

UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE PUEBLA

DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA
GENERACIÓN 1999-2000

PROYECTO

TÍTULO

DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE
ANTICUERPOS CONTRA *Trypanosoma cruzi* EN
PERSONAS EN EDAD PRODUCTIVA Y LOS FACTORES
BIÓTICOS Y ABIÓTICOS QUE LA DETERMINAN EN EL
MUNICIPIO DE PALMAR DE BRAVO, PUEBLA EN EL AÑO
2000.

PRESENTA PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA
EN SALUD PÚBLICA:

Q.F.B. FRANCISCA SOSA JURADO

ASESORES:

D.C. REYES LÓPEZ PEDRO ANTONIO
D.C. MONTEON PADILLA VICTOR MANUEL

NOVIEMBRE DEL 2001



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

1. Antecedentes generales.....	1
1.1. Antecedentes específicos.....	1
1.2 Antecedentes específicos.....	5
2. Municipio de Palmar de Bravo.....	15
3. Planteamiento del problema.....	21
4. Objetivos.....	22
5. Metodología.....	23
5.1 Diseño de estudio.....	23
5.2 Ubicación espacio temporal.....	23
5.3 Marco muestral.....	24
5.4 Caracterización de las variables.....	26
5.5 Técnicas y procedimientos.....	26
5.5.1 Encuesta clínico epidemiológica.....	26
5.5.2 Técnicas para la determinación de Ac contra <i>T. cruzi</i>	27
5.5.3 Técnicas para la demostración del parásito.....	35
5.6 Diagrama de trabajo.....	38
5.7 Cronograma de trabajo.....	40
6. Logística.....	41
6.1 Recursos humanos.....	41
6.2 Recursos materiales.....	41
6.3 Recursos financieros.....	41
7. Resultados.....	43
7.1 De la encuesta clínico epidemiológica.....	43
7.2 De la determinación de Ac contra <i>T. cruzi</i> en humanos.....	54
7.3 De los hemocultivos.....	58
7.4 De la determinación del ADN en hemocultivos empleando el método PCR.....	58
7.5 De los electrocardiogramas.....	61
7.6 De la identificación y clasificación de los <i>Triatomino</i> s.....	62
7.7 De la determinación de Ac contra <i>T. cruzi</i> en <i>Canis familiaris</i>	65
7.8 De la determinación de Ac contra <i>T. cruzi</i> en equinos.....	66
7.9 De la determinación de Ac contra <i>T. cruzi</i> en porcinos.....	66
7.10 De la determinación de Ac contra <i>T. cruzi</i> en animales silvestres.....	66

7.11 De la relación de factores bióticos y abióticos y la prevalencia.....	66
8. Discusión.....	72
9. Conclusión.....	79
10. Aportaciones.....	80
11. Anexos.....	81
Anexo 1 Definiciones operacionales.....	81
Anexo 2 Características de las variables.....	82
Anexo 3 Consideraciones éticas.....	84
Anexo 4 Formato de encuesta clínico-epidemiológica.....	85
Anexo 5 Pruebas estadísticas empleadas en el estudio.....	86
Anexo 6 Preparación de reactivos.....	88
12. Bibliografía.....	92

1. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 GENERALIDADES DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Enfermedad causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, transmitido entre animales y humanos por *triatominos* que, al momento de alimentarse de sangre, expulsan *trypanosomas* en sus deyecciones, que penetran a través de la herida causada por la picadura, por el rascado, otras abrasiones de la piel o de las mucosas y que afectan diversos órganos, principalmente corazón, esófago y colon. (1)

1.1.2 VIAS DE TRANSMISIÓN DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1.2.1 Transmisión por vectores:

El mecanismo de transmisión más importante en el humano y otros mamíferos es vectorial; los vectores son insectos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatomidae*. De 118 especies de triatominos conocidos, sólo algunos son epidemiológicamente significativos como vectores de *Trypanosoma cruzi*; algunas especies colonizan las viviendas de los humanos en el medio rural, otras son estrictamente silvestres. (2)

Otras especies silvestres que viven en su hábitat natural, pero que eventualmente invaden los espacios domésticos y pueden transmitir el parásito al hombre y a los animales domésticos. (3)

Las especies de triatominos domiciliarias son las responsables del 80% de los casos de enfermedad de Chagas en humanos en las áreas endémicas (4)

1.1.2.2 Infección adquirida por transfusión sanguínea y trasplante de órganos parasitados.

Por transfusión sanguínea es el segundo mecanismo importante después del vectorial en la transmisión de *Trypanosoma cruzi* en algunas regiones endémicas. La migración humana de las áreas endémicas a cientos de áreas urbanas aumenta el riesgo de la transmisión de la infección chagásica. (5)

Se estima que va en aumento la transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea debido a que en muchos países entre ellos México, no se realizan pruebas serológicas en donadores para detectar anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en forma obligatoria. (6)

1.1.2.3 Transmisión congénita.

La patogenia de esta forma de transmisión es inespecífica y controvertida, habitualmente la transmisión por esta vía no sólo ocurre en embarazadas con abundantes parásitos en sangre periférica, ya que se ha observado en madres con escasa parasitemia. (7)

También la infección transplacentaria puede ocurrir durante alguna de las etapas del embarazo, causando productos de bajo peso, o bien causar muerte fetal. (8)

Además, se ha observado que niños cuyas madres son positivas a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, tienen de 3 a 9 veces más riesgo de ser positivos, que aquellos niños que están en riesgo constante por la presencia de los *Triatomino*s en sus casas (9)

1.1.2.4 Transmisión por manipulación de animales infectados.

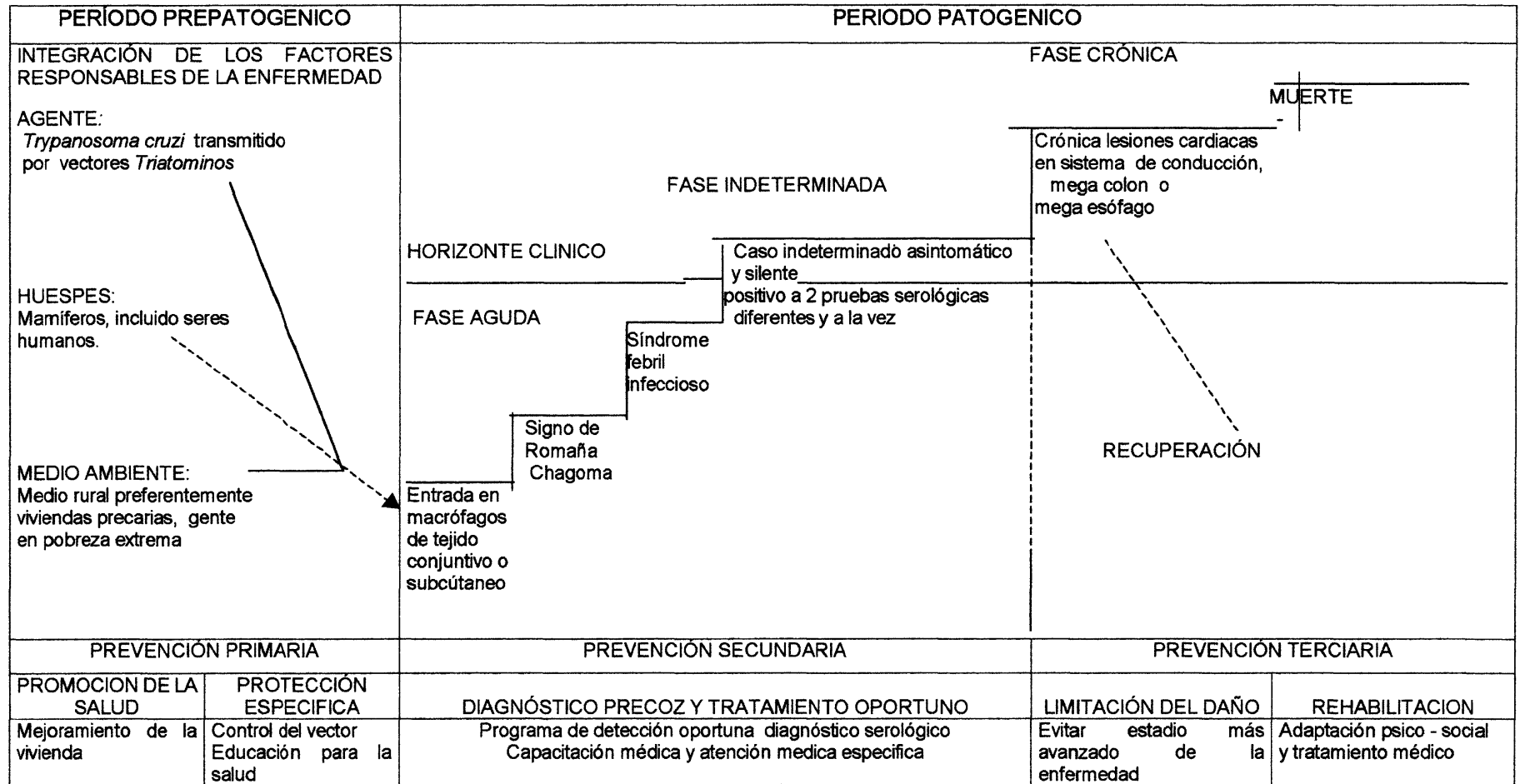
Las personas pueden infectarse con el parásito, cuando las heces o la orina de los mamíferos infectados entran en contacto con las mucosas o la piel de quienes los manipulan, así ocurre en ciertas regiones rurales al desollar animales silvestres y también por la ingestión de carne semicruda de animales parasitados. (1,4)

1.1.3. HISTORIA NATURAL DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas o Trypanosomosis americana es una afección parasitaria hística y hemática producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* hematófilo que se anida y se reproduce en los tejidos. La infección es transmitida por insectos hemípteros hematófagos por medio de las deyecciones contaminadas del parásito al picar a animales domésticos, peridomesticos, salvajes y el humano. (2)

La infección en el humano se produce por la penetración de los tripomastigotes metacíclicos en los macrófagos del tejido conjuntivo de la dermis o en los tejidos subcutáneos, donde se transforman en amastigotes intracelular, sin flagelo o membrana se multiplican por fisión binaria durante 4 a 5 días, desintegran a la célula invadida e infectan otros macrófagos. Algunos parásitos del foco primario llegan al torrente sanguíneo, se transforman en tripomastigotes, la forma flagelada provista de membrana, se diseminan por el organismo invadiendo células de diferentes vísceras,

Figura 1
HISTORIA NATURAL DE LA TRYPASOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS



en cada localización se producen complejos de destrucción, reacción inflamatoria que prolongan la enfermedad. (10) El período de incubación de la enfermedad de Chagas es de una a dos semanas, después hay inflamación en el sitio de entrada del parásito. El cuadro clínico de la enfermedad de Chagas cursa con distintas etapas: Una fase aguda caracterizada por el síndrome febril infeccioso, seguido por una fase indeterminada asintomática y silente que puede durar hasta 30 años, para finalizar en una etapa crónica con lesiones manifiestas e irreversibles sobre todo con lesiónes cardíacas. (10) (Figura 1)

1.1.4. METODOS PARA DIAGNOSTICO DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS.

1.1.4.1. Búsqueda del parásito completo.

- a) Inmediata: Gota gruesa, microhematocrito, método de Strout, método de Dean y Kirchner, método de silicona. (11)
- b) Tardía: Xenodiagnóstico, hemocultivo, inoculación de animales sensibles para estudio en laboratorio. (11)

1.1.4.2. Mediante la identificación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*

- a) Serología: Fijación de complemento (Machado-Guerreiro), hemaglutinación directa, hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia (IFI), inmunoenzimático (ELISA). (11,12) enzimoimmunotransferencia (Western Blot). (13)

1.1.4.3. Hallazgos de fracciones del parásito

- a) Por búsqueda de antígenos libres en sangre (antigenemia), en orina (antigenuria) o antígenos unidos a anticuerpos (complejo inmune específico). (12)
- b) Por determinación del ADN del parásito: amplificación de la región hipervariable por el método de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR). (14-17)

1.1.5 IMPORTANCIA DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS

Los vectores de la enfermedad de Chagas se encuentran en América Continental desde la latitud 43° norte a la latitud 46° sur. Cubre así un área que va de San Francisco California en Estados Unidos a Basiloche y Santa Cruz en Argentina; sin embargo, la eficiencia vectorial es cambiante y en el norte de México y los Estados Unidos la enfermedad es rara, pero por debajo del Trópico de Cáncer y en Centro y Sudamérica hay 90 millones de personas expuestas a la transmisión

vectorial y unos 18 millones de personas ya infectadas (chagásico indeterminado), entre el 10 y 30% desarrollarán enfermedad crónica con lesiones progresivas en vísceras huecas (enfermedad mega) o en el corazón, con invalidez cardiaca. (3,4)

Una buena parte de los infectados crónicos no enferman, este 70 a 90% llamado chagásico indeterminado, pueden tener parásitos tisulares de por vida y episodios de parasitemia autolimitada y asintomática. Si donan sangre o tejidos es posible la infección iatrogénica cuya magnitud es desconocida. Además los casos indeterminados de trypanosomosis americana son los responsable de la urbanización de la enfermedad de Chagas en donde no existen vectores, a través de la migración dentro de la República Mexicana e internacionalmente hacia Estados Unidos y Canadá. (4)

Desde el punto de vista de la Salud Pública la importancia de la trypanosomosis americana esta relacionada con el llamado ciclo doméstico, no sólo porque millones de seres humanos en América Latina y México están expuestos al riesgo de adquirirla, ya que en el ciclo doméstico están implicadas 6 vías de transmisión del parásito; también porque todas las medidas preventivas son solamente contra este ciclo. (4) (Figura 2)

Actualmente se desconoce en algunos estados de la República Mexicana la distribución geográfica de los vectores entre ellos se encuentra el estado de Puebla y en forma precisa a nivel Nacional la prevalencia de personas positivas a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, ya que la cobertura de la Encuesta Nacional de Seroepidemiologica (ENSE) realizada en 1988 no fue óptima en este aspecto, ya que la trypanosomosis americana esta más distribuida en las áreas rurales. (18)

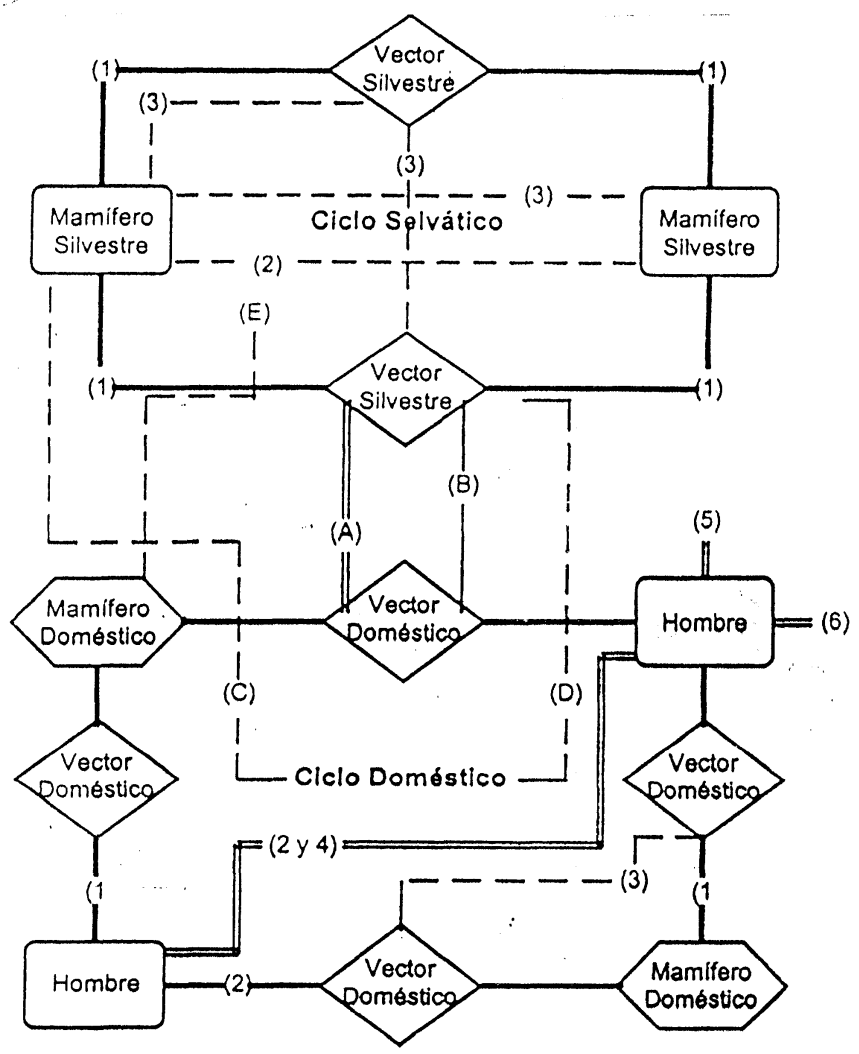
1.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Al parásito *Trypanosoma cruzi* se le ha detectado en reservorios humanos y animales domésticos, desde la latitud 42° norte hasta la latitud 46° sur del Continente Americano, pero la distribución de los vectores (*Triatomino*s) y de los reservorios silvestres es mucho más amplia que la de la enfermedad en humanos.

La infestación de las viviendas por los vectores pone en riesgo de adquirir la infección a un mínimo de 90 millones de personas en estas latitudes. En las ciudades consideradas endémicas, se ha estimado que de 16 a 18 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi*, excluyendo a países como México y Nicaragua de donde no hay disponibilidad de datos adecuados. (3,4)

Figura 2
Cadena epidemiológica de la enfermedad de Chagas



- A. domiciliación de los vectores silvestres
 - B. invasión de hábitat silvestre por vectores domésticos (poco frecuente)
 - C. invasión del ciclo doméstico por mamíferos sinantrópicos infectados
 - D. invasión ocasional del espacio doméstico por vectores silvestres
 - E. invasión ocasional del espacio silvestre por animales domésticos
-
- 1. transmisión vectorial
 - 2. transmisión congénita
 - 3. transmisión oral entre vector-vector, mamífero-mamífero y mamífero-vector
 - 4. transmisión por transplante de tejidos y transfusión sanguínea
 - 5. transmisión oral por alimentos contaminados o por leche materna
 - 6. transmisión accidental en el laboratorio

Fuente: Tomado de Pinto Dias ISBT-Brazil1992

La enfermedad de Chagas no es un problema que se da aisladamente entre las poblaciones humanas de América Latina principalmente en el medio rurales, en las áreas endémicas esta estrechamente asociada con las típicas enfermedades llamadas sociales, como la desnutrición, enfermedades infecciosas intestinales, tuberculosis o de enfermedades parasitarias que la delimitan y por el contexto general en el que ocurre; por lo que esta considerada como una enfermedad del medio rural, sólo que ahora una nueva tendencia esta modificando su espectro en todo el Continente y son los profundos cambios socioeconómicos que en las últimas cuatro décadas ha hecho que se incremente la migración de personas de las zonas rurales endémicas a las zonas urbanas. (3,4)

Por la gran importancia en Salud Pública de la trypanosomosis americana en Colombia, los estudios sobre los vectores son numerosos y tienen la información de casi 130 categorías taxonómicas, especies y subespecies, de alrededor de 20 especies de *Triatomino*s y 26 de *Lutzomyias* .(19)

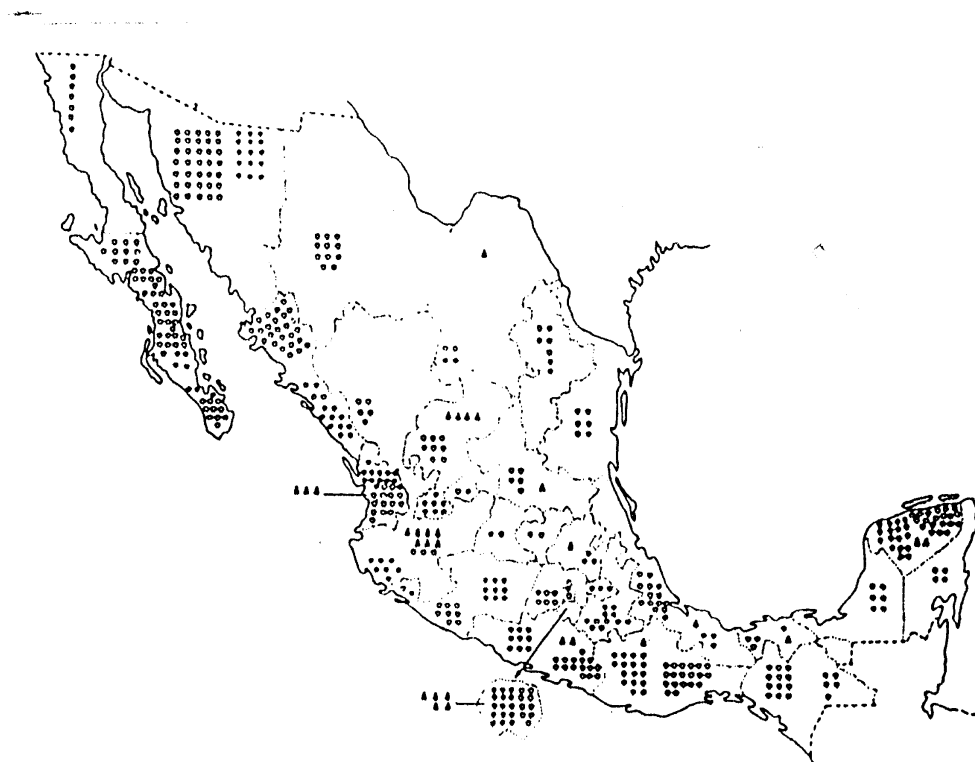
En México los *Triatomino*s que se han encontrado infectados con *T. cruzi* han sido localizado en regiones que se encuentran ubicadas en altitudes que van de 0 a 2,000 metros sobre el nivel del mar, lo que hace suponer que el área endémica de la infección por *T. cruzi* en humanos y reservorios en México debe ser amplia ya que casi dos terceras partes del territorio Nacional están dentro de este rango, (20) y el principal vector en México es *T. barberi* . (21)

Con respecto a los estudios de *Triatomino*s que se han llevado a cabo en México destacan las colectas de *Triatomino*s realizadas principalmente por Mazzotti en 1936; Aguirre en 1947; Tay y col en 1961, 1967, 1969, 1980, 1992; Biagi y col, 1964; Zavala y col en 1974; Galavez y Arredondo en 1992. (22)

En un estudio efectuado en el año de 1995 en 13 Estados se detectaron 27 nuevas localidades con *triatomino*s infectados y correspondieron a *T. dimidiata*, *T. barberi*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. phyllosoma mazzotti* y *T. gerstaeckeri*; en este último estudio no fue incluido el Estado de Puebla. (22)

El Estado donde se tiene el conocimiento más amplio sobre la distribución de los *Triatomino*s es Jalisco, en un estudio se capturaron y clasificaron 8 especies de *Triatomino*s que correspondieron a las especies de *T. barbarie*, *T. brailovskyi*, *T. dimidiata*, *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* y *T. picturata*, la mayoría de los municipios estudiados fueron lugares nuevos de ubicación de las especies de *Triatomino*s en este estado, la especie más distribuida y más parasitada en los 51 municipios estudiados fue *T. longipennis* y solo en 27 de los municipio estudiados fueron encontrados *Triatomino*s infectados con *T. cruzi*. (23)

Figura 3
Colectas de *Triatomino*s efectuadas en la República mexicana, se observa las efectuadas en el Estado de Puebla hasta 1995.



