovino inactivado y antibiótico (Estreptomina 0.2mL y Penicilina 0.2mL).

### Preparación de antígeno

1. Cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* fueron cosechados en tubos falcón por centrifugación a 4000rpm por 10min a 4°C.
2. Después de lavar con PBS 1x pH 7.2, se agrego al botón celular 1mL de solución de lisis de proteínas con inhibidores de proteasas.
3. Las células fueron agitadas por 5min e incubadas en hielo durante 30min para favorecer el rompimiento celular.
4. El lisado celular fue centrifugado a 4000 rpm por 10min a 4°C y se leyó la concentración de proteínas en un espectrofotómetro a 280nm.

## Apéndice V

### EXTRACCIÓN DE DNA

- 1) En un tubo eppendorf de 1.5 mL se agregaron 900  $\mu$ L de Solución de lisis de células y 300  $\mu$ L de sangre total, invirtiendo 6 veces para obtener una mezcla homogénea.
- 2) Se incubó por 10 min a temperatura ambiente mezclando el tubo de 2 a 3 veces para lisar los glóbulos rojos de la sangre. La centrifugación se realizó a 13000 rpm por 20 segundos a temperatura ambiente.
- 3) El sobrenadante se descartó para obtener el botón de glóbulos blancos, los cuales se resuspendieron mezclando vigorosamente.
- 4) La lisis de los glóbulos blancos se realizó con 300  $\mu$ L de solución de lisis mezclando por pipeteo hasta formar una solución viscosa e incubando a 37°C por 1 hr.
- 5) Se eliminó el RNA con 1.5  $\mu$ L de RNAsa a 37°C por 15 min.
- 6) Las proteínas se eliminaron de la muestra con 167  $\mu$ L de solución de precipitación de proteínas y mezclando vigorosamente en vortex durante 20 segundos, la mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente.
- 7) El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo en donde se precipitó el DNA con 300  $\mu$ L de isopropanol a temperatura ambiente.
- 8) El DNA se hizo visible después de centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto. El DNA fue lavado con un volumen de etanol al 70% y una centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto, para obtener el botón de DNA .
- 9) El DNA se secó al vacío y se resuspendió en 100  $\mu$ L de solución de rehidratación a 4°C toda la noche.

## Apéndice VI

### ACCUTRAK CHAGAS RECOMBINANTE MICROELISA TEST

Immunoensayo enzimático de tercera generación para la determinación de anticuerpos específicos contra el *Trypanosoma cruzi* en suero o plasma humano.

Esquema del procedimiento de ensayo:

Posición	Controles / Muestra
A1 +B1	Control Negativo
C1	Control Positivo
D1...H12	Muestras

Reactivos	Controles	Muestras
Diluyente de Muestras	200 µL	200 µL
Controles	10 µL	-
Muestras	-	10 µL
Se homogeneizó por 10 segundos e incubó durante 30 minutos a 37°C.		
El Lavado se realizó 6 veces con Solución para Lavado diluida.		
Se preparó el Conjugado 10X diluyendo 1 mL de diluyente conjugado en 9 mL de conjugado 10X.		

Conjugado Diluido	100 µL	100 µL
Se homogeneizó por 10 segundos e incubó durante 30 minutos a 37°C.		
El lavado se realizó 6 veces con Solución para Lavado diluida.		
El Sustrato/Cromógeno se preparó con 5 mL de sustrato y 5 mL de cromógeno.		
Sustrato/Cromógeno	100 µL	100 µL
Se homogeneizó por 10 segundos e incubó durante 30 minutos a 37°C y oscuridad.		
Solución de paro	100 µL	100 µL
Se homogeneizó por 10 segundos.		
Los resultados se obtuvieron al leer espectrofotométricamente a 450 nm contra blanco de aire dentro de los 30 minutos de agregada la Solución.		

### CÁLCULO DE RESULTADOS

La presencia o ausencia presumible de anticuerpo contra *Trypanosoma cruzi*, debe ser analizada teniendo en cuenta el Valor del corte.

Calcule el valor promedio de DO (densidad óptica) del Control Negativo, verifique la validez del ensayo como se describió y aplique la fórmula siguiente:

Valor de corte = DO promedio del Control Negativo + 0.100

Muestras con un valor de DO 450 nm dentro del valor del corte  $\pm 10\%$  se considerarían en zona gris. Las muestras con un valor de DO 450 nm por debajo del límite inferior de la zona gris se considerarían no reactivas para anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

Muestras con un valor de DO 450nm mas alto que el limite superior de la zona gris se considerarían reactivas para anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*.

## RESULTADOS

Toda muestra que ha sido reactiva y las correspondientes a la zona gris en una primera prueba deberían ser ensayadas nuevamente para su confirmación. Si el resultado es negativo en el segundo ensayo, la muestra se consideraría no reactiva.

## **APENDICE VII**

### **Equipo**

- Incubadora Queque Cell Culture Incubator
- Centrifuga refrigerada Sorvall Biofuge primor
- Centrifuga al vacío Savant DNA 110, Speed Vac.
- Vortex Genie 2
- EPOCH
- Termociclador Techne, TC-412
- Transiluminador UVP mini Darkroom GDS-80000 System
- Fuente de poder, Thermo EC 105
- Agitador DAIGGER, Rocker, 41
- Cámara de electroforesis Class II, Continental Lab Products, Inc.

### **Material de vidrio**

- Matraz aforado 50, 500, 1000 mL
- Vaso de precipitado 50, 100, 250, 500 mL
- Probeta graduada 10, 100, 1000 mL
- Cámara de Neubauer
- Matraz 250 mL
- Embudo de filtración rápida
- Pipetas volumétricas 1,5,10 mL

### **Material diverso**

- Tubos Falcon 50 mL
- Tubos Eppendorf 0.2, 0.5,1.5 mL
- Pipetas Labsystems 10, 40, 200, 1000  $\mu$ L
- Puntas amarillas RT20 Rainin Instrument
- Puntas azules Rainin Instrument
- Placas de poliestireno Corning, costar 3590 de 96 pozos

### **Reactivos**

Se encuentran en el Apéndice I

## Enzimas

- Taq DNA polimerasa (Promega, Cat. No. M1665)
- Aprotinina SIGMA Cat. No. A6279
- Pepstatina SIGMA Cat. No. P5318
- Leupeptina SIGMA Cat. No. L2884
- Proteinasa K SIGMA Cat. No. P2308
- RNAsa SIGMA Cat. No. R7003

## Oligonucleótidos

Sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM No. 715 Lote 013012

- Tcz1 5' CGAGCTCTTGCCCCACACGGGTGCT 3'  
Concentración: 600 pmol/μL Tm: 73.7°C
- Tcz2 5' CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG 3'  
Concentración: 1118 pmol/μL Tm: 70.9°C

## Estuches Comerciales

- Chagas Stat-Pak CHEMBIO DIAGNOSTIC SYSTEMS, INC. (Cat. No. CG101RES-20 TESTS)
- PCR Master Mix. (Promega, Cat. No. M7502)

## Cultivo de parásitos

Las cepas utilizadas para realizar el antígeno fueron de estados diferentes:  
(Laboratorio de Investigación en Parasitología H.I.M.F.G.)

Nombre	Procedencia	Origen
Cocula	Oaxaca	Humano
Cid	Oaxaca	Humano
Campeche	Campeche	Humano
CL-Brenner	Brasil	Humano
Miguz	Morelos	Triatomino
Petaquillas	Guerrero	Humano
Ninoa	Oaxaca	Humano