En el estado de Puebla la presencia de estos vectores ha sido estudiada más ampliamente por Tay y col. en el sur del estado. (22) (Figura 3)

Aun así, falta conocer más sobre su distribución en el resto del estado; en 1998 fueron capturados ejemplares de *T. barberi* infectados con *Trypanosoma cruzi*, en la localidad de San Andrés Mimihuapan en el Municipio de Molcaxac, que se localiza en el centro del estado y esta a una altitud de 1,850 metros sobre el nivel del mar (24)

Con respecto a las especies de animales que sirven de reservorios en diferentes situaciones ecológicas, entre los animales domésticos, el perro y el gato son reservorios comunes e importantes del parásito ya que conviven con las personas. En diversas ocasiones se ha comprobado que la prevalencia de infección chagásica en estas especies en las áreas endémicas es superior a la del hombre. (4)

En varias localidades de países como Brasil y Argentina, mediante xenodiagnóstico se encontraron tasas de infección de más del 20% en perros y gatos, siendo la tasa más alta en los gatos y se podría explicar por las grandes poblaciones de ratones domésticos infectados adquiriendo la infección por vía oral al cazar y alimentarse de estos roedores. (25)

Además, en Argentina se han confirmado una alta prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en perros, empleando la técnica de ELISA. (26)

Otros animales domésticos también pueden actuar como reservorios, en un estudio serológico empleando la técnica HAI, en 34 localidades rurales de Chile se detectaron anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el 7.8% de 2,232 caprinos, 1.7% de 145 conejos y 4,8% de 120 ovinos. (2,4)

En México ha sido confirmado que los roedores entre ellos las ratas y ratones, juegan un papel importante en la persistencia de la infección por *Trypanosoma cruzi*, por lo que pueden ser reservorios importantes debido a su abundancia. (27)

1.2.2 SEROEPIDEMIOLOGIA DE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS.

El método serológico sólo indica la presencia de sustancias en la sangre capaces de reaccionar con el parásito o sus componentes tales como los anticuerpos provocados por la infección, es importante tomar dos aspectos fundamentales, el primero es, el grado de certeza de que una reacción positiva signifique realmente la presencia de anticuerpos específicos contra *Trypanosoma cruzi* y el segundo es, sí esa presencia debe constituir un criterio suficiente para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, puesto que un resultado positivo ocasiona que los pacientes experimenten serios problemas emocionales, a los que se asocia la idea de enfermedad incurable, invalidez, riesgo de muerte repentina y que condiciona actitudes especiales, tanto por parte del enfermo como de los que lo rodean, ya que la pérdida de productividad origina que sean excluidos incluso del su trabajo, por lo que el grupo de estudios de serología de la enfermedad de Chagas patrocinado por la OPS, recomendó para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas se utilice más de un procedimiento serológico para evitar error en el diagnóstico. (28)

El dato fundamental en el diagnóstico de la trypanosomosis americana, en su fase crónica, es el estudio serológico, ya que es difícil la demostración del parásito en circulación o en los tejidos. Por lo que en México la confirmación de caso se establece únicamente con dos pruebas serológicas diferentes positivas y a la vez, ya se han establecido los criterios para la clasificación de casos y para el tratamiento de la trypanosomosis americana. (1) (Cuadro 1)

Una seria limitación en el diagnóstico serológico se relaciona con la estandarización de las diferentes técnicas accesibles, y esto depende considerablemente de la calidad de los antígenos usados para el inmunodiagnóstico. Los laboratorios del InDRE e Instituto Nacional de Cardiología en 1994, compararon sus técnicas de inmunodiagnóstico: IFI, HAI y ensayo inmunoenzimático en fase sólida ELISA, con cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en México. La concordancia interlaboratorios fue de 0.8 (Índice Kappa) y la sensibilidad, especificidad y valor predictivo

positivo y negativo de las pruebas, aseguran resultados confiables en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. (29)

Cuadro 1
Criterios para la clasificación de casos y tratamiento en Trypanosomosis americana

Parásitos Cualquier método	Serología 2 pruebas	Sintomatología	Criterio Diagnóstico de caso	Tratamiento	
				Específico	Sintomático
+	+	+	Agudo	*	
+	-	+	Agudo	*	
-	+	+	Agudo	*	
+	+	-	Indeterminado	*	
-	+	-	Indeterminado	* <12 años	
-	+	+	Crónico	* < 15 años	*
-	-	+	No caso		

La transmisión sanguínea es un mecanismo artificial que depende sobre todo de la situación social, epidemiológica y más directamente esta conectada con la calidad de los Sistema de Servicios de Salud en las áreas endémicas. (4)

El primer estudio para determinar anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de bancos de sangre, se realizó en el año de 1978 en el estado de Oaxaca, se estudió a 278 donadores mercenarios, empleando las técnicas de HAI, HAD y la reacción de fijación de complemento de Guerreiro y Machado, se obtuvo una prevalencia del 4.4%. En 1984 llamo la atención los estudios de Bayona en Puebla realizados en el HU UAP, que informó un 16.5% de seropositivos. (30)

En la última década los estudios realizados en México sobre los riesgo de la transmisión de *Trypanosoma. cruzi* por transfusión sanguínea y los cuales hasta la fecha han sido publicados son los siguientes: (Cuadro 2)

En el INC en México D.F. empleando técnicas de ELISA y Western Blot se reportó una prevalencia de 0.28% en 1,076 donadores. (30)

De 1991 a 1992 se estudiaron 3,419 muestras al azar de donadores de 12 localidades rurales y 8 hospitales urbanos del IMSS en el estado de Jalisco, utilizando la técnica de HAI se obtuvo una prevalencia del 1.28%. (31)

De 1992 a 1993 se estudiaron 215 donadores en un banco de sangre de la SSA de Mérida, Yucatán utilizando la técnica de IFI, se obtuvo una prevalencia del 5.6%, todos fueron del sexo masculino y el riesgo de transmisión por transfusión sanguínea se calculo empleando la formula de Cerisola y este fluctuó entre 5.6% y 68.3% dependiendo del número de transfusiones. (32)

En 1993 se colectaron 318 muestras de donadores en el banco de sangre del Hospital Regional de Cuernavaca Morelos, se utilizo la prueba de ELISA (Hemagen Chagas' Kit, Waltham, MA, USA) se reportó una prevalencia del 17%, donde la prevalencia en donadores femeninos fue del 58.8% y en donadores masculinos fue del 11.9%. (33)

Cuadro 2
Seroepidemiología de la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de Bancos de Sangre

Banco de sangre	Año	Tamaño de muestra donadores	Pruebas serológicas	Tipo de antígeno empleado	Prevalencia %
Banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología, México .	1992	1,076	ELISA WB	Extracto crudo soluble de parásitos, de la cepa NINOA	0.28
Bancos de sangre hospitales rurales y urbanos IMSS Estado de Jalisco	1993	3,419	HAI	Cepa Argentina del Instituto Mario Fatała Chaben	1.28
Banco de Sangre de la SSA de Mérida, Yucatán	1993	215	IFI	Parásitos epimastigotes en medio de LIT	5.6
Hospital General SSA de Cuernavaca, Morelos	1993	318	ELISA	Comercial Whalthan M.A. USA.	17.0
Centinela Nacional en bancos de sangre SSA en 19 estados	1994-1996	64,969	HAI	Extracto crudo soluble de parásitos, de 15 cepas de aislados mexicanos (de seres humanos y vectores)	1.5
Banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología, México D.F.	1998	3,300	ELISA IFI WB	Extracto crudo soluble de parásitos y epimastigotes de la cepa NINOA	0.3

A nivel Nacional de 1994 a 1996 se realizó una encuesta centinela de 18 bancos de sangre de la Secretaria de Salud (19 Estados), se estudiaron las muestras de 64,969 candidatos a donador, utilizando la técnica de HAI, se obtuvo una prevalencia del 1.5%. (6)

En 1998 en el banco de sangre del INC en la Ciudad de México se estudiaron 3,300 muestras de donadores, utilizando como prueba tamiz ELISA, se reportó una prevalencia del 0.3% y se observó que los donadores seropositivos eran originarios de otros Estados del País

Además, se detectó el ADN del parásito en la fracción de células rojas y plaquetas de las unidades de sangre de estos donadores seropositivos. (34)

Con respecto a estudios en población, para México Scholfield en 1985 calculó 3,800,000 de infectados, casi un millón más que lo calculado por Velasco Castrejón. (7)

Se han realizado pequeñas encuesta seroepidemiológicas, pero mencionaremos las de los últimos quince años: (Cuadro 3)

En las comunidades del Estado de Oaxaca en las cuales se ha reportado seroprevalencia a *T. cruzi* se encuentran San Juan Chilateca con un 7.8% empleando técnica de HAI-BOYDEN y antígeno de CDC de Atlanta Georgia. En Tlacoahuaya de Morelos, Santo Domingo de Tomaltepec con un 6.40% y 21.1% respectivamente, empleando la técnica de HAI y en Miahuatlán de Porfirio Díaz, empleando la misma técnica fue del 2.25%.⁽³⁵⁾

En San Agustín Loxicha Oaxaca por medio de las técnicas de IFI y ELISA se detectó una seroprevalencia del 29%, de ellos el 73% presentaron anomalías en el ECG, la más común fue el bloqueo incompleto de la rama derecha de Haz de His. ⁽³⁶⁾

En Santiago Yosotiche Oaxacas empleando la técnica de HAI, reportó una seroprevalencia del 25%. ⁽³⁷⁾

La Encuesta Nacional de Seroepidemiología (ENSE) realizada en 1987, para la investigación de la trypanosomosis americana de cómo estaba distribuida en el país, solamente permitió ratificar los focos de transmisión ya conocidos en los estados de Oaxaca, Chiapas y San Luis Potosí e identificar algunos nuevos en los estados de Hidalgo, Chiapas y Veracruz. Al parecer la cobertura de la ENSE no fue óptima, ya que la trypanosomosis americana es más de las áreas rurales, por lo que se obtuvo una seroprevalencia Nacional empleando la técnica de HAI tamiz 1:8 del 1.6%, con HAI 1:32 fue del 0.5% y con HAI 1:8 e IFI 1:32 fue del 0.2%. ⁽¹⁸⁾

En Santo Domingo Tomaltepec y Tlacoahuaya Morelos en un grupo de 50 jóvenes, se reportó una prevalencia del 14% empleando la técnica de HAI; diez presentaron alteraciones electrocardiográficas, como bloqueos incompletos de la rama derecha de Haz de His y 7 de ellos fueron seropositivos al parásito. ⁽³⁸⁾

La encuesta realizada en 1988, por la Universidad de Guadalajara para medir la prevalencia de anticuerpos en el suero de una muestra de población de 13,274 habitantes en 124 Municipios del estado, se reportó una prevalencia del 17.4%, empleando la técnica de HAI. ⁽³⁹⁾

En 4 localidades del municipio de General Terán, Nuevo León empleando la técnica de HAI se reportó una prevalencia del 12.55%. ⁽⁴⁰⁾

En la población de Amoxochitl, Zacatecas se realizó un estudio seroepidemiológico usando las técnicas de HAI e IFI o por ELISA se reportó una prevalencia del 12.2% entre las dos primeras técnicas y de un 6.06% por ELISA y en la comunidad de Francisco I. Madero, Zacatecas empleando HAI e IFI se reportó una prevalencia del 7.89% y por ELISA 2.63%. ⁽⁴¹⁾

En Palma Arriba Veracruz, empleando la técnica de IFI se reportó una prevalencia del 19.5%. ⁽⁴²⁾

En el Estado de Puebla, en la localidad de San Andrés Mimiahuan en el Municipio de Molcaxac se realizó un estudio seroepidemiológico empleando tres técnicas inmunológicas HAI, IFI y ELISA.

empleando antígeno autóctono y comercial para la detección de individuos positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, se obtuvo una seroprevalencia del 7.5% con el antígeno comercial y del 10% con el antígeno autóctono. (24)

Cuadro 3
Seroepidemiología de la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en grupos de población efectuadas en comunidades de la República mexicana

Localidad Estado	Año	Tamaño de muestra habitantes	Pruebas serológicas	Tipo de antígeno empleado	Prevalencia %
San Juan Chilantenca, Oaxaca	1984	128	HAI de Boyden	Cepas mexicanas DEH-FM-UNAM	7.80
Tlacoahuaya de Morelos, Oaxaca	1984	125			6.40
Santo Domingo de Tomaltepec, Oaxaca	1984	379			21.11
Miahutlán de Porfirio Díaz, Oaxaca	1984	578			2.25
Santiago Yosotiche ,Oaxaca	1985	308	HAI ELISA	Cepas mexicanas DEH-FM-UNAM	25.00
Encuesta Nacional seroepidemiológica (ENSE) para <i>T. cruzi</i>	1987	66,678	HAI 1:8	Cepas mexicanas	1.6
			HAI 1:32	INDRE	0.5
			HAI 1:8 e IFI 1:32		0.1
ENSE en el Estado de Puebla	1987	2,867	HAI 1:8	Cepas mexicanas	0.3
			HAI 1:32	INDRE	0.0
			HAI 1:8 e IFI 1:32		0.0
124 municipios del Estado de Jalisco	1988	13,274	HAI	Cepa argentina Instituto Mario Fatala Chaben	17.4
Zona endémica Sto Domingo Tomaltepec y Tlacoahuaya, Oaxaca	1989	50	HAI	Cepa Corpus	16.27
		50	HAI	Christis del sur de USA	0.0
4 localidades del Municipio Gral Terán Nuevo León	1990		HAI	Cepas mexicanas INDRE	12.55
Amoxochil, Zacatecas	1990		HAI e IFI ELISA	Cepas mexicanas INDRE	12.2 6.06
Francisco I. Madero, Zacatecas	1990		HAI e IFI ELISA	Cepas mexicanas INDRE	7.89 2.63
Palma Arriba, Veracruz	1990		IFI	Cepas mexicanas INDRE	19.5
Zona endémica San Agustín Loxicha, Oaxaca	1993	104	ELISA e IFI	Cepa Ninoa	29.0
		1,076	ELISA e IFI		0.0
Localidad de San Andrés Mimihuapan en el municipio de Molcaxac, Puebla	1998	280	HAI, IFI y ELISA	Cepa autóctona a partir de (vector)	10.0
			HAI, IFI y ELISA	Cepa comercial	7.5

1.2.3 DISPOSICIONES OFICIALES SOBRE LA TRYPANOSOMOSIS AMERICANA O ENFERMEDAD DE CHAGAS

Con respecto a la legislación sanitaria en México sobre la Trypanosomosis americana se tiene contemplada en la Ley General de Salud, en el Título Octavo, Capítulo I, Artículo 134, Fracción I y VII. (43)

En la Norma Técnica de Emergencia NOM-EM- 001-SSA2-1999, para la vigilancia, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. (1)

La Organización Mundial de la Salud y la Secretaría de Salud de México, han creado programas para el control de la enfermedad de Chagas: (44-47)

- A. Información básica sobre la Trypanosomosis americana.
- B. Del parásito
- C. Los vectores
- D. Reservorios animales
- E. Epidemiología:
- F. Estrategias de prevención y control (resultados del programa y desarrollo del programa)
- G. Desarrollo de recursos humanos
- H. Investigación:

Aun así en México es necesario un apoyo continuo por parte de las autoridades de salud y una vinculación con los académicos para enriquecer el conocimiento de la Trypanosomosis americana en el país, para poder proponer programas eficaces de control y lo más importante asegurar que México no permanezca sólo como un país endémico en el presente siglo. Ya que en el contexto de la globalización, México no estuvo presente en Belice en 1997 en la promoción hecha por los países centroamericanos, cuyas metas primordiales de sus programas fueron evitar la transmisión vectorial y por transfusión sanguínea de la trypanosomosis americana, así como, cuando estos programas fueron evaluados en el mes de Octubre del 2000 en la ciudad de San Salvador. (48)

2. EL MUNICIPIO DE PALMAR DE BRAVO EN EL ESTADO DE PUEBLA.

2.1 Aspectos físicos y geográficos

El Municipio de Palmar de Bravo se localiza en la parte centro-este del Estado de Puebla, sus coordenadas geográficas son paralelos 18° 45' 36" y 18° 55' 06" latitud norte y meridianos 97° 22' 54" y 97° 40' 00" de longitud oeste, extensión 341.8 Km. cuadrados, su altitud entre a 2,180 a 2,500 metros sobre el nivel del mar y tiene un clima semi seco templado y sub húmedo templado, temperatura media de 12 a 18 °C; pertenece a dos regiones morfológicas, la sierra de Soltepec y los llanos de San Andrés; su flora es de matorral desértico rosetófilo, principalmente matorral crascicaulo y bosque de táscate. (Figura 3)

2.2 Demografía

El Municipio esta integrado por 37 localidades, 2 tienen más de 5,000 habitantes, 8 con más de 500, 12 con más de 100 y 16 con menos de 100 habitantes, existe dispersión entre las menos pobladas, con la consecuente dificultad en el otorgamiento de servicios públicos incluyendo los servicios de salud.

Tiene una población calculada en el año 2000 de 36,286 habitantes, la población en edad productiva es de 18,111 y la población del sexo femenino en edad fértil es de 7,855, tiene una media étnica de 17.8 años, es decir la mitad de la población del Municipio es menor de edad ya que su índice de dependencia es de 0.77. Tasa de crecimiento anual del 2.67%, tasa de natalidad del 30.30 por 1,000 habitantes y tasa de fecundidad de 131.69 por 1,000 habitantes.

2.3 Servicios públicos

Las fuentes de abasto de agua potable son pozos y 17 localidades de más de 100 habitantes cuentan con un 70 a 100% de cobertura de agua potable, sólo 4 localidades cuentan con obras de drenaje, la cobertura de alumbrado público y pavimentación en la mayoría de sus zonas urbanas es muy deficiente, cuenta con 2 mercados públicos, 3 panteones y solo jardines en los zócalos de algunas localidades

2.4 Características de construcción y saneamiento de las viviendas particulares

Con respecto a las características de construcción de las viviendas, en el 61.89% los techos están contruidos con materiales ligeros (laminas, teja, palma o madera) y el 38.10% de concreto.

En el 79.49% de las viviendas el material predominante en las paredes es block o ladrillo, pero la mayoría de las paredes al interior de las viviendas están sin algún recubrimiento, el 9.10% son de adobe y el 11.41% de lamina, madera, palma o piedra.

Con respecto al tipo de piso en las viviendas el 42.6% de las viviendas es de tierra y el 57.4% de firme o loseta.

Con respecto al saneamiento de las viviendas particulares la eliminación de excretas el 18.5% tienen drenaje conectado a un recolector público, el 68.15% cuentan con fosa séptica o con letrina y en 13.8% las elimina a ras de suelo

La eliminación de desechos sólidos en el 1.9% por la red pública, el 61.9% los incinera o entierra y el 36.15% en basureros a cielo abierto.

Los habitantes por vivienda en promedio es del 5.7 miembros de familia.

El 52.96% de las viviendas cuentan con 1 a 2 cuartos y el 46.24% tiene más de 3 cuartos

El 53.7% de las viviendas cuentan con la cocina dentro de alguno de los dormitorios

2.5 Grado de escolaridad de población en edad productiva

El grado de escolaridad en la población de más de 15 años, el 29.4% son analfabetas, el 29.25 % tienen primaria completa, el 8.97 % tienen secundaria completa, el 2.12 % tiene otro tipo de estudios y el 30.26% tienen la primaria o secundaria incompleta.

2.6 Economía

2.6.1 Sector agropecuario

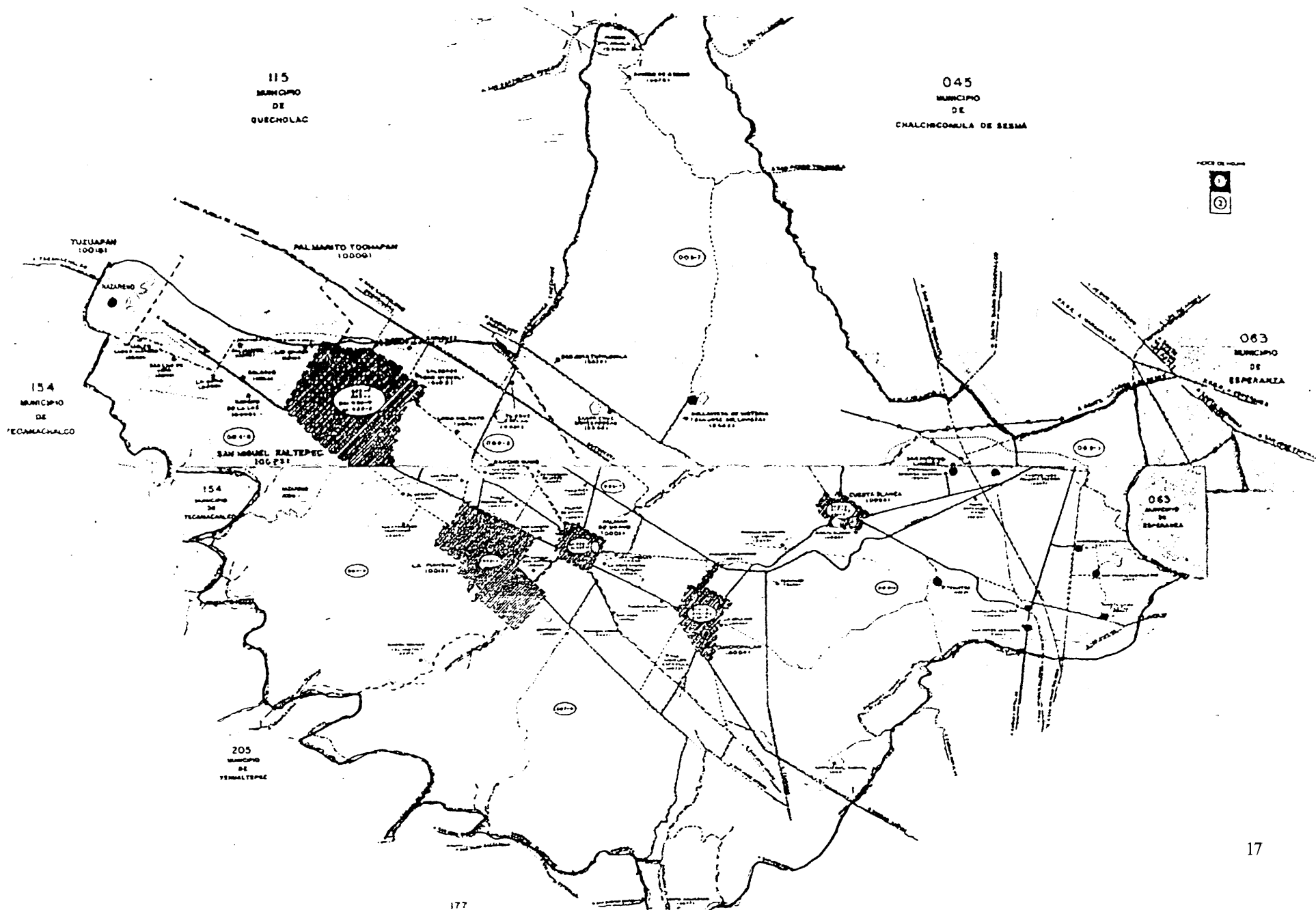
El Municipio por sus características geográficas de orografía, clima y edafología, se ve favorecido en las actividades agropecuarias ya que se cultivan y cosechan 23 productos agrícolas diferentes, se crían diferentes especies de ganado principalmente porcinos y caprinos y se cuenta con productos pecuarios, una lata producción de huevo; por lo que la producción de alimentos no se ve limitada, pero no así la distribución y comercio de esos productos agropecuarios hacia dentro del mismo Municipio, lo cual tiene repercusiones en la nutrición y en la economía familiar.

2.6.2 Ocupación y percepciones económicas de la población en edad productiva

De la población económicamente activa el 78.66% trabaja en el sector primario de la producción, el 8.39% en el sector secundario y el 12.98% en el sector terciario. Por lo que la mayoría depende de la producción de las cosechas de las tierras de temporal que son el 74.97% del total de las tierras de labor.

Los salarios que percibe la población económicamente activa, salario bajo (menos de un salario mínimo) en el 49.69%, salario medio (menos de 2 salarios mínimos) en el 23.69% y salario alto (más de 2 salarios mínimos) en el 2.11%, por lo que a la mayoría no les es posible cubrir sus propias necesidades ni la de su familia con repercusiones en su salud

Figura 4
Municipio de Palmar de Bravo, Puebla



2.6.3 Grado de marginalidad del municipio de Palmar de Bravo

La población en pobreza en el Municipio es del 74.1%. El Municipio tiene un grado de marginalidad alta, ya que el 19% de sus localidades tienen un grado de marginalidad media, el 46% como alta y el 35% como muy alta

Debido al grado de marginalidad del Municipio, la SEDESOL en Octubre de 1999 implementa el programa PROGRESA beneficiando a 2,656 familias en 28 localidades, aproximadamente al 43.91% del total de la población

2.7 Recursos para la salud

Cuenta con un hospital integral de segundo nivel en la localidad de Cuacnopalan, 3 unidades de salud y 16 casa de salud de la SSA y la UMF 38 del IMSS, además se cuenta con de 4 salas de expulsión, 5 salas o áreas de hidratación oral, 4 unidades dentales; 5 unidades de red fría y 4 radios de comunicación. Los recursos humanos con los que se cuenta son 9 médicos, 7 enfermeras, 5 odontólogos y 16 auxiliares de salud. Se llevan a cabo en el Municipio por los trabajadores de la salud programas sustantivos, programas de líneas estratégicas y un programa de políticas y estrategias de salud el PABASS.

2.8 Priorización de los problemas de salud del Municipio de Palmar de Bravo

Por un análisis de priorización utilizando datos de la mortalidad del Municipio de 1994 a 1998 por el método de Hanlon y el de Hanlon modificado por Julio Frenk, los cuales ordena los problemas de salud de acuerdo a su magnitud, factibilidad, vulnerabilidad y trascendencia según el grupo de edad que ocurra la defunción, así Hanlon considera trascendente las muertes que ocurren en menores de 15 años y Julio Frenk considera trascendentes las muertes que ocurren en edad productiva ya que tiene repercusión socioeconómica entre los pobladores.

Se puede considerar a la neumonía e influenza, a las enfermedades infecciosas intestinales, a las deficiencias de nutrición como los principales problemas de salud pública del Municipio ya que por ambos métodos están dentro de los 5 primeros lugares, además de las afecciones en el período perinatal, las infecciones respiratorias agudas, la cirrosis y enfermedades crónicas del hígado y los accidentes. (49) (Cuadro 4 y 5)

Por su magnitud las muertes por enfermedades del corazón ocupan el 5º lugar en el Municipio, después de neumonía e influenza, afecciones del período perinatal, cirrosis y deficiencias de la nutrición. (Cuadro 6)

Cuadro 4
Índice de priorización de los problemas de salud del Municipio de Palmar de Bravo en los años de 1994 a 1998 (Método de Hanlon)

CAUSA	Magnitud	Trascendencia	Factibilidad	Vulnerabilidad	Índice Priorización	Lugar
Neumonía, influenza	5	4	4	4	17	1
Enfermedades inf. intestinales	2	4	5	4	15	2
Infeción respiratoria aguda	1	5	5	4	15	3
Afecciones en período perinatal	4	5	4	1	14	4
Deficiencias de la nutrición	3	3	4	4	14	5

Fuente: Sistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones Jurisdicción sanitaria No. 9 Tepexi de Rodríguez SSA

Cuadro 5
Índice de priorización de los problemas de salud del Municipio de Palmar de Bravo en los años de 1994 a 1998 (Método Hanlon modificado por Julio Frenk)

CAUSA	Magnitud	Trascendencia	Factibilidad	Vulnerabilidad	Índice de priorización	Lugar
Neumonía e influenza	5	3	4	4	16	1
Enfermedades infe. intestinales	2	3	5	4	14	2
Deficiencias de la nutrición	3	2	4	4	13	3
Accidentes	2	5	3	3	13	4
Infeciosas respiratorias agudas	1	3	5	4	13	5

Fuente: Sistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones Jurisdicción sanitaria No. 9 Tepexi de Rodríguez SSA Puebla.

Cuadro 6
Priorización de los problemas de salud en función de su magnitud en el Municipio de Palmar de Bravo en los años de 1994 a 1998.

CAUSA	Casos	Frecuencia relativa	Valor Ponderado	Lugar
Neumonía e influenza	115	15.45	5	1
Afecciones del período perinatal	85	11.40	4	2
Cirrosis, enf. crónicas del hígado	83	11.15	4	3
Deficiencias de la nutrición	65	8.72	3	4
Enfermedades del corazón	62	8.32	3	5

Fuente: Sistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones Jurisdicción Sanitaria No. 9 Tepexi de Rodríguez SSA, Puebla.

2.9 Evaluación de la efectividad de los principales programas de salud en función de la morbilidad y mortalidad

Se realizó la evaluación de la efectividad de los principales programas de salud en el Municipio de Palmar de Bravo donde fueron aplicados por los trabajadores de la salud y se evaluaron en función de la morbilidad y mortalidad presentada en los años de 1994 a 1998.

2.9.1 Programa de enfermedades diarreicas agudas: Es un programa que tiene varios años operando con logros importantes, pero no así en población infantil (menores de 1 año) ya que es la 6ta causa de mortalidad en este grupo étnico y entre el grupo de preescolares (1 a 4 años) ocupa el 1ro lugar.

2.9.2 Programa de enfermedades respiratorias agudas y sus complicaciones: Las infecciones respiratorias agudas y sus complicaciones son la primera causa de morbilidad y de mortalidad entre los pobladores del Municipio, principalmente en la mortalidad en el grupo étnico de menores de 5 años y en el de edad post productiva, además se ha observado en los últimos años un alarmante incremento en la morbilidad en el grupo étnico de edad productiva.

2.9.3 Programa de nutrición: La mortalidad por deficiencia de la nutrición ocupa el 4to lugar en el grupo étnico de infantes (menores de 1 año), el 3er lugar en el grupo de preescolares (1 a 4 años) y el 3er lugar en el grupo en edad post productiva.

2.9.4 Programa de atención del recién nacido: Las afecciones originadas en el período perinatal son la principal causa de muerte entre el grupo étnico infantil (menos de 1 años)

2.9.5 Programa de enfermedades transmitidas por vectores: Paludismo, dengue, alacranismo, y enfermedad de Chagas, no fue posible evaluar su efectividad, ya que se requiere de información sobre su impacto en la morbilidad y mortalidad de los pobladores del Municipio y no existen reportes de casos o defunciones en los años estudiados de 1994 a 1998 por lo que el Municipio de Palmar de Bravo no está considerado como zona endémica de alguna de estas enfermedades transmitidas por vectores.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La trypanosomosis americana o enfermedad de Chagas se sabe que es un padecimiento que ocurre más frecuentemente en el medio rural donde los factores bióticos y abióticos favorecen su transmisión a través del ciclo silvestre y más frecuentemente por el ciclo doméstico de la enfermedad. (4)

En algunos estados de la República Mexicana, entre ellos el estado de Puebla poco se conoce sobre la presencia y distribución de los vectores (*Triatominos*) y de los reservorios animales domésticos y silvestres, más aun sobre la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en población humana del medio rural y de los factores que son riesgo para adquirirla.

El Municipio de Palmar de Bravo esta clasificado como de un alto grado de marginalidad y sus principales problemas de salud son padecimientos de tipo social. (49) Además existe el reporte de la presencia de *Triatominos* cercanos a esta región y de reservorios silvestres infectados con el parásito *Trypanosoma cruzi*. (22, 24)

Por lo que considero que se pueden estudiar la prevaecía de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos, así como identificar y relacionar los factores bióticos y abióticos que la determinan en este Municipio.

3.1 PREGUNTA CIENTIFICA

¿La prevalencia de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en personas en edad productiva esta determinada por los factores bióticos y abióticos existentes en el Municipio de Palmar de Bravo?

64176

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar y relacionar la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en personas en edad productiva con los factores bióticos y abióticos que la determinan en el Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 4.2.1** Determinar la prevalencia de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en personas en edad productiva (15 – 65 años) del Municipio de Palmar de Bravo, con las técnicas de ELISA, HAI, IFI y Western Blot.
- 4.2.2** Aislar al parásito por hemocultivo en medio de LIT o bien detectar el ADN del parásito por PCR en personas voluntarias detectadas como chagásico indeterminado.
- 4.2.3** Identificar y clasificar a los *Triatomínos* capturados en viviendas habitadas y en sitio peri domésticos de estas viviendas, en las localidades del Municipio de Palmar de Bravo.
- 4.2.4** Determinar la prevalencia de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en reservorios domésticos *Canis familiaris*.
- 4.2.5** Relacionar la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en personas en edad productiva con los factores bióticos y abióticos del Municipio de Palmar de Bravo.

5. METODOLOGIA

5.1. DISEÑO DE ESTUDIO:

Basándose en los objetivos, dependiendo de los recursos disponibles y con respecto a las características del problema, el estudio se clasifica como:

OBSERVACIONAL, TRANSVERSAL, DESCRIPTIVO Y PROSPECTIVO.

- 5.1.1 **OBSERVACIONAL:** No se modificará ninguno de los factores condicionantes durante el estudio.
- 5.1.2 **DESCRIPTIVO:** Describirá los factores bióticos y abióticos que influyen en la prevalencia de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en las personas en edad productiva del Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.
- 5.1.3 **TRANSVERSAL:** Permite una imagen en un punto específico de tiempo, de la magnitud de la prevalencia de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en las personas en edad productiva del Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.
- 5.1.4 **PROSPECTIVO:** Se registrará la información de las variables a investigar, según vaya ocurriendo el estudio

5.2 UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

- 5.2.1 En el presente trabajo las pláticas sobre la enfermedad de Chagas, la aplicación del cuestionario epidemiológico y la toma de muestras sanguíneas se efectuará en los 4 Centros de Salud de la SSA ubicados en las localidades de Palmar de Bravo, Cuacnopalan, San Miguel Xaltepec y Cuesta Blanca y en las 10 casas de salud que se encuentren bajo la influencia de cada uno de los centros de salud , así como en la UMF 38 del IMSS en la cabecera Municipal.
- 5.2.2 La separación de suero de las muestras sanguíneas y su almacenamiento se llevará a cabo en el laboratorio de parasitología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente del IMSS. Puebla, Pue.
- 5.2.3 La determinación de la prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* empleando las técnicas inmunoenzimática (ELISA-INC) como prueba tamiz y las pruebas confirmatorias inmunofluorescencia indirecta (IFI-INC) y Western Blot (WB-INC); para aislar al parásito

por hemocultivos en medio de LIT y la detección del ADN del parásito en los hemocultivos por el método de la replicación en cadena de ADN polimerasa PCR se realizarán en el laboratorio de inmunoparasitología del Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez México D.F.

- 5.2.4** La determinación de la prevalencia específica de anticuerpos contra *T. cruzi* empleando las técnicas hemaglutinación indirecta (HAI-InDRE 1:8) Y (HAI-InDRE semi cuantitativo) y las pruebas confirmativas IFI-InDRE e ELISA-InDRE se realizará en el laboratorio de Chagas del departamento de Parasitología del Instituto de Referencia Epidemiológica Dr. Manuel Martínez Baez, México D.F.
- 5.2.5** La clasificación de los *Triatomino*s capturados en viviendas y sitios peri domésticos, se efectuará en el laboratorio de Parasitología y Entomología Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla BUAP.
- 5.2.6** La determinación de anticuerpos séricos anti-*T. cruzi* en *Canis familiaris* con la técnica HAI-InDRE, se efectuará en el Laboratorio de Banco de Sangre del HE del CMN MACI IMSS
- 5.2.7** La relación de la prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* y de los factores bióticos y abióticos se realizó con: los resultados de la encuesta epidemiológica, el resultado de la prevalencia de anticuerpos contra *T. Cruzii*, con la clasificación e identificación de los *Triatomino*s infectados con *T. cruzi* empleando el programa estadístico epi info 5

5.3 MARCO MUESTRAL

5.3.1 De las localidades

5.3.1.1 Definición de la muestra: muestreo aleatorio.

5.3.1.2 Criterios de inclusión: localidades de más de 100 habitantes del Municipio de Palmar de Bravo en el Estado de Puebla.

5.3.1.3 Criterios de exclusión: Localidades que no pertenecen al Municipio de Palmar de Bravo en el Estado de Puebla.

5.3.2 De las viviendas

5.3.3 Definición de la muestra: muestreo aleatorio de sustitución.

5.3.3.1 Criterios de inclusión: Viviendas de las localidades donde hubo participación de personas voluntarias y estas permitieron la captura de los *triatomino*s

5.3.3.2 Criterios de exclusión: Viviendas de las demás localidades donde no hubo participación de personas voluntarias.

5.3.3 De las personas

5.3.3.1 Definición de la muestra: muestreo aleatorio

5.3.3.2 Criterios de inclusión: Personas en edad productiva de sexo femenino y masculino que voluntariamente deseen participar como parte del estudio y que tengan más de 10 años de radicar en el Municipio de Palmar de Bravo, Puebla

5.3.3.3 Criterios de exclusión. Personas que no pertenecen al grupo de edad productiva sexo femenino y masculino y que tengan menos de 10 años de radicar en el Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

Tamaño de muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{N z^2 pq}{d^2 (N-1) + z^2 pq} = 380 \text{ personas en edad productiva}$$

N = Población total de las 37 localidades del Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

z = 1.96 valor de confianza al 95%

d = error máximo permitido = 0.05

p = proporción de la población en edad productiva 18,111/ 35,870 = 0.504

q = 1 – p = 1 - .504 = .496

n = tamaño de muestra = 380

5.3.4. De los *Triatomino*s

5.3.4.1 Definición de la muestra: muestreo aleatorio

5.3.4.2 Criterios de inclusión: *Triatomino*s capturados en las viviendas y entorno peri doméstico de las localidades del Municipio de Palmar de Bravo.

5.3.4.3 Criterios de exclusión: *Triatomino*s capturados en localidades que no pertenezcan al Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

5.3.5 De los *Canis familiaris*

5.3.5.1 Definición de la muestra: muestreo aleatorio

5.3.5.2 Criterios de inclusión perros domésticos de las localidades de más de 100 habitantes del Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

5.3.5.3 Criterios de exclusión: perros callejeros o que no pertenezcan al Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

5.4 CARACTERIZACION DE LAS VARIABLES (anexo 2)

5.5 TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

5.5.1 Encuesta clínico epidemiológica

5.5.1.1 Selección del Municipio

El Municipio de Palmar de Bravo se seleccionó debido a que su Presidente Municipal solicitó a la Universidad Popular del Estado de Puebla un Diagnóstico de Salud del Municipio, un Plan de Salud para el Municipio y un Proyecto de Salud que fuera trascendente para los pobladores del Municipio de Palmar de Bravo.

5.5.1.2 Sensibilización de la población

Se solicitará la colaboración de los médicos responsables de las 4 unidades de salud de la SSA que se localizan en las localidades de Cuesta Blanca, San Miguel Xaltepec, Cuacnopalan y en la cabecera municipal Palmar de Bravo y del médico a cargo de la UMF 38 del IMSS, con los cuales se planeará la estrategia a seguir para reunir personas de las localidades que están bajo la influencia de cada una de las 4 unidades, en primer lugar se darán pláticas sobre la enfermedad de Chagas a los auxiliares de salud, que posteriormente se encargarán de reunir a las personas en las casas de salud que están a su cargo,

Las pláticas sobre la enfermedad de Chagas tendrán varios objetivos, entre ellos, que las personas conozcan ¿Qué es la enfermedad de Chagas?, ¿Quién la causa?, ¿Quién la transmite?, ¿Cómo se transmite?, ¿Cuáles son sus consecuentes manifestaciones clínicas?

Se empleará la técnica de exposición con material visual como láminas y ejemplares de *Triatomino*s procurando usar un lenguaje comprensible para este grupo de personas en su mayoría con deficiente instrucción o analfabetas.

A las personas que sean caso indeterminado se les localizará, para que accedan a proseguir en el estudio con su autorización (anexo 3), estas personas se les extraerá muestra de sangre para realizar un hemocultivo y la prueba de PCR, así como, un electrocardiograma; además se les practicará un electrocardiograma a un grupo de personas que fueron negativas anticuerpos contra *T. cruzi* relacionadas en edad y sexo con las personas que fueron casos indeterminados.

5.5.1.3 Aplicación del cuestionario epidemiológico

A las personas voluntarias con el fin de obtener sus datos personales, hábitos y las características de sus viviendas, entre otras preguntas se les aplicará un cuestionario. (anexo 4)

5.5.1.4 Toma de muestra sanguínea:

A las personas que aceptaron voluntariamente participar en el estudio, se les indicará que deberán estar en ayuna, para la extracción de la muestra de sangre se utilizará el sistema Vacutainer empleando tubos sin anticoagulante, los cuales serán centrifugados para la recuperación de la fase sérica y ésta será dividida en 5 alícuotas guardadas en tubos plásticos de fondo cónico de 1.5 ml y se mantendrán a -20°C hasta su uso.

5.5.2 Técnicas para la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi*

5.5.2.1 Obtención de Antígeno extracto crudo soluble de *T. cruzi* para (ELISA-INC)

Se obtiene antígeno (extracto crudo soluble) a partir de un cultivo masivo de parásitos *T. Cruzi* de la cepa NINOA en medio de cultivo líquido LIT o en medio de cultivo bifásico de BHI enriquecidos con suero fetal bovino desactivado al 10% en PBS 0.01M.

Se cosechan los parásitos, centrifugando el medio de cultivo líquido en alícuotas a 4,000 rpm se desecha el sobrenadante y el decantado se lavó 3 veces con solución PBS 0.01M a 3,000 rpm cada vez, Al decantado ya lavado se le adiciono igual volumen de solución de PBS 0.01M y se le adiciona inhibidores de proteasas como EDTA de 0.5 – 2.0 mM/ml; Pepstatin 1 $\mu\text{g/ml}$; PMSF de 20 a 100 $\mu\text{g/ml}$; TLC 50 mg/ml; Aprotinin de 0.1 a 2.0 $\mu\text{g/ml}$

Después el decantado fue sonicado 5 veces por 10 segundos a 100 W en un sonicador Braunsionic 1510 de B. Braun Melsungen AG, después se centrifugo a 13,000 rpm durante 20 minutos y al sobrenadante que se obtuvo, fue congelado a -70°C hasta su uso. Se obtuvo la concentración de proteínas del (antígeno extracto crudo soluble) empleando el método de Lowry.

5.5.2.2 Obtención de antígeno parásitos de *T. cruzi* para (IFI-INC)

Se obtiene antígeno (suspensión de parásitos) a partir de un cultivo masivo de parásitos *T. Cruzi* de la cepa NINOA en medio de cultivo líquido LIT o en medio de cultivo bifásico de BHI enriquecidos con suero fetal bovino desactivado al 10% en PBS 0.01M.

Se cosechan los parásitos, centrifugando el medio de cultivo líquido en alícuotas a 4,000 rpm se desecha el sobrenadante y el decantado se lavó 3 veces con solución PBS 0.01M a 3,000 rpm cada vez, a la masa de parásitos ya lavado se le adiciono un volumen de solución de PBS 0.01M para así obtener una suspensión de parásitos completos con 25 a 30 células por campo de microscopio de 400X.

5.5.2.3 Determinación de proteínas en el extracto crudo soluble de *T. cruzi* por el método de Lowry.

Reactivos:

Solución A se prepara añadiendo: 1ml de solución de Tartrato de Sodio y Potasio al 2%, 1ml de solución de CuSO_4 al 1% y 100 ml de solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N

Solución B se prepara con: Reactivo de Folin (Ciocateu's phenol reagent 2.0 N) en dilución 1:2 con agua destilada.

Técnica para la curva de calibración.

1. A cada uno de los tubos que contienen solución stock de albúmina o de agua destilada en las cantidades de (0.0 a 1.0 ml) se les adiciona 3 ml de solución A, se mezclan y se dejan incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
2. Después a cada tubo se les adiciona 0.3 ml de solución B y se dejan incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.

Número de tubo	Ml de solución stock de albúmina 0.1 mg / ml	Ml de agua destilada	Ml de solución A	Ml de solución B
1	0.0 (00 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.0	3.0	0.3
2	0.2 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.8	3.0	0.3
3	0.4 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.6	3.0	0.3
4	0.6 (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.4	3.0	0.3
5	0.8 (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.2	3.0	0.3
6	1.0 (100 $\mu\text{L}/\text{ml}$)	0.0	3.0	0.3

3. Realizar todo lo anterior por duplicado
4. Leer a 750 nm
5. Graficar la curva de calibración
6. Al problema (antígeno de *T. Cruzi*) se diluye 1:50 y 1:100 y se trabaja en igual forma, se escoge alguna de las diluciones de los 6 tubos empleados para realizar la curva de calibración.
- 7 Cálculos:

Resultado del problema se obtiene de la gráfica de la curva de calibración, así se obtuvo (37 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteínas en la dilución del antígeno 1:50) en 600 μl de antígeno (0.6 ml de problema + 0.4 agua), por lo que en 1,000 μl de antígeno habrá 61.66 μg de proteínas y esto por 50 (dilución 1:50) = 3,083.33 μg de proteínas /1,000 μl de antígeno = 3.08 μg de proteínas/ 1 μl de antígeno.

5.5.2.4 Determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* por la técnica inmunoenzimática en medio sólido (ELISA-INC).

Reactivos, material y equipo:

Conjugado anti IgG humana (chivo) - peroxidasa
Sueños control positivo y negativo

Buffer de Carbonatos 0.01M a pH 9.6

PBS Tween al 0.05%

Albúmina al 1% en PBS tween

Buffer Citrato – Fosfato 0.1M a pH 5.0

Solución de revelado

Micropipetas de 1 μ L y de 40 a 200 μ L (múltiple)

Puntas para micropipetas

Microplacas con fondo en u

Lector de ELISA

Técnica:

a) Sensibilización de la microplaca con el antígeno de *T. cruzi*

1. La técnica requiere de 1 μ g de proteína en 200 μ l Buffer de Carbonatos 0.01M pH 9.6 por pozo para sensibilizar los pozos de la microplaca, si la concentración fue de 3.08 μ g de proteína / μ l de antígeno, se requerirá de 0.32 μ l de antígeno que contienen 1.0 μ g de proteínas por pozo, por lo que para 100 pozos se requiere de 32 μ l de antígeno + 20,000 μ L de Buffer de Carbonatos 0.01M
2. Se agregan 200 μ l de la solución Antígeno – Buffer de Carbonatos 0.01M pH 9.6, a cada uno de los pozos, se cubre la microplaca y se deja a incubación a 37 °C durante 20 minutos.
3. Se lavan cada uno de los pozos de la microplaca 5 veces y cada vez con 200 μ l de solución de tween 0.05% en PBS 0.01M.
4. Bloquear con 200 μ l de albúmina al 1% en solución de tween 0.05% en PBS 0.1M a cada uno de los pozos, incubando a 37 °C durante 5 minutos.
5. Se lavan cada uno de los pozos de la microplaca 5 veces y cada vez con 200 μ l de solución de PBS tween 0.05%.

b) Determinación de anticuerpos contra *T. cruzi*

6. Se agregan 200 μ l de buffer PBS tween 0.05% en PBS a cada pozo y 1 μ l de muestra problema o bien control negativo o control positivo, a los pozos que se emplean como

blancos, solo se les adiciona el buffer PBS tween 0.05%, se cubre la microplaca con mica adhesiva y se incuba a 37 °C por 30 minutos.

7. Se lavan cada uno de los pozos de la microplaca 5 veces y cada vez con 200 µl de solución de PBS tween 0.05%.
8. Se agregan 200 µl de conjugado anti IgG humana- peroxidasa de Calbiochem diluido 1: 25,000 en solución de albúmina al 1% PBS tween 0.05% a cada uno de los pozos y se deja incubar la microplaca a 37 °C durante 5 minutos.
9. Se lavan cada uno de los pozos de la placa 5 veces y cada vez con 200 µl de solución de PBS tween 0.05%.
10. Se agregan 200 µl de solución de revelado a cada uno de los pozos; se deja la solución de revelando durante 10 minutos.
11. Se para la reacción de revelado agregando 50 µl de ácido sulfúrico 2.5N a cada uno de los pozos
12. Se introduce la microplaca en el Microplate reader Modelo 550 de BIO-RAD para obtener lecturas en densidad óptica.
13. Se obtiene el valor de corte sumando la media de las lecturas obtenidas + 5(desviación estándar) = valor de corte.
14. Interpretación, los valores que queden por abajo del valor de corte se consideran negativos y los valores que queden arriba del valor de corte se consideran como positivos a anticuerpos contra *T. Cruzi*. Los valores que se encuentran + o - .10 de densidad óptica del valor de corte se repiten, así como los valores positivos francos.

5.5.2.5 Determinación de anticuerpos contra *T. cruzi*. por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI-INC).

Reactivos, material y equipo

Conjugado anti IgG humana (Chivo) – fluoresceína

Buffer PBS 0.01M

Portaobjetos y cubreobjetos

Micropipetas de 1µL, 40 a 200 µL

Puntas para micropipetas

Microscopio de fluorescencia

Técnica:

a) Preparación de los portaobjetos con el antígeno

1. Se lava 3 veces una alícuota de parásitos *T. Cruzi* obtenidos por cultivo en medio de LIT con buffer PBS 0.01M.
2. Se coloca sobre el portaobjetos marcados previamente con 2 círculos y dentro de los círculos una gota de suspensión de parásitos (aproximadamente de 25 a 30 en campo 400X) y se guardan los portaobjetos en congelación a -20°C .
3. Al hacer uso de estos portaobjetos con la suspensión de parásitos es importante no dejar que se sequen al aire.

b) Detección de anticuerpos contra *T. Cruzi*

4. Colocar sobre y dentro del círculo que contiene la suspensión de parásitos $50\ \mu\text{l}$ de una dilución 1:64 de la muestra problema o bien del control positivo o del control negativo y para el blanco solo se coloca buffer PBS 0.01N. Dejar incubar los portaobjetos dentro de una cámara humedecida y a temperatura ambiente durante 30 minutos
5. Introducir los portaobjetos previamente escurridos en vasos de Coplin y lavarlos 3 veces por agitación durante 5 minutos cada vez con buffer PBS 0.01M.
6. Colocar sobre y dentro del círculo que contiene la suspensión de parásitos y que previamente fue incubada con la muestra problema o bien con el control positivo o el negativo, $50\ \mu\text{l}$ del conjugado anti IgG humana – fluoresceína diluido 1:120 en azul de Evans al 1%. Dejar incubar los portaobjetos dentro de una cámara humedecida y a temperatura ambiente durante 30 minutos
7. Introducir los portaobjetos previamente escurridos en vasos de Coplin y lavarlos 3 veces por agitación durante 5 minutos cada vez con buffer PBS 0.01M.
8. Colocar sobre el círculo marcado en el portaobjetos resina y colocar un cubreobjetos.
9. Hacer lecturas en Microscopio de fluorescencia
10. Interpretación observación de fluorescencia (+,++ o +++) se da como detección positiva de anticuerpos contra *T. cruzi*.

5.5.2.6 Obtención de antígeno para (HAI-InDRE)

A partir de epimastigotos de 15 aislamientos de parásitos realizados en México 8 de seres humanos y del vector, cultivados en medio de triptosa de infusión de hígado (LIT) y cosechados en fase exponencial de crecimiento, el extracto proteínico se mezcló con eritrocitos de pollo tratados previamente con ácido tánico.

5.5.2.7 Determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* por el método de Hemaglutinación Indirecta (HAI-IndRE 1:8)

Mica adherible

Reactivos, material y equipo

PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2)

Glóbulos rojos de pollo sensibilizados (antígeno)

Suero control positivo y negativo

Placas para microtitulación fondo en U

Micropipetas para medir volúmenes de 44 μL , 25 μL , 3 μL y 6 μL

Puntas para micropipetas

Técnica

1. Colocar 22 μL del diluyente PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2) en cada uno de los pozos a utilizar, incluyendo controles positivo y negativo.
2. Colocar 3 μL de suero problema y testigos en cada pozo correspondiente, mezclar bien.
3. Añadir 25 μL de glóbulos rojos sensibilizados a cada uno de los pozos empleados
4. Agitar la placa durante 30 segundos (golpeando a los lados de la placa)
5. Dejar en reposo la placa debidamente tapada durante 30 minutos a temperatura ambiente
6. Efectuar la lectura de la placa de la siguiente manera:
 - Positivo: Formación de manto que cubre el fondo del pozo
 - Negativo: Formación de botón depositado en el fondo del pozo
 Incluir en cada placa un control positivo y un control negativo

5.5.2.8 Hemaglutinación indirecta (HAI-IndRE semicuantitativa)

Técnica

1. Colocar 44 μL del diluyente PBS en el primer pozo de cada hilera de una placa de microtitulación con fondo en U.
2. Colocar 25 μL de PBS a los pozos siguientes.
3. Colocar 6 μL de suero problema y testigos en cada pozo correspondiente, mezclar bien
4. Transferir 25 μL de suero del primer pozo al segundo con ayuda de una pipeta, homogenizar perfectamente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada.

5. Decantar 25 μ L del último pozo.
6. Añadir 25 μ L de glóbulos rojos sensibilizados con antígeno a cada uno de los pozos
7. Agitar la placa durante 30 segundos
8. Dejar la placa en reposo, durante 30 minutos a temperatura ambiente
9. Efectuar la lectura de la placa de la siguiente manera:

Positivo: Formación de manto que cubre el fondo del pozo

Negativo: Formación de botón depositado en el fondo del pozo

El título de anticuerpos estará dado por la dilución del pozo presente 50% de la superficie del fondo cubierta por el manto de aglutinación.

5.5.2.9 Determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* por la técnica de (IFI-InDRE).

Técnica:

1. Se colocan 30 μ L de la dilución 1:32 de las muestras, así como del control positivo y del negativo, como blanco se utiliza PBS pH 7.2 a 7.4 en cada uno de los pozos que contenían el antígeno de *T. Cruzi*.
2. Se deja incubar media hora en cámara húmeda para evitar la desecación de las laminillas a 37 ° C.
3. Después de la incubación las laminillas se colocan en una canastilla y se lavan tres veces con PBS pH 7.2 A 7.4, cada lavado se realiza durante diez minutos con agitación constante.
4. Posteriormente se agregan 20 μ L de la dilución 1:10 del conjugado (Anti-igG humano + Fluoresceína) en azul de Evans.
5. Se incuban media hora en cámara húmeda para evitar la desecación de las laminillas a 37 ° C.
6. Después de la incubación las laminillas se colocan en una canastilla y se lavan tres veces con PBS pH 7.2 a 7.4, cada lavado se realiza durante 5 minutos y con agitación constante.
7. Posteriormente a cada preparación se le agrega una gota de buffer de Veronal pH 7.0 se coloca un cubreobjetos a cada preparación y se guardan evitando que les diera la luz para realizar la lectura.
8. La lectura se realiza en un microscopio de luz U.V.

Criterios de interpretación de la prueba.

Se considera como muestra sérica positiva a aquellas que presenten fluorescencia a la dilución mencionada en la reacción, con una intensidad de fluorescencia de + a ++++.

5.5.2.10 Detección de anticuerpos contra *T. cruzi* por el método de (WB-INC)

5.5.2.10.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida – SDS de los antígenos de *T. cruzi*.

- 1 Se prepararon geles para electroforesis en poliacrilamida al 10% (gel separador y gel concentrador)
- 2 A 250 μL de antígeno con una concentración de proteínas de 3,058 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ se añadieron 250 μL de buffer de muestra y .25 μL de 2- mercaptoetanol, calentándose a 100 °C durante 5 minutos antes de su aplicación a los geles de poliacrilamina al 10%.
3. Se aplicaron a los geles de poliacrilamina al 10% marcadores de peso molecular
4. La electroforesis se llevo a cabo a 100 V a 4°C durante 150 minutos
5. Una tira del gel de poliacrilamina se corto y fue teñida con rojo de Ponsou para observar el corrimiento de las proteínas del antígeno, así como, la parte del gel donde se aplicaron los marcadores de peso molecular.

5.5.2.10.2 Inmunotransferencia (IMMUNOBLOTTING) de los antígenos de *T. cruzi*

Técnica:

- 1 El gel de poliacrilamida que contiene las proteínas antigénicas separadas, es puesto en contacto con una membrana de nitrocelulosa, durante 3 horas a 500 mA, empleando buffer de transferencia en una cámara de electroforesis.

5.5.2.10.3 Western Blot

- 1 La membrana de nitrocelulosa donde se efectuó la transferencia, se bloqueó con albúmina al 1% en PBS Tween 0.5% durante toda la noche a 4°C.
- 2 De la membrana se cortaron tiras de 0.7 cm de ancho, estas se incubaron con los sueros diluidos 1:1,000 de las personas seropositivas, así como, de los sueros control positivo y negativo, durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Después se realizaron 5 lavados a las tiras de nitrocelulosa con PBS Tween 0.5% durante 10 minutos cada vez.
- 5 Después del lavado se incuban las tiras de nitrocelulosa con conjugado anti IgG humana (chivo) – peroxidasa diluído 1:2000 en PBS Tween 0.5% durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. Después se realizaron 5 lavados a las tiras de nitrocelulosa con PBS Tween 0.5% durante
7. La reacción enzimática se puso de manifiesto con una solución de revelado durante 10 minuto a temperatura ambiente, se detuvo la reacción con agua destilada.
- 8 Interpretación: reconocimiento de bandas entre 48 a 52 Kda

.5.3 Técnicas para la demostración del parásito

5.5.3.1 Hemocultivo en medio de LIT con suero fetal bovino en el INC.

1. Tomar muestra sanguínea en condiciones de esterilidad (limpiar la piel con torundas con solución de iodo), extraer sangre en tubos estériles heparinizados, aproximadamente unos 25 ml.
2. Centrifugar en un tubo de 50 ml estéril la muestra sanguínea a 3,000 rpm a 4° C durante 10 minutos
3. Se separa una alícuota de aproximadamente 3 ml de plasma de la parte más superficial en un tubo estéril, luego otro volumen igual de la parte menos superficial y otro volumen igual del plasma cercano al paquete globular. A cada uno de los tres tubos se les agrega un volumen igual de medio de cultivo LIT y al tubo que contiene el paquete globular se le añade un volumen igual de medio de cultivo LIT.
4. Incubar los tubos a 28 ° C y vigilar crecimiento hasta por 4 meses

5.5.3.2 Detección del ADN de *T. cruzi* en muestras de hemocultivo por el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) (Polimerase Chain Reaction) .

5.5.3.2.1 Extracción y precipitación de ADN en muestras de hemocultivos.

Material y reactivos

Tubos de fondo cónico de 1500 y 500 µL

Micropipetas de 0.5 A 2.0 µL, 1 a 10 µL, 40 a 200 µL y de 200 a 1000 µL

Puntas estériles

Microcentrifuga Sorvall RMC DUPONT

Acetato de Sodio 3M A pH 5.2

Etanol absoluto frío

Etanol al 70% frío

Agua destilada y esterilizada.

Fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (v/v/v)

Técnica

1. A 1 ml de muestra de hemocultivo, se centrifuga a 4,500 rpm durante 5 min y se tira el sobrenadante que es medio de cultivo.
2. Al paquete de glóbulos blancos o rojos que se sedimentó se agrega un volumen igual de agua estéril, se mezcla y se le añade volumen igual de fenol / cloroformo / alcohol isoamilico, se mezcla en vortex y se centrifuga a 10,000 rpm durante 2 minutos, se

separa el sobrenadante donde esta el DNA que se extrajo, se puede repetir este paso de ser necesario.

3. Al sobrenadante se le mide el volumen y se añade 1/10 v de acetato de Sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcla ligeramente y se deja a -70°C de 1 a 24 horas.
4. Se descongela y se centrifuga a 12,000 rpm durante 20 minutos.
5. Al botón se le lava con etanol al 70% centrifugando a 10,000 rpm durante 5 minutos cada vez.
6. Al botón se le deja secar de etanol
7. El botón es disuelto en 10 a 20 μL de agua estéril y se mide a en un espectrofotómetro Beckman DU 600 en luz uv a 260 nm se detectan ácidos nucleicos.
8. Cálculos: 1.0 unidades de D.O. equivale a 50 μg de ADN

5.5.3.2.2 Amplificación del ADN de *T. cruzi* por el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) (Polimerase Chain Reaction) .

Técnica

1. Mezcla de reacción.

Buffer (10X) libre de Mg (10 mM)	5.0 μL
MgCl (20X) (1.5 mM concentración final)	2.5 μL
Nucleótidos (10 mM) (Gibco)	1.0 μL
Primers <i>KNS₁</i> y <i>KNS₂</i> (0.25 μM) ADN de mini círculos de cinetoplasto (CINVESTAP)	1.0 μL
ADN de <i>T. cruzi</i> como control positivo, ADN de humano como control negativo y ADN extraído de la muestra problema	1.0 μL
Enzima taq-polimerasa (2.5 μM)	1.0 μL
Agua estéril	35.5 μL
Aceite mineral (Molecular SIGMA Biology)	50.0 μL

2. A esta mezcla se le dio un pulso en microcentrifuga (Sorvall RMC DUPONT)
3. Transferir la mezcla de reacción a un Termociclador T gradient Biometra programa *T. cruzi* a 31 ciclos.

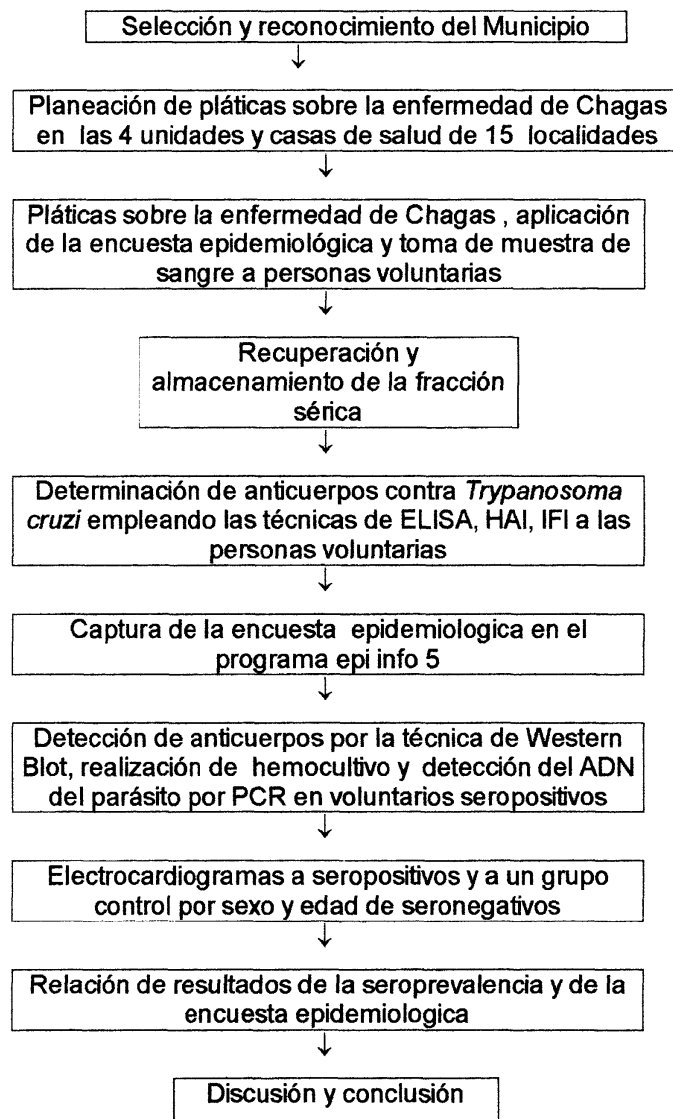
5.5.3.2.3 Electroforesis en agarosa del ADN amplificado.

Técnica:

1. A 0.45 g de agarosa (grado tecnología genética) se disuelven con 30 ml de PBE 1X con calor y se agrega a una cámara de electroforesis para geles de agarosa vertical Minicell, se coloca un peine para formar pocillos.
 2. Se llena la cámara de electroforesis conteniendo el gel de agarosa solidificado con PBE 1X
3. Dentro de los pocillos se colocan 2 μL de colorante + 10 μL de del ADN amplificado (control positivo, control negativo, y ADN problema). Se coloca un blanco con la mezcla de reacción.
4. Se corre la electroforesis a 70 V durante 90 minutos.
5. Se tiñe con Bromuro de etidio aproximadamente al 10% durante 10 minutos
6. Se lava el gel con agua corriente durante 30 minutos
7. Se observa el corrimiento en un transluminador de luz uv

5.6 DIAGRAMAS DE TRABAJO

5.6.1 DIAGRAMA 1



5.6.1 DIAGRAMA 2



5.7 CRONOGRAMA DE TRABAJO

Nombre del Protocolo: Determinación de la prevalencia de anticuerpos a *Trypanosoma cruzi* en personas en edad productiva y los factores bióticos y abióticos que la determinan en el Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

Programa de trabajo:

***** Programado

Real

Fecha de revisión: Primer lunes de cada mes.

No.	PRODUCTO	MESES											
		M	J	J	A	S	O	N	D	E	F	M	A
1	Revisión bibliográfica	##											
2	Diseño de protocolo	##	##	##									
3	Aplicación de la encuesta epidemiológica				##	##							
4	Toma de muestras de sangre a persona voluntarias				##	##							
5	Determinación de Ac. vs. <i>T. cruzi</i> (ELISA, HAI, IFI y WB)						#	##	##	##			
6	Toma de muestras para hemocultivos y PCR							##					
7	Determinación de ADN del parásito en hemocultivos							#		#	#		
8	Captura de <i>Triatominos</i> y de los <i>Canis familiaris</i> , porcinos.				#		#	#					##
9	Identificación y clasificación de los <i>Triatominos</i>				#	##	#	##	##	##		#	##
10	Identificación de <i>T. cruzi</i> en <i>Triatominos</i> infectados				#	##	#	##	##	##		#	##
11	Determinación de anti- <i>T. cruzi</i> en <i>Canis familiaris</i>												## ##
12	Electrocardiogramas en personas seropositivas												## ##
13	Análisis de resultados de la encuesta epidemiológica										##		
14	Discusión y conclusiones											##	
15	Informe final												*##

6. LOGISTICA

6.1 Recursos humanos

- 1 Biomédico
- 1 Entomólogo
- 1 Epidemiólogo
- 1 Q.F.B. (estudiante de maestría para optar al grado de Maestría en Salud Pública)

6.2 Recursos materiales

- 6.2.1 Laboratorio de Inmunoparasitología del Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez de la SSA. México D.F.
- 6.2.2 Laboratorio de Parasitología y Entomología de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 6.2.3. Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigación Biomédica de Oriente CIBIOR Puebla, Pue. Instituto Mexicano del Seguro Social
- 6.2.4. Laboratorio de Parasitología del Instituto de Referencia Epidemiológica InDRE SSA México D.F.
- 6.2.5. Laboratorio del Banco de Sangre del Hospital de Especialidades del CMN MAC IMSS

6.3 Recursos financieros:

6.3.1 Instituto Nacional de Cardiología de la SSA México D.F.

Domicilio: Juan Badiano No. 1 Col. Sección XVI Delegación Tlalpan 14080 México D.F.

Responsable: Dr. Pedro A. Reyes López

Puesto: Director General de Investigación

Descripción del apoyo:

Asesoría para la realización de pruebas serológicas, hemocultivo y detección del ADN del parásito. Material y reactivos para la determinación de anticuerpos séricos contra *T. Cruzi* en humanos por las técnicas de IFI, ELISA, Western Blot y detección del ADN del parásito por PCR y aislamiento del parásito por hemocultivo.

Electrocardiogramas a personas seropositivas y a un grupo control de seronegativas .

6.3.2. Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Responsable: M.C. José Lino Zumaquero Ríos
Puesto: Catedrático de Parasitología y Entomología

Descripción del apoyo:

Captura doméstica, peri doméstica de los *Triatominos*

Transporte y viáticos para las personas que capturen a los *Triatominos*

Transporte y viáticos para las personas que capturen a los reservorios domésticos *Canis familiaris*, equinos y porcinos.

Material y reactivos para la clasificación por especie de los *Triatominos* capturados.

Material y reactivos para detectar *Triatominos* infectados por *T. cruzi*

6.3.3 Instituto Mexicano del Seguro Social

Domicilio: 4to Piso del bloque B de la Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional "Siglo XXI"

Responsable: Dr. Onofre Muñoz Hernández

Puesto: Coordinador de Investigación Médica

Descripción del apoyo:

Personal de investigación para realizar y ser responsable del proyecto

Material para toma de muestras sanguíneas en voluntarios

Transporte de personal para realizar la toma de muestras sanguíneas y pláticas sobre la enfermedad de Chagas a personas voluntarios en las localidades del Municipio de Palmar de Bravo.

Material para almacenar en congelación las fracción sérica de las muestras sanguíneas

6.3.4. Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica

Responsable: M.C. Carmen Guzmán Bracho

Puesto: Jefe del departamento de Parasitología del InDRE

Descripción del apoyo:

Material y reactivos para la determinación de anticuerpos séricos contra *T. cruzi* en humanos por las técnicas de HAI tamiz 1:8 y HAI semi cuantitativa a seropositivos y confirmativas por las técnicas de IFI y ELISA

Reactivos para la determinación de anticuerpos séricos contra *T. cruzi* por HAI tamiz 1:8 y HAI semi cuantitativa en reservorios domésticos como *Canis familiaris*, equinos, porcinos y reservorios silvestres.

7. RESULTADOS

7.1 De la encuesta epidemiológica

A las personas que accedieron a participar en el estudio se les aplicó un cuestionario (anexo 4) y los resultados de la encuesta son los siguientes:

Se realizaron visitas a 15 localidades de más de 100 habitantes en el transcurso de 2 meses, impartándose pláticas sobre la enfermedad de Chagas a aproximadamente 3,500 personas de todas las edades, en estas localidades hubo disponibilidad de los habitantes y sus autoridades para participar en el estudio.

Las características de las localidades fueron: 1 tiene grado de marginalidad media, 1 es de grado de marginalidad muy alta y 13 son de grado de marginalidad alta, el Municipio en general esta considerado como de alta marginalidad.

El Municipio tiene una altitud entre 2,150 a 2,500 metros sobre el nivel del mar (m/nm), de las localidades estudiadas, 5 están a una altura de menos de 2,250 metros sobre el nivel del mar y 10 están localizadas a más de 2,250 metros sobre el nivel del mar. (Cuadro 7)

Cuadro 7
Características de las localidades estudiadas

Localidad	*Grado de marginalidad	**Altura (metros sobre del nivel del mar)
Palmar de Bravo	Media	2,180
La Purísima	Muy alta	2,180
San Miguel Xaltepec	Alta	2,150
Jesús Nazareno	Alta	2,150
Cuacnopalan	Alta	2,230
San José Bellavista	Alta	2,250
Cuesta Blanca	Alta	2,370
Tehuizto	Alta	2,380
Guadalupe Piletas	Alta	2,380
Los Reyes Altamira	Alta	2,500
Encrucijada primera sección	Alta	2,400
Encrucijada segunda sección	Alta	2,400
Cuesta Chica Piletas	Alta	2,400
San Francisco Piletas	Alta	2,400
Amozoquillo Piletas	Alta	2,400

*Fuente: CONAPO, Índices Básicos de Marginación por localidad en el Municipio de Palmar de Bravo, Puebla, 1995

** Fuente: Sistema Estatal de Protección Civil de Puebla basándose en INEGI

En estas 15 localidades accedieron a colaborar en el estudio 390 personas en edad productiva (15 a 65 años), las cuales acuden a recibir servicios de salud al IMSS, a la SSA o bien están integradas al programa PROGRESA-SSA de la SEDESOL. (Cuadro 8)

Cuadro 8
Personas encuestadas, localidad donde habitan e instituciones donde acuden a recibir servicios de salud o programa al que están integradas.

Localidad	Número de Voluntarios encuestados	Instituciones de servicios de salud o programa al que pertenecen
Palmar de Bravo	22	PROGRESA-SSA
		IMSS
La Purísima	47	PROGRESA-SSA
		IMSS
San Miguel Xaltepec	33	PROGRESA-SSA
Jesús Nazareno	62	SSA
Cuacnopalan	70	PROGRESA-SSA
San José Bellavista	21	SSA
		IMSS
Cuesta Blanca	19	PROGRESA-SSA
Tehuizto	22	PROGRESA-SSA
Guadalupe Piletas	10	SSA
Los Reyes Altamira	3	SSA
Encrucijada primera sección	5	SSA
Encrucijada segunda sección	3	SSA
Cuesta Chica Piletas	25	SSA
San Francisco Piletas	24	SSA
Amozoquillo Piletas	24	SSA
Total	390	

El 60% (234) de los encuestados habitan en 5 localidades que se encuentran entre los 2,150 a 2,230 metros sobre el nivel del mar y 40% (156) habitan en 10 localidades que están entre los 2,250 a 2,500 metros sobre el nivel del mar. (Cuadro 9)

Cuadro 9
Encuestados y altitud de las localidades donde habitan

Altitud (metros sobre el nivel del mar)	Número de voluntarios encuestados	%
2,150 a 2,230	234	60
2,250 a 2,500	156	40

19.2% (36) de los encuestados habitan en localidades con grado de marginalidad media, el 78% (304) habitan en localidades con grado de marginalidad alta y 12.8% (50) con grado de marginalidad muy alta. (Cuadro 10)

Cuadro 10
Encuestados y grado de marginalidad de las localidades donde habitan

Grado de Marginalidad de las localidades	Número de encuestados	%
Media	36	9.2
Alta	304	78.0
Muy alta	50	12.8
Total	390	100.00

De los encuestados 60% (234) habitan en 5 localidades donde fueron capturados *Triatomino*s las cuales son La Purísima con grado de marginalidad muy alta y está a una altitud de 2,180 m/snm, San Miguel Xaltepec con grado de marginalidad alta y altitud de 2,150 m/snm, Nazareno con grado de marginalidad alta y altitud de 2,150 m/snm, Cuacnopalan grado de marginalidad alta y altitud de 2,230 m/snm y Palmar de Bravo con grado de marginalidad media y altitud de 2,150 m/snm. De los encuestados 40% (156) habitan en las restantes 10 localidades donde no se capturaron o están a una altitud de 2,500 metros sobre nivel del mar *Triatomino*s. (Cuadro 11)

Cuadro 11
Encuestados y características de las localidad donde se capturaron *Triatomino*s

Localidad	Número de encuestados	%	Altitud (metros sobre el nivel del mar)	Grado de marginalidad
La Purísima	47	12.05	2,180	muy alta
San Miguel Xaltepec	33	8.46	2,150	alta
Nazareno	62	15.89	2,180	alta
Cuacnopalan	70	17.94	2,230	alta
Palmar de Bravo	22	5.64	2,150	media
Total	234	60.00	Promedio 2,178	Promedio alta

De los encuestados 93.84% (366) fueron del sexo femenino y 6.16% (24) fueron del sexo masculino; esta marcada diferencia fue debido a la idiosincrasia de los pobladores (Cuadro 12)

Cuadro 12
Encuestados por sexo

Sexo	Número de encuestados	%
Femenino	366	93.84
Masculino	24	6.16

El rango de edad de los encuestados fue de 15 a 65 años, con una media de 36.6 años, por grupo étnico fueron el 17.69% de 15 a 25 años, el 33.07% de 26 a 35 años, el 26.42% de 36 a 45 años, el 13.34% de 46 a 55 años y el 9.48% de 56 a 65 años. (Cuadro 13)

Cuadro 13
Encuestados por grupo étereo

Grupo étereo	Número de encuestados	%
15 - 25	69	17.69
26 - 35	129	33.07
36 - 45	103	26.42
46 - 55	52	13.34
56 - 65	37	9.48
Media = 36.6	390	100.00

El rango de años de radicar en el Municipio fue de 10 a 65 años, con una media de 41.5 años, por años de radicar el 28.20% (110) tiene de 10 a 21 años, el 28.46% (111) tiene de 22 a 32 años, el 21.3% (83) tiene de 31 a 40 años, el 11.3% (44) tiene de 41 a 50 años, el 8.5% (33) tiene del 51 a 60 años y el 3.3% (13) tiene de 61 a 65 años. (Cuadro 14)

Cuadro 14
Encuestados y los años de radicar en el Municipio

Años de radicar	Número de encuestados	%
10 - 21	110	28.20
22 - 32	111	28.46
33 - 43	83	21.29
44 - 54	46	11.80
55 - 65	40	10.25
Media = 41.7	390	100.00

El número de habitantes por vivienda entre los encuestados fue en el 71.02% (277) habitan en sus viviendas hasta 6 personas y en el 28.98% (113) habitan en sus viviendas más de 6 personas.

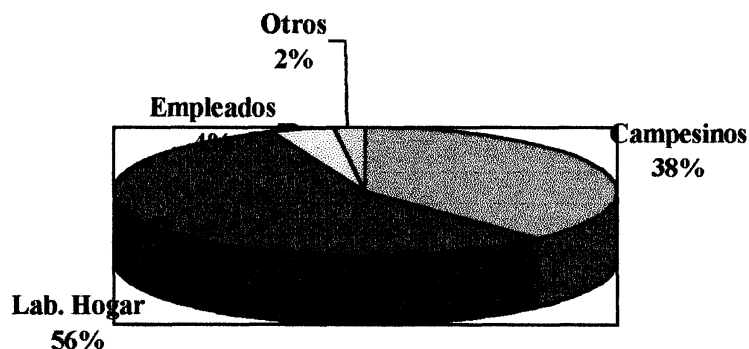
(Cuadro 15)

Cuadro 15
Personas voluntarias según número de habitantes por vivienda

Habitantes por vivienda entre los encuestados	Número de encuestados	%
Hasta 6 habitantes	277	71.02
Más de 6 habitantes	113	28.98
Total	390	100.00

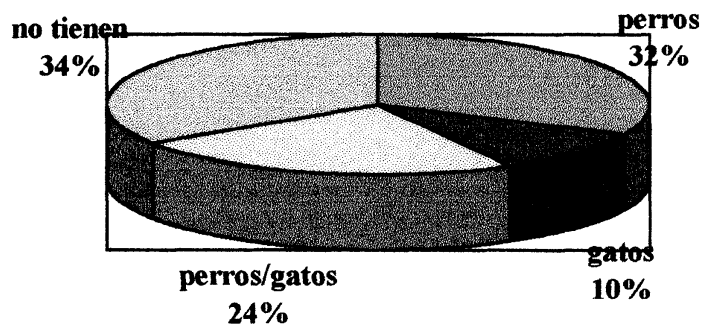
La ocupación de los encuestados fue el 38% (148) fueron campesinos y campesinas, el 56% (216) se dedicaban a las labores del hogar, el 4% (15) fueron empleados u obreros y el 2.0% (12) fueron estudiantes, profesores o trabajadores de salud. (Gráfica 1)

Gráfica 1
Personas voluntarias según ocupación



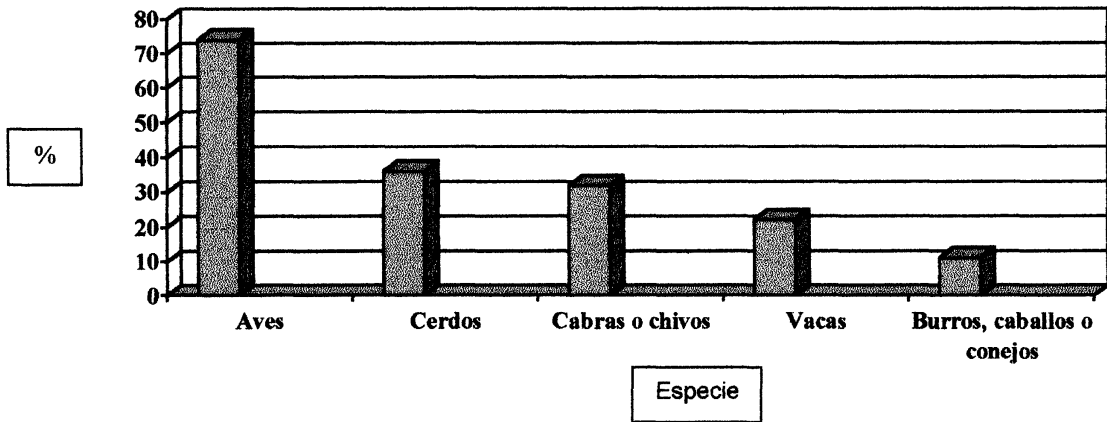
La convivencia con animales domésticos, conviven con perros el 32% (125), el 10% (39) conviven con gatos, el 24% (94) conviven con perros y gatos y el 34% (132) no conviven con animales domésticos. (Gráfica 2)

Gráfica 2
Animales domésticos con los que conviven los encuestados



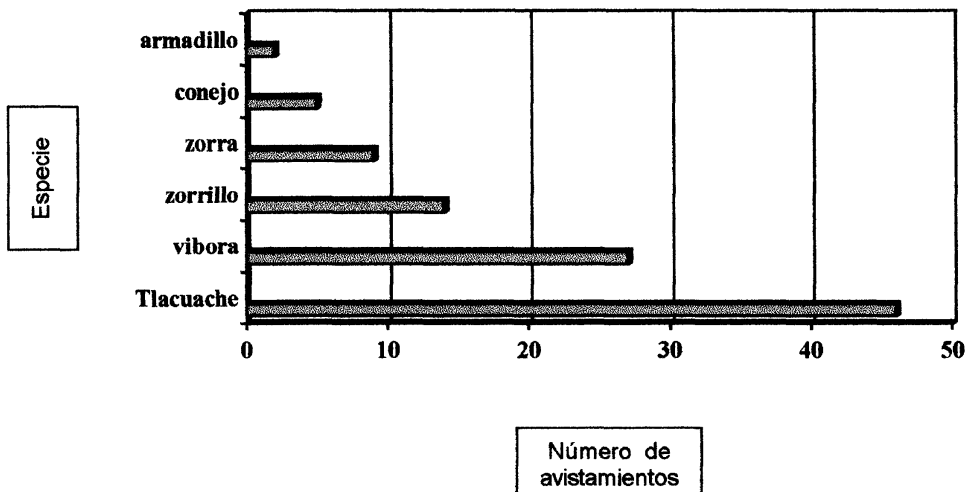
Los encuestados que criaban animales de corral, el 74% (288) criaba pollos, el 36% (140) cerdos, el 32% (125) cabras o chivos, el 22% (85) vacas y el 11% (43) burros, caballos o conejos. (Gráfica 3)

Gráfica 3
Animales de corral que crían los encuestados



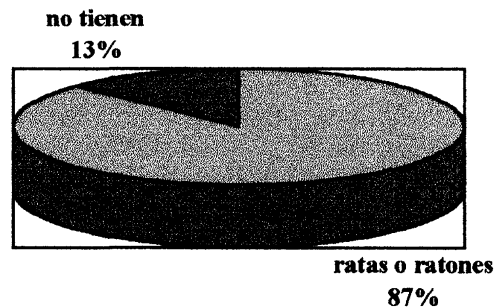
Los animales silvestres que más son avistados merodeando las viviendas de los encuestados son. 46 avistamientos de tlacuaches, 27 de víbora de cascabel, 15 de zorrillos, 9 de zorra y 3 de conejos y armadillos (Gráfica 4)

Gráfica 4
Avistamientos de especie animales silvestre merodeando las viviendas de los encuestados



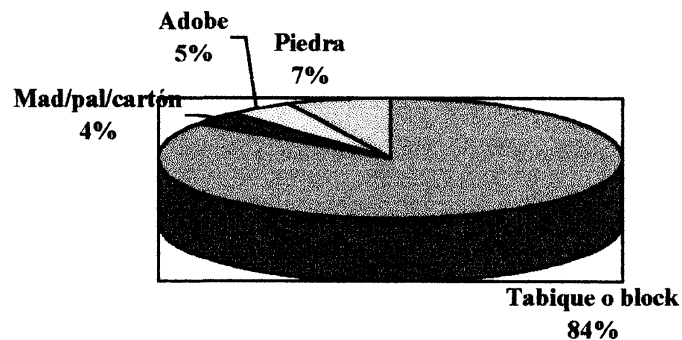
El 87% (339) de los encuestados refirieron ver fauna nociva (ratas o ratones) merodeando sus viviendas y el 13% (51) refirieron no ver fauna nociva merodeando sus viviendas. (Gráfica 5)

Gráfica 5
Fauna nociva merodeando las viviendas de los encuestados



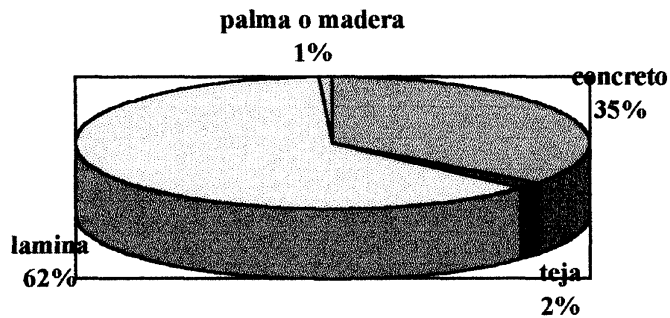
El material con que estaban construidas las paredes de las viviendas de los encuestados fueron: en el 84% (328) fueron de tabique y blocks, en el 5% (19) de adobe, en el 7% de piedra (27) y en el 4% (16) de palma, madera o lámina de cartón. (Gráfica 6)

Gráfica 6
Material de las paredes en las viviendas de los encuestados



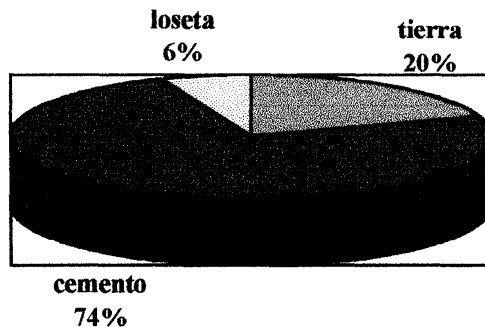
El material con que estaban construidas los techos de las viviendas de los encuestados fueron: en el 35% (136) de concreto, en el 62% (241) de láminas (asbesto, metal o plástico), en el 2% (9) de teja y en el 1% (4) de palma madera o lámina de cartón. (Gráfica 7)

Gráfica 7
Material de los techos en las viviendas de los encuestados



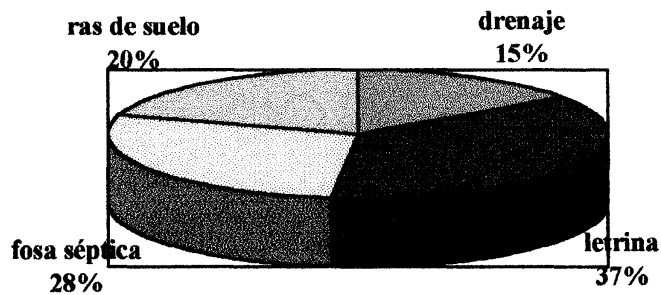
El piso de las viviendas de las personas encuestadas en el 6% (23) fueron de loseta, en el 74% (288) de cemento o firme y en el 20% (79) de tierra. (Gráfica 8)

Gráfica 8
Piso de las viviendas de los encuestados



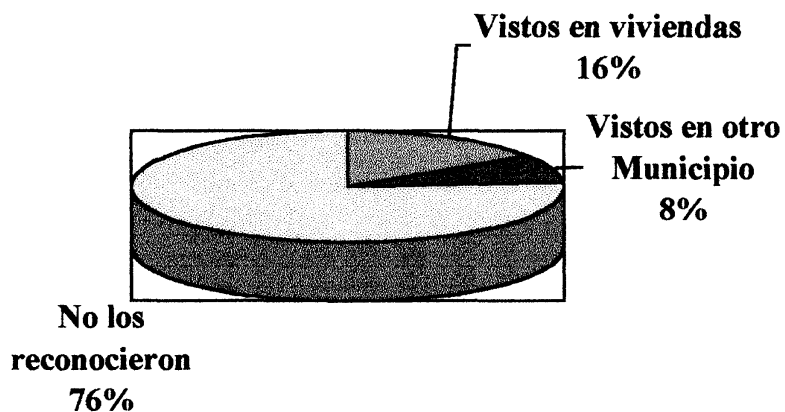
La disposición de excretas en las viviendas de los encuestados fueron a través de drenaje en el 15% (58), en fosa séptica, en el 28% (109) en letrina, en el 37% (145) y en el 20% (78) a ras de suelo. (Gráfica 9)

Gráfica 9
Disposición de las excretas en las viviendas de las personas voluntarias



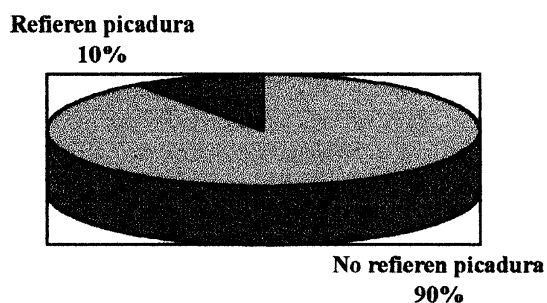
Sólo el 16% (62) de los encuestados reconocieron a los *Triatominos* de muestra y mencionaron que lo habían visto en sus casas o en los corrales de los animales que crían, el 8%(31) los habían visto en otros Municipios cercanos, tales como Cañada Morelos y Quecholac e hicieron referencia muchos de los encuestados a la ciudad de Orizaba, Veracruz. (Gráfica 10)

Gráfica 10
Encuestados que reconocieron a los *Triatominos* (chinchas) y donde los han visto



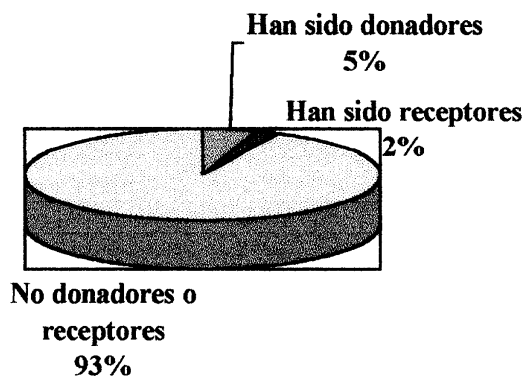
Es importante el hecho de que el 30% (58) de los encuestados de más de 36 años (192) reconocieron a los *Triatomino*s en comparación con los menores de 36 años (192), sólo el 17% (32) las reconocieron. El 10% (39) de los encuestados refirieron haber sido picados por los *Triatomino*s y el 90% (351) refirieron no haber sido picados por los *Triatomino*s. (Gráfica 11)

Gráfica 11
Personas voluntarias que refieren haber sido picados por los *Triatomino*s (chinches)



Sólo el 11% (43) de los encuestados refirieron tener dificultades para deglutir y el 2% (8) refirieron padecer de cansancio y dificultad para respirar.

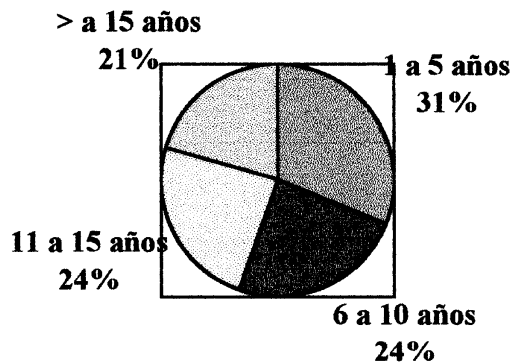
Gráfica 12
Encuestados que refieren historial de donador o de receptor de productos sanguíneos



El 5.12% (20) de los encuestados refirieron tener historial de donador de sangre, el 2.32% (9) de receptores de sangre y el 92.58 % (361) no refirieron tener historial de donador o de haber sido receptores. (Gráfica 12)

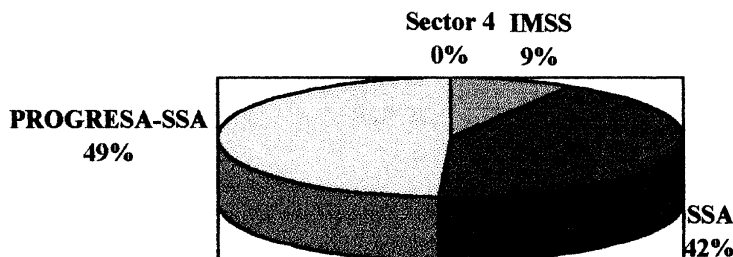
La historia de donación de los encuestados es de 1 a 5 años en el 31% (6), de 6 a 10 años en el 24% (5), de 11 a 15 años en el 24% (5) y de más de 15 años en el 21% (3). (Gráfica 13)

Gráfica 13
Historial de donación de los encuestados



Los servicios de salud a los que asistían los encuestados o programas a los que pertenecían fueron al IMSS el 9% (35), a la SSA el 42% (163) o bien pertenecían al programa PROGRESA-SSA de la SEDESOL el 49% (192) de este 91%. (Gráfica 14)

Gráfica 14
Programa o institución de salud a la que pertenecen o acuden los encuestados



7.2 Determinación de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos

En el INC se uso como prueba tamiz la técnica inmunoenzimática ELISA-INC, como antígeno se empleo extracto crudo soluble de parásitos *T. cruzi* de la cepa NINOA cultivados en medio de LIT y cosechados en fase exponencial; de las 390 muestras analizadas 13 fueron positivas obteniéndose una seroprevalencia a anticuerpos contra *T. cruzi* de 3.33%. En el InDRE se uso como prueba tamiz la técnica de hemaglutinación indirecta HAI-InDRE, como antígeno se empleo extracto crudo soluble de parásitos de *T. cruzi* de 15 aislados de seres humanos y del vector cultivados en medio de LIT y cosechados en fase exponencia, el extracto crudo soluble fue fijado a eritrocitos de pollo; de las 390 muestras analizadas 14 fueron positivas, obteniéndose una

Cuadro 16
Resultados de la determinación de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* empleando pruebas tamiz HAI 1:8 InDRE y prueba tamiz ELISA-INC

FOLIO	EDAD	INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA	INSTITUTO DE REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA
		Prueba tamiz ELISA Dilución 1:200 valor de corte 0.220	Prueba semi cuantitativa HAI > 1:8
008	30	0.103	1:8
166	37	0.298	1:128
213	37	0.817	1:64
218	60	1.702	1:1024
253	27	0.528	N
259	35	1.203	1:1024
278	52	0.454	N
284	32	0.323	1:8
304	30	0.717	1:64
317	54	0.125	1:8
318	54	0.193	1:32
324	46	0.138	1:8
326	28	0.402	1:64
353	38	0.358	1:32
363	45	0.463	1:32
379	59	0.424	N
381	40	0.382	1:64
Promedio Prevalencia	41.41	13/390 = 3.33	14/390 = 3.58

seroprevalencia de 3.58%. La concordancia entre las dos técnicas empleadas solo fue en 10 pruebas positivas para ambas, 4 fueron negativas para ELISA-INC, pero positivas para HAI-InDRE y 3 positivas para ELISA-INC pero negativas para HAI-InDRE. La edad promedio de las encuestadas positivas a anticuerpos contra *T. cruzi* fue de 41.4 años (Cuadro 16)

Entre ambas técnicas fueron detectadas 17 muestras seropositivas a anticuerpos contra *T. cruzi*, obteniéndose una seroprevalencia de 4.35% y límite de confianza de la seroprevalencia de 2.32 a 6.37 %. Se estimó la eficacia de las pruebas tamiz ELISA-INC y HAI-InDRE se recurrió a una tabla de contingencia 2 X 2 como referencia se tomo a las 17 muestras seropositivas detectadas entre ambos institutos. Para ELISA-INC la sensibilidad fue de 76.47%, límite de confianza de sensibilidad de 63.47% a 89.77%, especificidad del 100%, límite de confianza de especificidad de 100%; valor predictivo positivo VP+ de 100% y valor predictivo negativo VP- de 99.19%. Para HAI-InDRE la sensibilidad fue de 82.35%, límite de confianza de sensibilidad de 78.56% a 86.13%, especificidad del 100%, límite de confianza de especificidad de 100%, valor predictivo positivo (VP+) de 100% y valor predictivo negativo (VP-) de 99.30%. También se estimó la concordancia entre las pruebas tamiz ELISA-INC y HAI-InDRE obteniéndose un coeficiente Kappa de 0.73 que equivale a una fuerza de concordancia sustancial. Ya que coincidieron en solo 10 muestras positivas para ambos, 4 fueron negativas para el INC y positivas para el InDRE y 3 negativas para el InDRE y positivas para el INC. (Cuadro 17)

La Norma Oficial Mexicana NOM-EM-001-SSA2 1999 para la vigilancia, prevención y control de enfermedades causadas por vector, ha establecido que para caracterizar casos indeterminados de la tripanosomosis americana, es aquellas personas que sean positivas a anticuerpos contra *T. cruzi* por dos técnicas diferentes y a la vez. (1) Siguiendo este criterio se les realizó a las 17 muestras seropositivas a *T. cruzi* por las pruebas tamiz de ambos institutos otras dos pruebas serológicas.

En el INC se les efectuó la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta IFI-INC que emplea como antígeno parásitos de *T. cruzi* de la cepa NINOA solo 15 muestras fueron positivas de las 17; usando la técnica de Western Blot WB-INC que emplea como antígeno extracto crudo soluble de parásitos *T. cruzi* de la cepa NINOA solo 11 muestras fueron positivas reconocieron el patrón antigénico de la cepa NINOA y 6 muestras no reconocieron ningún patrón de antígenos estructurales, quizá debido al bajo título de anticuerpos presentes en las muestras 008, 166, 317, 318 y 324 no así en la muestra 304;

Cuadro 17
Evaluación de la eficacia y concordancia de las pruebas serológicas tamiz ELISA-INC y HAI-IndRE para la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*

Pruebas Serológicas	Sensibilidad %	Límite de confianza de sensibilidad %	Valor predictivo positivo VP+ %	Especificidad %	Límite de confianza de especificidad %	Valor predictivo negativo VP- %	Prevalencia y Límite de confianza de la prevalencia	Coefficiente Kappa	Fuerza de concordancia
ELISA-INC Dilución 1:200 v.c. 0.241	76.47	63.17 - 89.77	100	100	100	99.19	4.35	0.73	Sustancial
HAI-IndRE > 1:8	82.35	78.56 - 86.13	100	100	100	99.30	2.79 – 5.92		

Cuadro 18

Resultados de la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en encuestados los cuales con dos pruebas serológicas positivas resultaron ser caso indeterminado de trypanosomosis americana

Folio	Edad	INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA Dr. IGNACIO CHAVEZ				INSTITUTO DE REFERENCIA EPIDEMIOLOGICA Dr. MANUEL MARTINES BAEZ			
		ELISA Dilución 1:200 v.c. 0.241	IFI > 1:64	WB Dilución 1: 1,000	Caso Indeterminado	ELISA Dilución 1:50 v.c. 0.220	HAI > 1:8	IFI > 1:32	Caso Indeterminado
008	30	0.103	++	N	NO	0.267	1:8	1:128	SI
166	37	0.298	+	N	SI	0.666	1:128	1:128	SI
213	37	0.817	++	P	SI	1.428	1:64	1:128	SI
218	60	1.702	++	P	SI	2.676	1:1024	1:512	SI
253	27	0.528	+	P	SI	0.205	-	1:32	NO
259	35	1.203	++	P	SI	1.967	1:1024	1:1024	SI
278	52	0.454	+	P	SI	0.350	-	1:64	SI
284	32	0.323	+	P	SI	0.700	1:8	1:128	SI
304	30	0.717	+	N	SI	1.609	1:64	1:128	SI
317	54	0.125	D	N	NO	0.203	1:8	1:32	SI
318	54	0.193	+	N	NO	0.364	1:32	1:64	SI
324	46	0.138	+	N	NO	0.249	1:8	1:128	SI
326	28	0.402	+	P	SI	1.226	1:64	1:128	SI
353	38	0.358	D	P	SI	1.320	1:32	1:128	SI
363	45	0.463	+	P	SI	1.249	1:32	1:128	SI
379	59	0.424	+	P	SI	0.427	-	1:128	SI
381	40	0.382	+++	P	SI	1.132	1:64	1:128	SI
Pruebas		13/390	15/17	11/17	13/17	15/17	14/390	14/17	16/17

al relacionar los resultados de las tres técnicas empleadas ELISA-INC, IFI-INC, WB-INC y aplicando el criterio de la NOM-EM-001-SSA2-1999 fueron detectados 13 casos indeterminados de trypanosomosis americana. En el InDRE se les efectuó la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma. cruzi* con la técnica de inmunofluorescencia indirecta IFI-InDRE empleando como antígeno parásitos de *T. cruzi* de 15 aislados de humanos y del vector 17 muestras fueron positivas y con la técnica inmunoenzimática ELISA-InDRE que empleó como antígeno extracto crudo soluble de parásitos *T. cruzi* de 15 aislados de humanos y del vector solo 15 muestras fueron positivas. Al relacionar los resultados de las tres técnicas empleadas HAI-InDRE, ELISA-InDRE, IFI-InDRE y aplicando el criterio de la NOM-EM-001-SSA2-1999 fueron detectados 16 casos indeterminados de trypanosomosis americana. (Cuadro 18) }

Fueron detectados en total 17 casos de indeterminados de trypanosomosis americana entre ambos institutos, obteniéndose una prevalencia del 4.35% y límite de confianza de la prevalencia de 2.32 a 6.37% para la población en edad productiva del Municipio de Palmar de Bravo.

La evaluación de la concordancia en detectar casos indeterminados de trypanosomosis americana por el INC y el InDRE fue de un coeficiente Kappa 0.82 que equivale a una fuerza de concordancia casi perfecta. (Cuadro19)

Cuadro 19
Evaluación de la concordancia en la detección de casos indeterminado por dos pruebas serológicas positivas en el INC e InDRE

Instituto	Casos indetrmnados	Total de casos indeterminado	Prevalencia %	Límite de confianza de la prevalencia	Coficiente Kappa	Fuerza de concordancia
INC	13	17	4.35	2.32 – 6.39	0.82	Casi perfecta
InDRE	16					

7.3 Resultados de hemocultivos

Se realizaron 4 hemocultivos a cada uno de los 11 casos indeterminados que prosiguieron en el estudio, cada 20 días fueron revisadas cada una de las 4 fracciones de sangre cultivadas en medio de LIT enriquecido con suero fetal bovino, esto se realizo hasta completar 120 días después de este tiempo todas las muestras fueron negativas. (Cuadro 20)

7.4 Resultados de la detección del ADN del parásito empleando el método de la PCR

De 44 fracciones de sangre cultivadas en medio de LIT, 4 de cada uno de los 11 casos indeterminados, en 21 se detecto el ADN del parásito, en las fracciones que contenían sólo

Cuadro 20
Hemocultivos de los casos indeterminados

Folio	HEMOCULTIVO			
	Tubo 1 Fracción de plasma	Tubo 2 Fracción de plasma, paquete de leucocitos y plaquetas	Fracción del paquete de leucocitos y eritrocitos	Fracción del paquete de eritrocitos
213	N	N	N	N
218	N	N	N	N
284	N	N	N	N
317	N	N	N	N
363	N	N	N	N
253	N	N	N	N
259	N	N	N	N
304	N	N	N	N
278	N	N	N	N
318	N	N	N	N
379	N	N	N	N

en 4 muestras fue detectado el ADN del parásito, en 7 de las fracciones compuesta por plasma, paquete de leucocitos y plaquetas, en 4 de las fracciones que contenían paquete de leucocitos y eritrocitos, y en 6 fracciones que contenía solo paquete de eritrocitos. (Cuadro 21)

No se detecto el ADN del parásito en todas las muestras del hemocultivo 317 el cual no fue considerado como caso indeterminado para el INC pero sí por el InDRE, esto se puede deber a un resultado falso positivo emitido por el InDRE o a un falso negativo emitido por el INC o también a una baja parasitemia con la que cursaba la voluntaria en el momento de tomarle la muestra.

Fue detectado el ADN del parásito en 3 de las 4 muestras del hemocultivo 318, pero este no fue considerado como caso indeterminado por el INC y si por el InDRE se puede deber a un resultado falso negativo emitido por el INC, también fue detectado el ADN en 1 de las 4 muestras del hemocultivo 253, pero no fue considerado como caso indeterminado por el InDRE y si por el INC, se puede deber a un falso negativo emitido por el InDRE.

Se detecto el ADN del parásito en 2 de 4 muestras del hemocultivo 213, en 4 de 4 del 218, en 1 de 4 del 259, en 1 de 4 del 284, en 3 de 4 del 304 y en 1 de 4 del 363; además fueron detectados anticuerpos contra *T. cruzi* en estas muestras tanto en las pruebas tamiz y en las confirmativas de ambos institutos Se detectó el ADN del parásito en 3 de 4 muestras del hemocultivo 278, y en 2

Cuadro 21
Fraciones de sangre cultivadas en medio de LIT de los casos indeterminados donde se detecto el ADN del parásito empleando el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa

FOLIO	PCR			
	Tubo 1 Fracción de plasma	Tubo 2 Fracción de plasma con paquete de plaquetas y leucocitos	Tubo 3 Fracción de paquete de leucocitos y de eritrocitos	Tubo 4 Fracción de paquete de eritrocitos
213	-	+	+	-
218	+	+	+	+
253	-	-	-	+
259	-	-	-	+
278	-	+	+	+
284	-	+	-	-
304	+	+	-	+
317	-	-	-	-
318	-	+	+	+
363	-	+	-	-
379	+	-	+	-

Cuadro 22
Relación de pruebas tamiz y de la detección de casos indeterminados con la detección de ADN del parásito por el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa en muestras de hemocultivos.

FOLIO	Prueba tamiz ELISA-INC dilución 1:200 valor de corte 0.241	Casos Indeterminados INC	Prueba tamiz HAI-IndRE > 1 : 8	Casos Indeterminados IndRE	Número de muestras de hemocultivo donde fue detectado el ADN del parásito por PCR
213	0.817	SI	1:64	SI	en 2 de 4
218	1.702	SI	1:1024	SI	en 4 de 4
253	0.528	SI	-	NO	en 1 de 4
259	1.203	SI	1:1024	SI	en 1 de 4
278	0.454	SI	-	SI	en 3 de 4
284	0.323	SI	1:8	SI	en 1 de 4
304	0.717	SI	1:64	SI	en 3 de 4
317	0.125	NO	1:8	SI	en 0 de 4
318	0.193	NO	1:32	SI	en 3 de 4
363	0.463	SI	1:32	SI	en 1 de 4
379	0.424	SI	-	SI	en 2 de 4

de 4 del 379, pero no fueron detectados anticuerpos con *T. cruzi* por la técnica tamiz HAI-InDRE, pero sí por las técnicas confirmativas ELISA e IFI-InDRE, esto se podría deber a una baja sensibilidad de la prueba tamiz HAI-InDRE. (Cuadro 22)

Se evaluó las pruebas serológicas empleadas en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en relación a la detección del ADN del parásito, la sensibilidad de HAI –InDRE fue de 70%, ELISA-InDRE de 90% e IFI-InDRE de 100%; la de ELISA-INC y WB-INC fue de 90% e IFI-INC fue de 100%. La especificidad de las 6 técnicas fue de 100%.

Cuadro 23

Evaluación de las pruebas serológicas en base a la detección del ADN del parásito por el método de la reacción en cadena de la ADN polimerasa en las muestras de hemocultivo

Pruebas serológicas	Sensibilidad %	Especificidad %
ELISA-INC	90	100
WB-INC	90	100
IFI-INC	100	100
HAI-InDRE	70	100
ELISA-InDRE	90	100
IFI-InDRE	100	100

Se evaluó la eficacia del método de la ADN polimerasa efectuada a las muestras de hemocultivo, en base a los casos indeterminados emitidos por ambos institutos y se obtuvo una sensibilidad del 90% y una especificidad del 100%. (Cuadro 24)

Cuadro 24

Evaluación del método de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) considerando a los casos indeterminados de trypanosomosis americana detectados por ambos institutos

Método	Sensibilidad %	Especificidad %
Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)	90	100

7.5 De los electrocardiogramas

Se les efectuó un electrocardiograma de 12 derivaciones a 10 casos indeterminados de trypanosomosis americana detectados en este estudio, a los 10 les fue detectado el ADN del parásito por el método de la PCR, ninguno manifestó signos de disnea, no fumadores y sin sobrepeso; 5 de estos casos indeterminados presentaron alteraciones electrocardiográficas, presentando las voluntarias 213 y 363 bloqueo de rama derecha avanzado su edad de 37 y 45 años, ambas presentaron un título alto de anticuerpos y baja parasitemia 2+ y 1+ respectivamente, la voluntaria

278 presento isquemia antero-septal subepicardica, bajo título de anticuerpos y alta parasitemia 3+, la voluntaria 284 presento crecimiento auricular izquierdo, alto título de anticuerpos y baja parasitemia 1+ y la 304 presento onda T aplastada, alto título de anticuerpos y alta parasitemia 3+.

Los otros 5 casos indeterminados que no presentaron alteraciones electrocardiográficas, a los 5 les fue detectado el ADN del parásito, ninguna presento signos de disnea, no fumadores y sin sobrepeso; la voluntaria 218 de 60 años presento el más alto título de anticuerpos y la más alta parasitemia 4+, la voluntaria 253 de 27 años tuvo un título regular de anticuerpos y baja parasitemia 1+, la voluntaria 259 de 35 años tuvo un alto título de anticuerpos y baja parasitemia 1+, la 318 de 54 años tuvo un bajo título de anticuerpos y alta parasitemia 3+ y la 379 de 59 años tuvo regular título de anticuerpos y baja parasitemia 2+. (Cuadro 25)

El grupo control de personas negativas a anticuerpos contra *T. cruzi* fueron relacionadas con la edad con el grupo de casos indeterminados, ninguno presentó síntomas de disnea, no fumadores y ninguno con sobrepeso,. De 13 personas negativas a anticuerpos contra *T. cruzi* solo 3 resultaron con alteraciones electrocardiográficas, la voluntaria 296 de 44 años presento síndrome Long Ganon Levin, las voluntarias 210 y 249 de 35 y 55 años respectivamente ambas presentaron QT largo; la edad promedio de las voluntarias que presentaron alteraciones electrocardiográficas fue de 38.7 años y la de las que no presentaron alteraciones electrocardiográficas fue de 44.2 años (Cuadro 26)

7.6 De la captura e identificación de los *Triatomas*

Se efectuaron 3 colectas de Octubre del 2000 a Junio de 2001, en 5 localidades donde hubo prevalencia de casos indeterminados de trypanosomosis americana en humanos y en 3 localidades donde no se detectó prevalencia. En la localidad de Cuacnopalan se obtuvo un índice de infestación del 1.51% (1/66 viviendas habitadas); en La Purísima del 3.84% (1/26); en Palmar de Bravo del 1.66% (1/60), en San Miguel Xaltepec del 1.66% (1/62); en Nazareno del 5.00% (1/20) en donde fue detectado un adulto hembra y 7 huevos que en el laboratorio eclosionaron naciendo 7 ninfas. En las localidades de Bellavista, Cuesta Blanca y Tehuitzo no se capturaron *Triatomins*.

Se puedo observar que se capturaron *Triatomins* en las localidades que se encuentran a una altitud de 2,150 a 2,230 m/nm y no fueron capturados en las localidades que están a una altitud de 2,260 a 2,400 m/nm y en las cuales tampoco detectamos prevalencia en humanos.

El índice de dispersión nos indica el por ciento de localidades donde existen los *Triatomins* en el área del Municipio estudiada, que abarco a 8 localidades y este índice fue del 62.5%. Además se obtuvo el índice de colonización del área que fue del 40.0%. (Cuadro 27)

Cuadro 25
Relación de los electrocardiogramas con la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* con 4 técnicas serológicas y la detección del ADN del parásito por la PCR

Folio	Edad	ELISA INC Dilución 1:200 v.c. 0.241	WB INC Dilución 1:1,000	IFI INC >1:64	ELISA InDRE Dilución 1:50 v.c. 0.220	HAI InDRE >1:8	IFI InDRE > 1:32	PCR				Electrocardiograma
								Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	
213	37	0.817	P	++	1.428	1:64	1:128	-	+	+	-	Bloqueo de rama derecha avanzado
278	52	0.454	P	+	0.350	N	1:64	-	+	+	+	Isquemia antero-septal subepicardica
284	32	0.323	P	+	0.700	1:8	1:128	-	+	-	-	Crecimiento auricular izquierdo
304	30	0.717	N	+	1.609	1:64	1:1 28	+	+	-	+	Onda T aplastada
363	45	0.463	P	+	1.249	1:32	1:128	-	+	-	-	Bloqueo de rama derecha avanzado
218	60	1.702	P	+	2.676	1:1024	1:512	+	+	+	+	Normal
253	27	0.528	P	+	0.205	N	1:32	-	-	-	+	Normal
259	35	1.203	P	+	1.967	1:1024	1:1024	-	-	-	+	Normal
318	54	0.193	N	+	0.364	1:32	1:64	-	+	+	+	Normal
379	59	0.424	P	+	0.427	N	1:128	+	-	+	-	Normal

T1 plasma; T2 plasma con paquete de plaquetas y leucocitos; T3 paquete de leucocitos y eritrocitos; T4 paquete de ritrocitos

Cuadro 26

Electrocardiogramas realizados al grupo control de voluntarios negativos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*

Grupo control de encuestados negativos a anticuerpos contra <i>T. cruzi</i>			
Folio	Edad	ELISA D.O	Electrocardiograma
210	35	0.041	QT largo
211	31	0.050	N
217	27	0.038	N
221	38	0.054	N
228	45	0.046	N
233	30	0.054	N
236	37	0.034	N
246	56	0.142	N
249	55	0.112	QT largo.
251	60	0.042	N
252	58	0.059	N
294	46	0.071	N
296	44	0.063	Síndrome Long Ganon Levin

Cuadro 27

Indicadores entomológicos recomendados por la OPS / OMS aplicados a las localidades del Municipio de Palmar de Bravo, Puebla.

Localidad	Altitud (m/nm)	Número de casas con <i>Triatomino</i>s /casas sin <i>Triatomino</i>s	Índice de infestación (II) %	Índice de dispersión del área (ID) %	Índice de colonización (IC)%
Cuacnopalan	2,230	1/66	1.51	62.5	40.00
La Purísima	2,180	1/26	3.84		
Palmar de Bravo	2,180	1/60	1.66		
San Miguel Xaltepec	2,150	1/ 62	1.62		
Jesús Nazareno	2,150	1/20	5.00		
Cuesta Blanca	2.380	0/29	0.00		
Bellavista	2,260	0/19	0.00		
Tehuizto	2,380	0/30	0.00		

Índice de infestación: Número de casas con *Triatomino*s / número total de casas estudiadas * 100

Índice de dispersión: Número de localidades con *Triatomino*s / número total de localidades estudiadas * 100

Índice de colonización: Número de casas con ninfas de *Triatomino*s / número de casas positivas a *Triatomino*s * 100

Los *Triatomins* capturados en sitios intradomiciliarios en la localidades de San Miguel Xaltepec, Jesús Nazareno, Palmar de Bravo y Cuacnopalan fueron clasificados como *Triatoma barberi*; los capturados en sitios peridomiciliarios en la localidad de La Purísima fueron clasificados como *Triatoma pallidipennis*. En los *Triatomins* capturados no se observaron parásitos de *T. cruzi* en sus heces fecales por lo que el índice de infestación natural fue del 10 %. (Cuadro 28)

Cuadro 28
Clasificación de los *Triatomins* capturados en el Municipio de Palmar de Bravo

Localidad	<i>Triatomins</i>	Índice de infestación natural %
La Purísima	<i>Triatoma pallidipennis</i>	0.00
San Miguel Xaltepec	<i>Triatoma barberi</i>	0.00
Jesús Nazareno	<i>Triatoma barberi</i>	0.00
Palmar de Bravo	<i>Triatoma barberi</i>	0.00
Cuacnopalan	<i>Triatoma barberi</i>	10.00

Índice de infección natural = número de *Triatomins* con *T. cruzi* / número de *Triatomins* estudiados * 100

7.7 De la determinación de anticuerpos séricos contra *Trypanosoma cruzi* en *Canis familiaris*.

Se tomaron muestras de sangre a 64 *Canis familiaris* mestizos y domésticos, durante 2 días de una semana de vacunación antirrábica canina en abril del 2000, en las 5 localidades donde hubo prevalencia de casos indeterminados de trypanosomosis americana en humanos y a 30 *Canis familiaris* mestizos y domésticos de 3 localidades donde no se detectó prevalencia en humanos. Se realizó la determinación de anticuerpos séricos contra *T. cruzi* a los 94 *Canis familiaris*, empleando la técnica de HAI-IndRE tamiz 1:8 y HAI-IndRE semi cuantitativa, resultando 10 *Canis familiaris* positivos, 5 a la dilución 1:16, 4 a la dilución 1:32 y 1 a la dilución 1:64.; obteniéndose una prevalencia del 10.63%. Los 10 *Canis familiaris* positivos, fueron de 4 de las 5 localidades donde se detectó prevalencia de casos indeterminados de trypanosomosis americana en humanos.

Se pudo observar en este estudio que la prevalencia a anticuerpos contra *T. cruzi* en reservorios domésticos fue más del doble que la prevalencia de casos indeterminados en humanos, por lo este resultado nos sugirió que los *Canis familiaris* son reservorios importantes del parásito *Trypanosoma cruzi*. (Cuadro 29)

7.8 De la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en equinos

Se tomaron muestras de sangre a 12 burros, 4 caballos los cuales eran empleados para transportar paja sobre su lomo, del campo de labor a las viviendas de sus dueños, en las localidades donde se detecto prevalencia de casos indeterminados de trypanosomosis americana, en humanos, consideramos que el cargamento de paja era un factor de riesgo para que estos equinos fueran reservorios de *Trypanosoma cruzi*, al realizar la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* por la técnica tamiz 1:8 de HAI-InDRE, las 16 muestras de los equinos fueron negativas. (Cuadro 29)

Cuadro 29
Seroprevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en reservorios domésticos como *Canis familiaris*, porcinos y equinos

Especie	Número	Prevalencia %
<i>Canis familiaris</i>	94	10.70
Equinos	16	0.00
Porcinos	8	0.00

7.9 De la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en porcinos

Se tomaron muestras de sangre a 8 porcinos criados en el transpatio de viviendas habitadas, en las localidades donde se detecto prevalencia de casos indeterminados de trypanosomosis americana en humanos; los corrales estaban en condiciones muy precarias, contruidos de paredes de piedra, adobe o madera y techos de tablas de madera, paja o bien laminas de cartón y con piso de tierra, además de estar estos porcinos hacinados, por lo que consideramos que estas condiciones en la que se encontramos a los porcinos, eran factores de riesgo para ser reservorios del parásito *T. cruzi*. Al realizar la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi* por la técnica tamiz 1:8 de HAI-InDRE, las 8 muestras de los porcinos fueron negativas. (Cuadro 28)

7.10 De la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en animales silvestres

Los habitantes de localidades que viven cerca de los cerros, avistan animales silvestres que merodean de vez en cuando sus viviendas, en la porción del Municipio que esta a 2,380 a 2,500 metros sobre el nivel del mar se avistan serpiente, zorra, zorrillo, comadreja, conejo y tlacuache, en la porción del Municipio que se encuentra entre los 2,150 a 2,180 metros sobre el nivel del mar son avistados principalmente serpiente, conejo y tlacuache. Se capturaron 3 zorrillos, 1 zorra, 2 tlacuaches y 5 conejos, los cuales fueron posteriormente liberados, después de habérseles tomado una muestra de sangre. Se determino a los 9 animales silvestres anticuerpos séricos contra *T.*

cruzi con la técnica de HAI-INDRE tamiz 1:8 , resultando solo 2 muestras de éstos positivas.

(Cuadro 30)

Cuadro 30
Seroprevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en reservorios silvestres avistados por los habitantes del Municipio de Palmar de Bravo

Especie	Número	HAI-INDRE
Zorrillos	3	-
Zorra	1	-
Tlacuache	2	-
Conejo silvestre	5	(2+) 1/16

7.11 Relación de los factores bióticos y abióticos con la determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en personas voluntarias que con dos pruebas serológicas positivas, resultaron ser caso indeterminado de trypanosomosis americana.

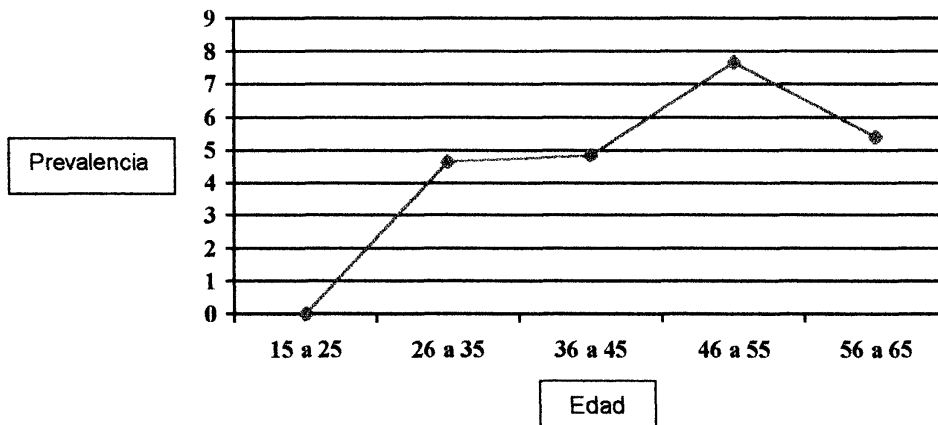
Ji cuadrada para tabla de contingencia 2 x 2 y si el valor de Ji cuadrada es mayor o igual a 3.84, la probabilidad de que las diferencias encontradas sean debidas al azar es igual o menor de 0.05, y será razonable concluir que ser caso indeterminado no es independiente de la exposición considerada o bien el factor biótico o abiótico es determinante para ser caso indeterminado. (anexo 5)

Cuadro 31
Factores bióticos y abióticos determinantes para ser caso Trypanosomosis americana indeterminado en el Municipio de Palmar de Bravo

VARIABLE	Valor de Ji cuadrada	Valor de p	Riesgo Relativo RR
Edad	46.25	0.0000000	
Años de radicar	51.52	0.0000000	
Viviendas con paredes de madera, palma o cartón	10.15	0.0014	5.76
Habitar en localidades < 2,250 metros sobre el nivel del mar	9.03	0.0026	
Habitar en localidades donde fueron capturados <i>Triatominos</i>	9.03	0.0026	
Viviendas con techo palma, madera o cartón	6.09	0.0131	8.06
Ocupación campesino	8.06	0.0106	3.88
Criar cerdos de traspatio	5.40	0.0385	3.00
Pertenecer al programa PROGRESA-SSA	4.20	0.0090	3.52

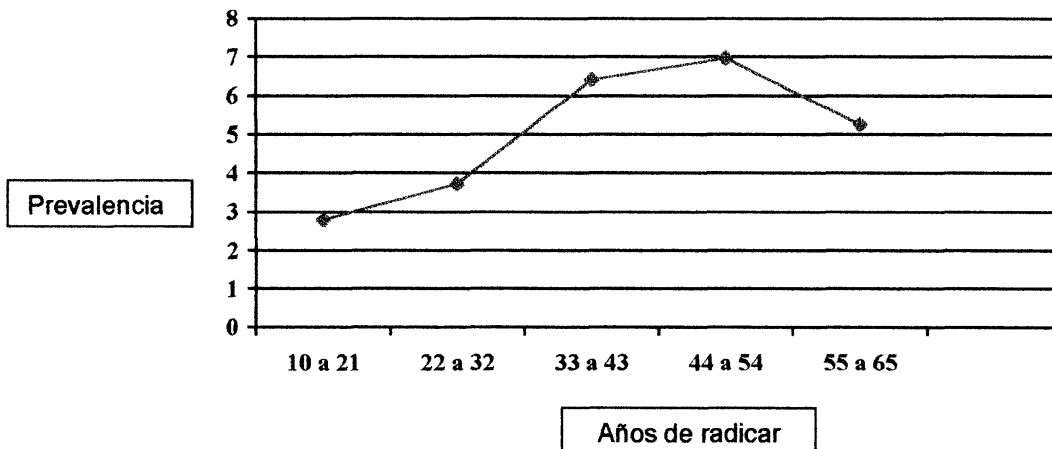
La edad $p = 0.000000$. El riesgo de ser caso indeterminado en este estudio, aumenta con la edad, así de los 15 a 25 años la prevalencia de ser caso indeterminado fue del 0.0%; de 26 a 35 años fue del 4.65%; de 36 a 45 años fue del 4.85%; de 46 a 55 años fue del 7.69% y de 56 a 65 años fue del 5.40%. (Gráfica 17) La prevalencia entre los 26 a 65 años fue de 5.59%

Gráfica 17
Prevalencia de casos indeterminados y la edad de los encuestados



2) Años de radicar, $p = 0.0000$. A mayor años de radicar, mayor prevalencia de ser caso indeterminado, ya que de 10 a 21 años de radicar la prevalencia fue del 2.80 %; de 22 a 32 años fue del 3.73 %, de 33 A 43 años fue del 6.41%, de 44 a 54 años fue del 6.97% y del 55 65 años fue del 5.26 % (Gráfica 18)

Gráfica 18
Prevalencia de casos indeterminado y los años de radicar en el Municipio



- 3) **Habitar en viviendas con paredes de paja, madera o cartón** $p = 0.0186$. De las 14 viviendas con esta característica en nuestro grupo de estudio, en 3 de estas habitaron personas que fueron casos indeterminados, se obtuvo una prevalencia del 21.42 % y un riesgo relativo de 1:5.76, lo que nos indicó, que de 1 persona que se infectó sin tener este factor de riesgo, existen 6 que se infectarían por tener este factor de riesgo. De las 318 viviendas con paredes de ladrillo o Block, en 14 de ellas habitaron voluntarios que fueron casos indeterminados, se obtuvo una prevalencia del 4.40 % y un riesgo relativo 1:1. Lo que se puede observar, que si bien el tener viviendas con paredes de paja, de láminas de cartón o de madera es un riesgo alto y tradicionalmente se tiene el conocimiento de que los *Triatomino*s prefieren anidar en este tipo de viviendas o bien en viviendas con paredes de piedra o de adobe; nosotros pudimos constatar al relacionar el factor abiótico (viviendas con paredes de ladrillo o block) con la prevalencia de casos indeterminados y observar durante la búsqueda de *Triatomino*s en este estudio, que los *Triatomino*s se han adaptado a anidar en viviendas con paredes de ladrillo o block, ya que en las 3 viviendas donde fueron capturados *Triatomino*s, fueron viviendas con paredes de ladrillo o block y éstas estaban repelladas.
- 4) **El habitar en las localidades que se encuentran a una altura menor de 2,250 metros sobre el nivel del mar** $p = .0026$ Ya que se obtuvo una prevalencia de casos indeterminados del 6.96 % entre los 244 voluntarios que habitaban en las 5 localidades que están a una altura de 2,150 a 2,230 metros sobre el nivel del mar, siendo las localidades de Palmar de Bravo, Cuacnopalan, San Miguel Xaltepec, La Purísima y Nazareno. En comparación con la prevalencia que se obtuvo del 0.00% entre los 146 voluntarios que habitaban en las 10 localidades que se encuentran a una altura de 2,260 a 2,500 metros sobre el nivel del mar, siendo las localidades de Cuesta Blanca, Amozoquillo, Cuesta Chica, San Francisco Piletas, Tehuitzo, Guadalupe Piletas, Los Reyes Altamira, San José Bellavista y las Encrucijadas Primera y Segunda Sección.
- 5) **El habitar en localidades que durante este estudio fueron capturados *Triatomino*s** $p = 0.0026$. Ya que de las 244 voluntarios que habitaban en las 5 localidades donde se capturaron *Triatomino*s, 17 fueron casos indeterminados, obteniéndose una prevalencia del 6.96%. En las 4 localidades donde no se capturaron *Triatomino*s, de 68 voluntarios se obtuvo una prevalencia del 0.0%.

- 6) **Habitar en viviendas con techo de paja, madera o lámina de cartón** $p = 0.0131$. De las 3 viviendas con esta característica en nuestro grupo de estudio, en una de ellas habito 1 encuestado que fue caso indeterminado, se obtuvo una prevalencia del 33.33 % y un riesgo relativo de 1:9 lo que nos indicó que de 1 persona que se infecto sin tener este factor de riesgo, existen 9 que se infectarían por habitar en una vivienda con ésta característica. En este estudio de 233 encuestados que habitaron en viviendas con techos de láminas de asbesto, metálicas o de plástico, 9 fueron casos indeterminados obteniéndose una prevalencia del 3.86% y de 138 encuestados que habitaron en viviendas con techos de concreto, 7 fueron casos indeterminados, obteniéndose una prevalencia del 5.07%. En este estudio también fue posible observar que en las viviendas donde fueron capturados *Triatominos*, 2 fueron de techo de láminas de asbesto y 1 de techo de concreto repellido. A pesar del mejoramiento de las viviendas que se ha llevado a cabo en este Municipio, el vector ha ido adaptándose a convivir con los humanos dentro de sus viviendas, ya que los humanos y reservorios domésticos y peri domésticos somos su fuente de alimentación.
- 7) **Tener como ocupación campesino** $p = 0.0049$. De 149 encuestadas que tienen estas ocupaciones, 12 fueron casos indeterminados y se obtuvo una prevalencia del 8.05 % y un riesgo relativo 1:388, lo que nos indicó, que de 1 persona que se infecta sin tener este factor de riesgo, existen 4 que se infectarían por ser campesinas en este Municipio. Esto se debe a la situación socioeconómica de las encuestadas, sus viviendas son precarias y tienen que realizar labores del campo ya sea colaborando en las tierras de ejido o bien como jornaleras, donde están más expuestas a los *Triatominos* hematófagos de vida libre y a la vez atender sus hogares lo que implica almacenar paja y productos agropecuarios en los patios de sus casas, además de estar en contacto con animales de traspatio; la gran mayoría de estas mujeres pertenecen a los grupos del programa PROGRESA-SSA de la SEDESOL
- 8) **Criar cerdos de traspatio** $p = 0.0385$. De 148 encuestados que han criado cerdos de traspatio, 11 fueron casos indeterminados de trypanosomosis americana, obteniéndose una prevalencia del 7.38 %; en contra de 242 que no han criado cerdos de traspatio, 6 fueron casos indeterminados, obteniéndose una prevalencia del 2.47%. Este factor biótico se puede deber a que a los cerdos se les tiene en encierro y hacinamiento permanente, y los materiales con el que están construidos las paredes y techos de sus corrales, por lo general fueron de materiales tales como madera, troncos, piedra, adobe, palma, láminas de

cartón y el piso por lo general de tierra; creando el medio ambiente ideal para el anidamiento de los *triatominos*. a pesar de ello en la búsqueda de éstos, solo se capturaron pocos espécimen en un corral, en este estudio se les tomo muestra sanguínea a 8 cerdos y se les determinó anticuerpos contra *T. cruzi* , empleando la técnica de HAI-InDRE tamiz 1:8, pero las 8 muestras fueron negativas, se requiere de un tamaño de muestra más amplio, ya que en las localidades donde hubo prevalencia en humanos, se tiene conocimiento de que la crianza de cerdos sigue a la cría de pollos. También es importante mencionar que de los encuestados que refirieron conocer y haber visto a los *Triatominos* en el entorno peri doméstico, mencionaron a los corrales de los cerdos, principalmente los de la localidad de la Purísima, donde fueron capturados especimenes de *T. pallidipennis* para ellos conocidas como campiotas.

- 9) **El pertenecer al programa PROGRESA $p = 0.0090$** De 192 personas de este programa, 13 de ellas fueron casos indeterminados, obteniéndose una prevalencia del 6.77% y de 198 personas que no pertenecen a este programa 4 fueron casos indeterminados, obteniéndose una prevalencia del 2.02 %. }Al realizarse el mismo tipo de análisis estadístico, pero comparando a las personas voluntarias en este estudio que no están dentro del programa PROGRESA con las que sí lo están, se obtuvo lo siguiente: Las personas que pertenecen al programa de PROGRESA tienen mayor grado de hacinamiento $p = 0.0023$; habitan en las pocas casa con paredes de paja, madera o láminas de cartón $p = .0005$; más de las dos terceras partes habitan en viviendas con techo de láminas de asbesto o metálicas $p = .0019$; la tercera parte habita en viviendas con piso de tierra $p = .00000032$; las dos terceras partes de sus viviendas tienen fosa sépticas $p = .00022$; dos terceras partes conviven con más de un *Canis familiaris* $p = .0013$; en el 90% de sus viviendas se refiere la presencia de fauna nociva como ratas o ratones $p = .026$.

8. DISCUSIÓN

El Municipio de Palmar de Bravo tiene un grado de marginalidad alto y en un análisis de priorización por el método de Hanon modificado por Julio Freck sus principales problemas de salud son las típicas enfermedades llamadas sociales la desnutrición, enfermedades infecciosas intestinales, enfermedades respiratorias agudas con sus complicaciones, cirrosis hepática y afecciones en el período perinatal, (49) la trypanosomosis americana en las zonas reconocidas como endémicas esta relacionada con este tipo de enfermedades y preferentemente en el ámbito rural. (4, 10)

En el anterior contexto realizamos la determinación de la prevalencia a anticuerpos contra *T. cruzi* en humanos e identificamos los factores bióticos y abióticos que la determinan. La prevalencia de anticuerpos contra *T. Cruzii* en humanos en los estudios realizados en México se ha observado que la prevalencia ha estado en función del tipo de muestreo, el tamaño de muestra considerando o no datos oficiales de población de la localidad en estudio, del grupos étnico y del ámbito rural, sub urbano o urbano. (18, 24, 35 - 41) En este estudio el tamaño de muestra se obtuvo a partir de la población de edad productiva existente en el año 2000 en el MPB; las encuestas, una realizada en el estado de Jalisco (39) y la encuesta nacional de seroepidemiología ENSE consideraron los datos oficiales de población de las localidades estudiadas, aunque la ENSE falló en no estudiar más ampliamente el ámbito rural del país; (18) efectuamos un muestreo aleatorio simple por lo que nuestra muestra de población fue homogénea y representativa de cada una de las 15 localidades estudiadas en este municipio, sin duda alguna podemos decir que es el municipio rural con más localidades estudiadas con respecto a la seroprevalencia a *T. cruzi* en humanos realizada a la fecha.

Dependiendo de la técnica serológica y el antígeno empleado en la detección de anticuerpos séricos contra *T. cruzi*, va ha estar influenciado el valor de la prevalencia; (18, 24, 35 - 41) utilizamos seis técnicas serológicas diferentes, 3 del INC que empleó como antígeno a la cepa Ninoa (11) y 3 del InDRE que empleó como antígeno a 15 cepas mexicanas 7 de aislados de humanos y 8 del vector. (12) A las 390 muestras se les detectaron anticuerpos contra *T. cruzi* con las técnicas tamiz INC-ELISA y HAI-InDRE detectándose entre ambas técnicas 17 muestras positivas, la eficiencia de estas técnicas como sensibilidad, especificidad, límite de confianza de sensibilidad y especificidad, VP+ y VP-, estuvieron dentro de un rango aceptable; la concordancia entre las técnicas tamiz fue de un coeficiente Kappa de 0.73 y las diferencias observadas se debieron al tipo

de antígeno empleado, al método de preparación que se le dio a los antígenos, las diluciones hechas a las muestras séricas en cada una de las técnicas y al tipo de técnica.

.Aplicando los criterios establecidos por la NOM-EM-001-SSA2-1999 ⁽¹⁾ para caracterizar a los casos indeterminados de la trypanosomosis americana, a cada una de las 17 muestras en el INC se les efectuó también IFI-INC y WB-INC detectándose 13 casos indeterminados; las 11 muestras que fueron positivas por WB-INC reconocieron el patrón antigénico de la cepa Ninoa y el doblete de 81 Kd característico de las cepas mexicanas Agripina, Cocula y Filadelfia; ⁽¹³⁾ en el InDRE a las 17 muestras se les efectuó también ELISA-InDRE e IFI-InDRE detectándose 16 casos indeterminados. Entre ambos institutos detectaron 17 casos indeterminados obteniéndose una prevalencia de 4.35% y considerando la variabilidad biológica el límite de confianza de esta prevalencia fue de 2.32 a 6.36 %; la evaluación de la concordancia para detectar casos indeterminados entre el INC e InDRE fue de un coeficiente Kappa de 0.88 una concordancia casi perfecta, estos resultados aseguran una alta confiabilidad en el diagnóstico serológico de la trypanosomosis americana por parte del INC y del InDRE. La concordancia entre las pruebas de diagnóstico serológico anteriormente ha sido llevado a cabo entre ambos institutos, obteniéndose un índice Kappa de 0.83 con sueros de pacientes ya conocidos de ser positivos o negativos a anticuerpos contra *T. cruzi*. ⁽²⁹⁾

En el INC realizamos la detección del ADN del parásito en 44 muestras de hemocultivos sembrados en medio de LIT de 11 casos indeterminados 4 muestras de cada uno de estos, por el método de PCR empleando los oligonucleótidos *NKS1* y *NKS2* (23 pb), ⁽¹⁴⁾ el ADN del parásito fue detectado en 21 de 44 muestras y estuvo presente en todas las fracciones de sangre, en el plasma, paquete de leucocitos, de plaquetas o de eritrocitos. Se evaluó la eficacia del método de la PCR en base a los 11 casos indeterminados emitidos por ambos institutos y que quisieron seguir participando en el estudio, obteniéndose una sensibilidad del 91% y especificidad del 100%, lo que le confiere a este método ser una herramienta sumamente útil en la detección del parásito, ya que las 44 muestras de hemocultivos fueron negativas al parásito cuando fueron observadas al microscopio; en un anterior estudio realizado por el mismo instituto en fracciones de las unidades de sangre de donadores positivos a dos pruebas serológicas la sensibilidad de la PCR fue de 50% ⁽³⁴⁾, aunque en este último estudio nuestro resultado obtenido es semejante a los de otros estudios también basados en la específica ampliación del ADN de minicírculos de cinetoplasto del parásito; el realizado en una zona endémica del sureste de Brasil donde se emplearon a los oligonucleótidos *121* y *122* (27 pb) y se concluyó que la sensibilidad de la PCR fue de 96.5 a 100% en comparación con el diagnóstico serológico ⁽¹⁵⁾, aunque la sensibilidad puede variar dependiendo del área endémica estudiada en ese país ⁽¹⁶⁾ en otro fueron comparados xenodiagnósticos y diagnóstico serológico de chagásicos crónicos la sensibilidad de la PCR fue de

100%. (17) Además, observamos que los títulos de anticuerpos contra *T. cruzi* en los sueros de los casos indeterminados en los cuales en sus muestras de hemocultivo fue detectado el ADN del parásito estuvieron en el rango de DO de 0.203 a 2.676 y se observó el siguiente comportamiento a un alto título de anticuerpos hubo menor detección de ADN, a un bajo título de anticuerpos mayor detección de ADN o bien título alto de anticuerpos y mayor detección de ADN, esto podría deberse a la variabilidad biológica, incluida la respuesta inmune en el binomio huésped-parásito. La probabilidad de falsos positivos por reacciones cruzadas con el género *Leishmania*, y las especies *Trypanosoma rangeli* y *Toxoplasma gondii* pudiera quedar descartada en las pruebas serológicas empleadas por el INC y el InDRE. Estos resultados nos sugiere que el parásito pudiera estar en circulación de la mayoría de las personas positivas a una prueba, en los casos indeterminados detectados por dos pruebas serológicas positivas con o sin sintomatología. En los electrocardiogramas de 12 derivaciones efectuados a 10 casos indeterminados, en 5 se observaron alteraciones electrocardiográficas observándose en 3 alteraciones que implican al sistema de conducción (2 con bloqueo de rama derecha avanzado y 1 con onda T aplastada), los otros 2 que no lo implican (1 con crecimiento auricular izquierdo y 1 con isquemia antero-septal subepicárdica); los otros 5 casos indeterminados no presentaron alteraciones electrocardiográficas, observándose con respecto al nivel de parasitemia y el título de anticuerpos que presentaron los 10 casos indeterminados, no se observó diferencia alguna entre aquellos que presentaron alteraciones electrocardiográficas y los que no las presentaron. En el grupo de negativos a dos pruebas tamiz también se presentaron alteraciones que implicaron al sistema de conducción (2 con QT largo) y 1 que no lo implica (Síndrome de Long Ganon-Levine); pero es importante mencionar que las alteraciones electrocardiográficas que implican al sistema de conducción observadas en el grupo que las presentó, han sido observadas en otros estudios realizados en México; (24 y 38) sin embargo, se tiene la experiencia en Brasil de que la enfermedad de Chagas presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas, incluso al calificar niveles de parasitemia, dependiendo de la región endémica bajo estudio. (51)

La altitud fue una característica geográfica del Municipio que influyó en la prevalencia este resultado ser un factor abiótico determinante para ser positivo a anticuerpos contra *T. cruzi* $p = 0.0032$, la prevalencia de casos indeterminados entre 244 voluntarios que habitaban en 5 localidades que estuvieron a una altitud de 2,150 a 2,230 msnm fue de 6.96%, y en los 146 voluntarios que habitaban en 10 localidades que están a una altitud de 2,270 a 2,500 msnm fue del 0.00%; la mayoría de las encuestas seroepidemiológicas realizadas y publicadas en México sobre la trypanosomosis americana han sido en localidades que están a menos de 2,000 msnm. (18, 24, 35 - 41) esta es la primera encuesta realizada en que las 15 localidades estudiadas tuvieron una altitud de más de 2,150 msnm.

El habitar en localidades donde fueron capturados *Triatomino*s fue un factor biótico determinante $p = 0.0032$ la prevalencia fue del 6.96 % entre 244 voluntarios que habitaban en las 5 localidades donde fueron capturados *Triatomino*s y en la prevalencia fue del 0.00% entre 86 voluntarios en las 4 localidades donde no fueron capturados *Triatomino*s; las localidades donde fueron capturados los *Triatomino*s estuvieron a una latitud entre los 2,150 a 2,230 m/nm y en las localidades donde no fueron capturados estuvieron a una latitud de 2,270 a 2,380 m/nm. Nuestros indicadores entomológicos pudieran estar afectados porque en las capturas efectuadas por problemas culturales de la población no todos permitieron buscar al vector en sus viviendas, no obstante las especies reconocidas en este estudio fueron *T. barberi* capturados en 4 localidades y *T. pallidipennis* capturados en 1 localidad, además fueron capturados ninfas y colectados huevesillos de *T. barberi* indicando colonización reciente. En México la presencia de los *Triatomino*s ha sido reconocido en todo el país preferentemente por debajo de los 2,000 m/nm pero *T. barberi* es capaz de vivir en zonas elevadas de clima templado y frío (11) y es el principal vector de México; (21) también se confirma el hecho de que la presencia de *Triatomino*s es igual a prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en humanos y en reservorios animales doméstico e incluso silvestres. (4, 10) Habitar en viviendas con paredes de paja, laminas de cartón o madera fue un factor abiótico determinante $p = 0.0014$ y $RR = 1:6$ y el habitar en viviendas con techos de los mismos materiales también resulto ser un factor abiótico determinante $p = 0.031$ y $RR = 1:9$ con estos resultados concordamos que los *Triatomino*s prefieren infestar viviendas construidas con materiales ligeros; (3, 4, 10) en la encuesta de la ENSE el habitar en viviendas con estas características conllevaba un $RR 1:3$ a nivel nacional; (18) en este estudio 14 casos indeterminados habitaron en viviendas construidas con otro tipo de materiales (block o ladrillo, concreto, láminas de asbesto o metálicas) que en este municipio son la gran mayoría y en ellas también fueron capturados *Triatomino*s, se puede decir que los *Triatomino*s se han adaptado y han infestado viviendas construidas con materiales no precarios. El valor del Riesgo Relativo de habitar en viviendas con materiales precarios debe ser tomado en cuenta cuando se realizan encuestas donde se muestrea a sus habitantes casa por casa, ya que si no es considerados se corre el riesgo de caer en un sesgo que repercutiría en el valor de la prevalencia.

La edad de nuestros encuestados fue un factor biótico determinante $p = 0.0000$, el valor de la prevalencia de caso indeterminado aumento con la edad, así en el rango de 15 a 25 años que fueron 69 (17.7%) de los voluntarios la prevalencia fue del 0.00% dato que no concuerda con la ENSE ya que obtuvieron en este grupo la más alta prevalencia, (18) nuestra prevalencia obtenida aumento entre la tercera y cuarta década disminuyendo ligeramente en la quinta, coincidiendo con lo observado en la encuesta de la ENSE; (18) por lo que la edad promedio de los casos indeterminados fue de 41.4 años, 6 de los casos indeterminados mayores de 36 años reconocieron

a los ejemplares de *Triatomino*s, mencionaron haberlos visto en su niñez y en sus viviendas que eran de materiales precarios incluyendo viviendas de piedras y en el presente habitan en viviendas que no son de esos materiales, lo anterior nos indica que el mejoramiento de las viviendas disminuyó el riesgo de adquirir la infección por *T. cruzi* por el valor de la prevalencia obtenido en el grupo de 15 a 25 años, aunque la transmisión vectorial se sigue llevando a cabo, pero quizás en menor proporción.

Los años de radicar en el municipio también fue un factor abiótico determinante $p = 0.0000$ a mayor años de radicar mayor prevalencia, esto se explica por el hecho de tener una mayor oportunidad de re infección el permanecer más años habitando en localidades donde se capturaron *Triatomino*s y se detectaron reservorios humanos y animales de *T. cruzi*.

La trypanosomosis americana ha estado presente en poblaciones humanas del medio rural, (4,10) en este estudio el tener como ocupación campesino fue un factor abiótico determinante $p = 0.0178$ y $RR = 1:4$ el cual esta relacionado con la situación socioeconómica de las personas que resultaron ser casos indeterminados ya que tienen que trabajar en el campo como jornaleros debido a su grado de instrucción, a la falta de otras fuentes de trabajo y por estar más expuestos a los *Triatomino*s y reservorios de vida libre y domésticos; a *T. barberi* se le ha encontrado infectado con *T. cruzi* en condiciones naturales. (52)

El pertenecer al programa PROGRESA–SSA fue un factor abiótico determinante $p = 0.0216$ y $RR = 1:4$, el 49% (192) de nuestros encuestados pertenecían a este programa el cual esta planeado para población en pobreza extrema, que en este estudio resulto ser la población blanco de los casos indeterminados de la trypanosomosis americana, se obtuvo en este grupo 13 casos indeterminados obteniéndose una prevalencia del 6.77%; y se distinguen de los restantes (51%)198 también pobladores de este ámbito rural, porque habitan en las pocas casa con paredes de paja, madera o láminas de cartón $p = .0005$; más de las dos terceras partes habitan en viviendas con techo de láminas de asbesto o metálicas $p = .0019$; la tercera parte habita en viviendas con piso de tierra $p = .00000032$; las dos terceras partes de sus viviendas tienen fosa sépticas $p = .00022$; dos terceras partes conviven con más de un *Canis familiaris* $p = .0013$ y en el total de sus viviendas refieren la presencia de fauna nociva como ratas o ratones $p = .026$, estos últimos son conocidos como reservorios importantes de *T. cruzi*. (25-27) Observamos que el tamaño de los terrenos en los que habitan las familias de los grupos de PROGRESA no es suficientes para albergar a la vez su viviendas, corrales de animales y almacenar paja o leña en el patio, estos terrenos están juntos unos de otros formando manzanas en las pequeñas localidades que además carecen de servicios públicos. (20, 49)

Los perros domésticos han sido ampliamente implicados como el segundo más importante reservorio de *T. cruzi*, ya que son un riesgo en el conocido ciclo doméstico de *T. cruzi* y se ha

visto que son importantes indicadores de infestación de las viviendas por el vector (25) lo que hace a un *Canis familiaris* ser un reservorio importante es su fuerza de infectividad (IF) a diferencia de la de los humanos, esta persiste debido a su estado nutricional y a que son más susceptibles a las re infecciones, (26) en este estudio obtuvimos una seroprevalencia a anticuerpos contra *T. cruzi* del 10.36% en *Canis familiaris* domésticos y mestizos empleando la técnica de HAI-InDRE, la prevalencia detectada en *Canis familiaris* es 2.38 veces mayor que la detectada en humanos del mismo municipio, los *Canis familiaris* positivos fueron de las localidades donde hubo prevalencia en humanos y donde fueron capturados *Triatominos*, por lo que a los *Canis familiaris* se les puede emplear como indicadores de infestación por *Triatominos* y en consecuencia de una probable prevalencia en humanos, este tipo de estudios se ha llevado desde hace algunos años con buenos resultados en Argentina. (26) Los cerdos pueden ser susceptibles a la infección por *T. cruzi*, (2, 4) en este estudio el criar cerdos de traspatio fue un factor biótico determinante $p = 0.038$ este resultado pudiera deberse a que los cerdos son criados en corrales que están contruidos con materiales precario, con piso de tierra y están hacinados condiciones ideales para ser infestados los corrales por el vector, los encuestados refirieron haber visto *Triatominos* en los corrales de cerdos, en este estudio fueron capturados especimenes de *T. pallidipennis* en la localidad de la Purísima, entre los pobladores les dan el nombre de campiotas.

Los encuestados que viven cerca de los cerros, avistan animales silvestres que merodean de vez en cuando sus viviendas y los cuales no se relacionan con sus animales domésticos a excepción de los conejos silvestres y los tlacuaches, se capturaron 3 zorrillos, 1 zorra, 2 tlacuaches y 5 conejos, se les determino anticuerpos séricos contra *T. cruzi* con la técnica de HAI-InDRE tamiz 1:8, solo 2 muestras de conejos fueron positivas, esto nos indica que es probable la invasión del ciclo doméstico por mamíferos sinantrópicos infectados y la invasión ocasional del espacio doméstico por vectores silvestres, aunque quizás ayuden las fumigaciones periódicas que se realizan a los campos de cultivo.

En este estudio se demostró que el parásito esta en circulación en individuos positivos a una prueba, con dos pruebas con o sin síntomas; de los 17 voluntarios que fueron casos indeterminados ninguno refirió tener historial de donación, pero si 21 de los encuestados negativos a anticuerpos contra *T. cruzi*, por lo que la razón de probabilidad de ser caso indeterminado de trypanosomosis americana en el grupo étareo en estudio del MPB fue de 1:20, la de tener historial de donación fue de 1:25 y la razón de probabilidad que estas dos características se con junten en un solo individuo fue de 1:11. Los casos indeterminados se sabe que son los responsable de la urbanización de la trypanosomosis americana en donde no existen vectores, a través de la migración; (4) pero tenemos que considerar que al ampliarse la cobertura de los servicios de salud en población abierta, y a grupos de población en pobreza extrema como en el programa

PROGRESA no necesariamente por la migración se urbanice la trypanosomosis americana, ya que estas familias pueden tener acceso a hospitales de segundo y tercer nivel que cuentan con bancos de sangre o bien accedan a estos servicios por el establecimiento ocasional en sus localidades de industrias que emplean mano de obra no calificada por lo que se convierten en derechohabientes esporádicos de alguna institución de salud.

9. CONCLUSION

En este estudio se demostró que en el Municipio de Palmar de Bravo existen los factores bióticos como la edad de los encuestados, convivir o el criar reservorios domésticos como *Canis familiaris* y cerdos y la presencia de *Triatomino*s en las viviendas y los factores abióticos como la altitud metros sobre el nivel del mar de las localidades, los años de radicar en el municipio, el tener como actividad ocupacional campesino, el habitar en viviendas con techo o paredes de paja, lámina de cartón o madera y el pertenecer al programa de PROGRESA.

Estos factores fueron determinantes para ser casos indeterminados de la trypanosomosis americana en el ámbito rural de este municipio, detectándose una prevalencia del 4.35% para los habitantes en edad productiva del Municipio de Palmar de Bravo.

Además se demostró que el parásito se encuentra en la circulación sanguínea de los individuos positivos a anticuerpos contra *T. cruzi* a una sólo prueba serológica, en los casos indeterminados de la trypanosomosis americana con o sin sintomatología, observándose además una variación en el grado de parasitemia y título de anticuerpos y esto pudiera deberse a la respuesta inmune que se genera en la relación huésped-parásito y también a la genética del individuo afectado.

10. APORTACIONES

1. Detección de la prevalencia de la trypanosomosis americana en individuos que habitan en localidades que están a más de 2,000 metros sobre el nivel del mar.
2. Presencia de *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma barberi* dentro de las viviendas y en su entorno en localidades que están a más de 2,000 metros sobre el nivel del mar y en un clima de templado a frío.
3. Detección de la prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en reservorios domésticos como lo son los *Canis familiaris*.
4. El amplificar el ADN de mini círculos del cinetoplasto del parásito empleando los primers *KNS1* y *NKS2* de 43 pares de bases y detectar el ADN en muestras de hemocultivos.
5. El demostrar a *Trypanosoma cruzi* en la circulación sanguínea de individuos positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* con una sólo prueba serológica y en los casos indeterminados de la trypanosomosis americana con o sin sintomatología.

11 ANEXOS

ANEXO 1.

DEFINICIONES OPERACIONALES:

Altitud: Altura de un punto de la tierra con correlación al nivel del mar.

Anticuerpo: Proteínas complejas sintetizadas por células especializadas, estas proteína neutralizan o destruyen antígeno. Los anticuerpos sólo reconocen el antígeno que provocó su formación, su actividad biológica es la de combatir infecciones pero también son nocivos en alergias y enfermedades autoinmunes

Antígeno: Sustancia de variada naturaleza química ajeno al organismo que puede inducir a una respuesta inmune al ser introducida a la circulación, determinando la formación del medio de defensa específico

Clima: Conjunto medio de condiciones atmosféricas que caracterizan a una región, y que son temperatura, presión barométrica, humedad, vientos, precipitaciones etc.

Factor abiótico: Sustancia o proceso que no tiene vida, por ejemplo agua, aire, lixiviación, etc. Resulta difícil desde el punto de vista ecológico, separar los procesos bióticos de los abióticos.

Factor biótico: Cualquiera de los factores determinados por los seres vivos de un biotipo, que contribuyen, junto con los factores físico- químicos del mismo, a crear las circunstancias que hacen posible la existencia de los otros seres que conviven con ellos.

Factor de riesgo: La característica de un individuo o de su entorno que hace que a un individuo más susceptible de ser alcanzado por una enfermedad en particular que otro que no posee estas características.

Prevalencia: Número de casos de una enfermedad en un momento determinado, dividido entre la población en riesgo en ese punto dado del tiempo.

Reservorio: El hábitat normal en que vive y se multiplica o crece un agente infeccioso

Triatomíneos: Son insectos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatomidae* son insectos chupadores se conocen 118 especies, algunas de ellas se les puede encontrar en viviendas humanas por su adaptación al ecotopo doméstico y peridoméstico otras son estrictamente silvestres.

Vector: Al animal que transmite el microorganismo causante de una enfermedad sin sufrirla él mismo, el microorganismo vive de su ciclo biológico, por lo general son insectos chupadores.

Vivienda: Cosa en que o de que se ha de vivir, habitación, género de vida o modo de vivir.

ANEXO 2

CARACTERIZACION DE LAS VARIABLES

Cuadro 1
Características de las variables

VARIABLE	NIVEL DE MEDICION	ESCALA DE MEDICION	VALOR
Anticuerpos séricos anti <i>-T. cruzi</i> en humanos técnica ELISA-INC	Cuantitativa	Continua de intervalo	> 0.241
Anticuerpos séricos anti <i>-T. cruzi</i> en humanos técnica IFI-INC	Cuantitativa	Continua de intervalo	> 1:64
Anticuerpos séricos anti <i>-T. cruzi</i> en humanos técnica HAI-InDRE	Cuantitativa	Continua de intervalo	> 1:8
Anticuerpos séricos anti <i>-T. cruzi</i> en humanos técnica ELISA-InDRE	Cuantitativa	Continua de intervalo	> 0.220
Anticuerpos séricos anti <i>-T. cruzi</i> en humanos técnica IFI-InDRE	Cuantitativa	Continua de intervalo	> 1:32
Anticuerpos séricos anti <i>T. cruzi</i> en <i>Canis familiaris</i> técnica HAI-InDRE	Cuantitativa	Continua de intervalo	> 1:8
Detección del ADN parásito por método de la PCR	Cualitativa	Nominal dicotómica	Positivo Negativo
Localidad a < 2,200metros sobre el nivel del mar	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si < 2,200 No >2,200
Sexo	Cualitativa	Nominal dicotómica	Femenino Masculino
Edad	Cuantitativa	Nominal discreta	15 A 65 años
Años de radicar en el Municipio de Palmar de Bravo	Cuantitativa	Nominal discreta	10 a 65 años
Número de habitantes por vivienda	Cuantitativa	Nominal discreta	1 a 15 habitantes
Viviendas con techo construido con materiales ligeros	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si: Madera, palma o lámina de cartón No: concreto
Viviendas con paredes construidas con materiales ligeros	Cualitativas	Nominal dicotómica	Si : Madera, palma o lámina de cartón No: ladrillo o block
Viviendas con piso de tierra	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si: piso de tierra No: piso de cemento o loseta

Cuadro 2
Características de las variables

VARIABLE	NIVEL DE MEDICION	ESCALA DE MEDICION	VALOR
Viviendas por disposición de excretas	Cualitativa	Nominal discreta	Drenaje, letrina, fosa séptica y ras de suelo
Animales domésticos	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si: Tiene perro y gato No: No tiene perro o gato
Animales de corral como aves, cerdo, caprinos, bovinos y otros	Cuantitativa	Nominal dicotómica	Si: tiene animales de corral No: No tiene animales de corral
Animales silvestre merodeando la vivienda	Cualitativa	Nominal dicotómica	SI : Los ha visto merodear No: No los ha visto merodear
Conocer a los <i>Triatomino</i> s	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si: Refieren conocerlos No: No refieren conocerlos
Picadura por <i>Triatomino</i> s	Cualitativas	Nominal dicotómicas	Si: Refieren picadura No: no refieren picadura
Donador de sangre	Cualitativa	Nominal dicotómica	Si: refiere haber donado sangre No: No refiere haber donado sangre
Institución de Seguridad Social a la que acude a servicio médico o programa al que pertenece	Cualitativa	Nominal discreta	IMSS SSA PROGRESA

ANEXO 3

FORMATO 1

CONSIDERACIONES ETICAS

Los procedimientos que se emplearán en la toma de muestras en los pacientes, están de acuerdo con las normas éticas, del Reglamento de la Ley General de Salud, en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975, enmendada en 1983.

Por lo que se solicitará el consentimiento informado de los pacientes:

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CLINICA.

Titulado-----

Registrado ante el comité local de investigación con el número----- El objetivo-----

Se me ha explicado que mi participación consistirá en-----

Declaró que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes-----

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevaron a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo del Instituto.

El lugar y fecha -----

Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación l investigador principal me ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque este pudiere hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente

Nombre, matrícula y firma del investigador

ANEXO 4
FORMATO 2

ENCUESTA EPIDEMIOLOGICA PARA DETERMINAR FACTORES DE RIESGO EN LA TRANSMISIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN LOCALIDADES DEL MUNICIPIO DE PALMAR DE BRAVO EN EL ESTADO DE PUEBLA.

Fecha: _____

Localidad del Municipio _____

Localidad < A 2,200 metros sobre el nivel del mar ()

Grado de marginalidad de la localidad: () alta () muy alta () media

Folio asignado al entrevistado _____

Nombre _____

Domicilio _____

Sexo ()

Edad _____

Cuánto tiempo tienen de radicar en el Municipio _____

Ocupación _____

Cuántas personas viven en su casa? _____

Características de la vivienda (materiales de construcción)

Paredes. () tabique o block () madera o palma () adobe () laminas () piedra

Techo: () colado () teja () láminas (4) palma o madera

Piso: () tierra () cemento () loseta . ()

Características de saneamiento de las viviendas

() drenaje () letrina () fosa séptica () ras de suelo

() llave pública () llave dentro de la casa o en el terreno () manantial o pozo

Convivencia con animales:

Tiene animales de corral? ()

Cuáles? () pollos () caprinos () bovinos () pollos y cerdos () equinos y otros

Convive con animales domésticos?

(1) perro () gato ()

Cuáles animales silvestres merodean por su casa?

() tlacuaches () armadillo () víbora de cascabel () zorrillo () zorra () otros

Animales de fauna nociva como ratas y ratones merodean su casa? ()

Conoce a los *triatominos*? ()

En que lugar ha visto? () casa () peri doméstico () otro Municipio

Picadura por chiches? ()

Tiene dificultad para deglutir? ()

Tiene problemas de respiración y agotamiento? ()

A recibido a donado sangre? ()

Asiste a recibir servicios de salud o pertenece a alguna programa?: () SSA () IMSS

() PROGRESA

ANEXO 5

Pruebas estadísticas empleadas para medir eficacia y concordancia de las pruebas serológicas para la determinación de anticuerpos contra *T. cruzi*

Tabla de contingencia

	+	-	
+	a	b	a + b
-	c	d	c + d
	a + c	b + c	a + b + c + d

a = verdaderos positivos

Sensibilidad = $a / (a + c)$

b = falsos positivos

c = falso negativo

Especificidad = $d / (b + d)$

d = verdaderos negativos

Desviación estándar de sensibilidad y especificidad

$$DE = \frac{p \times q}{n}$$

p = sensibilidad $a / (a + c)$ ó especificidad $d / (b + d)$
 n = total de pruebas estudiada

Límite de confianza de sensibilidad y especificidad

Sensibilidad + (1.96 x DE)

Sensibilidad - (1.96 x DE)

Especificidad + (1.96 x DE)

Especificidad - (1.96 x DE)

Valor de predicción (Teorema de Bayes)

$$VP+ = \frac{S \times P}{(S \times P) + (1 - E) \times (1 - P)}$$

S = sensibilidad

E = especificidad

P = prevalencia

1 - S = diferencia de sensibilidad

1 - E = diferencia de especificidad

1 - P = diferencia de prevalencia

$$VP- = \frac{E \times (1 - P)}{(E) \times (1 - P) + (1 - S) \times (1 - P)}$$

$$\text{Coeficiente Kappa} = \frac{P_o - P_c}{1 - P_c}$$

P_o = concordancia observada = $(a + d) / n$
 P_c = concordancia esperada debida al azar
 $(a + b / n) (a + c / n) + (b + d / n) (c + d / n)$

Valor de Kappa

0	a	0.20
0.21	a	0.40
0.41	a	0.60
0.61	a	0.80
0.81	a	1.0

Fuerza de concordancia

Leve
 Moderada
 Mediana
 Sustancial
 Casi perfecta

Ji cuadrada para tabla de contingencia 2 x 2 .

Caso indeterminado de Trypanosomosis americana

	+	-	
Factor biótico o abiótico Exposición +	a	b	$a + b = n_{x+}$
Factor biótico o abiótico No exposición -	c	d	$c + d = n_{x-}$
	$a + b = n_{E+}$	$b + d = n_{E-}$	$a + b + c + d = n$

$$\text{Ji cuadrada} = \frac{n (|ad - bc| -)}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}$$

Razón de posibilidad = Odds ration

Posibilidad a / b = $[a / (a + b)] / [b / (a + b)]$

Posibilidad = proporción / 1 – proporción

ANEXO 6**PREPARACION DE REACTIVOS****Medio de cultivo LIT**

NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
Dextrosa	2.0 g
Tryptosa (Difco y Oxoid)	5.0 g
Caldo infusión de hígado	5.0 g
Hemina (Sigma)	25 mg

Aforar a 1,000 con agua, adicionar 100 ml de suero fetal bovino inactivado a 56 °C por 30 minutos.

Medio de cultivo bifásico enriquecido (BHI)

Agar BHI	37 g
Dextrosa	10 g

Aforar a 1,000 ml con agua destilada, ajustando a pH 7.2 distribuirlo en matraces Erlenmeyer de 500 ml, vaciando 250 ml en cada uno de ellos, esterilizar en autoclave, una vez solidificado se adiciona un volumen equivalente de solución salina o PBS 0.01M estéril. Por último se agrega suero fetal bovino inactivado a 56°C por 30 minutos para obtener una solución al 10%.

CuSO₄ al 2%

CuSO₄ 2.0 g

Aforar a 100 ml con agua

Tartrato de Na y K al 2%

Tartrato de Na y K 2.0 g

Aforar a 100 ml con agua

Solución de Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1N

NaOH 4.0 g

Aforar a 100 ml con agua

Na₂CO₃ 2.0 g aforar a 100 ml con la solución anterior NaOH 0.1N

Solución Stock de albúmina

Albúmina 1 mg

Aforar con PBS 0.01M

Solución stock de buffer de fosfatos PBS 0.1M

NaCl 80.0 g

KCl 2.0 g

Na₂HPO₄ 11.5 g

KH₂PO₄ 2.0 g

Aforar a 1,000 ml con agua

Solución PBS 0.01M

100 ml de PBS 0.1M aforar a 1,000 ml con agua (ajustar a pH 7.2 a 7.4)

Bufe de Carbonatos 0.01M pH 9.6

Na₂CO₃ 1.059 g

NaHCO₃ 2.930 g

Aforar a 1,000 ml con agua (ajustar a pH 9.60 a 9.63)

Buffer Citrato – Fosfato 0.1M pH 5.0

Citrato de Na 29.4 g

Aforar a 1,000 ml con agua (ajustar a pH 5.0 con ácido fosfórico concentrado)

PBS 0.01M-Tween 20 al 0.05%

PBS 0.01M 1,000 ml

Tween 20 0.50 ml

Solución de revelado

Orto-fenil-diamina .008 g
 20 ml de buffer de citrato-fosfato 0.1M pH 5.0
 8 μ L de H₂O₂ al 30%
H₂SO₄ 2.5N

H₂SO₄ 61.3 ml
 Aforar a 500 ml con agua

Azul de Evans

Preparar una solución madre de azul de Evans al 1% en PBS-IFI

Solución de lavado de TBST (Buffer salino de TRIS adicionado de Tween 20 –ELISA)

Tris – Cl pH 7.5 100 mM
 NaCl 0.9%
 Tween 20 0.1%

Buffer de citratos pH 5.0

Acido citrico 0.1M
 Fosfato de sodio 0.2M

Solución de bloqueo TBST- leche

Leche descremada en TBST al 5%

Buffer de corrimiento para electroforesis (5X)

Glicina (0.38M)	720 g
Tris base (0.05M)	150 g
SDS (2%)	25 g
Agua desionizada	5000 ml

Ajustar a pH 8.3

Buffer de muestra (pH 8.3)

Tris (75 mM)	0.091 g
SDS (2%)	0.06 g
Glicerol (10%)	1 ml
Azul de bromofenol (0.001%)	0.001 g
H ₂ O	50 ml

Buffer de transferencia (Ph 7.8 a 8.4)

Tris base	3.0 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml
Aforar a 1000 ml	

Gel separador

H ₂ O	7.9 ml
Acrilamina 30%	6.7 ml
Tris 1.0 M pH 8.8	5.0 ml
SDS 10%	0.2 ml
APS 10%	0.2 ml
TEMED	0.012 ml

Gel concentrador

H ₂ O	3.4 ml
Acrilamina	0.830 ml
Tris 1.0 M pH 6.8	0.630 ml
SDS 10%	0.05 ml
APS 10%	0.05 ml
TEMED	.008 ml

12 BIBLIOGRAFIA

1. Diario Oficial de la Federación: **Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-SSA2-1999**, Para la vigilancia, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.
2. Alcha PN, Szyfres B. En **Zoonosis y enfermedad transmisibles al hombre y los animales** Ed. OPS/OMS 1986 pag. 590 – 601.
3. Manzullo. **La enfermedad de Chagas entre el Cielo y la tierra** <http://healthing.com/Espanol/n-0002.html> 1998 pag 1 – 5
4. Pinto Díaz JC, Wendel S, Brener Z, Camargo ME. **Epidemiology of Chagas Disease**. Ed ISBT'92 Sao Paulo Brazil 1992 pag 1 – 5
5. Brener Z, Wendel S, Camargo ME. **Trypanosomiasis: its impact in transfusion and clinical Medicine**. Ed. ISB'92 Sao Paulo Brazil 1992 pag. 1 – 5
6. Guzman BMC, García GL, Floriani VJ, Guerrero MS, Torres CM. **Riesgos de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de sangre**. Rev. Panam Salud Pública 1998 4(2):590-601
7. Velasco CO. **La enfermedad de Chagas en México**. Infectología, año 12, num. 12 Diciembre 1992 pag 783-792.
8. Andrade AL, Zincker F, Silva IG, Souza JM, Martinelli CM. **Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection among children in control Brazil: a case control study in vector control setting**. Am J. Trop Med Hyg 1995 Feb 52 (2): 183 – 187.
9. Carmen Gúzman –Bracho; Sonia Lahuerta and Oscar Velazco – Castrejón **Chagas disease. First congenital case report**. Arch Med Res 29(2): 195-196, 1998.
10. Alcha. **La enfermedad de Chagas – Maza** <http://www.dr.websa.com.a/alcha/hist4.htm> 1997, pag 1 –12
11. Guzmán BMC, Floriani VJ, Guerrero MS, Ramírez NA, Hernández MG. **Enfermedad de Chagas. Manual de procedimientos de laboratorio del InDRE 1999**. Secretaria de Salud. Subsecretaria de prevención y control de enfermedades. Coordinación de vigilancia epidemiológica. InDRE.
12. Monteón, PV; T. Sosa & PA Reyes. **Serologic test for American Tripanosomiasis. A comparative study**. Rev Latinoamer. Microbiol. Mex 1989 31:35 – 38.
13. Monteón PVM, Ramos EA, Reyes LPA. **Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi***. Rev Biol Trop 1993, 41(3):861-865
14. Monteón PVM, Reyes LPA, Rosales E JL. **Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras experimentales por el método de reacción en cadena de la ADN polimerasa**. Arch Inst Cardiol Méx Vol 64:135-143, 1994.

15. Wincker, P., Britto, C., Borges Pereira, J., Cardoso, M.A., Oelemann, W., and Morel, C.M. **Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from samples from chronic chagásica patients in a rural endemic area.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1994 51:771 – 777.
16. Avila H, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, Degrave W, Morel C, Simpson L. **Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis.** J. Clin Microbiol 1993;31:2421
17. Avila H, Sigman D, Cohen lee M, Millikan RC and Simpson L. **Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease.** Molecular and Biochemical Parasitology, 48(1991) 211-222
18. Velasco CO, Tapia CR, Guzmán BMC, Magos C, Llausás A, Sepúlveda AJ. **Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México.** Sal Pub Mex 1991 34(2):186-195.
19. Barreto Mauricio, Burbano ME, Barreto P. **Nuevos registros de flebotominos en Risaralda, Cauca y Valle de Cauca.** INTERNET
20. Vallejo A. Maité; Reyes PA. **Trypanosomosis americana ¿ Un problema sociomédico en México?** Arch Inst Cardiol Méx Vol. 66:95-97, 1996.
21. Zarate I.G, Zarate R.A **Cheklis of the triatominae (*Hemiptera: Reduviidae*) of México.** Int J. Entomol 1985: 27: 102 – 127.
22. Tay ZJ, Sánchez VJT, Guerrero LB, Alonso GT, Romero CR. **Nuevas localidades con triatominos infectados por *Trypanosoma cruzi* en la República Mexicana.** Bol Chil Parasitol 1996, 51:49-53.
23. Magallón GE, Magdaleno PNC, Katthain DG, Trujillo FC, Lozano KFJ, Hernández GRJ. **Distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*), en el estado de Jalisco, México.** Rev Biomed 1998; 9:151-157
24. Pérez FR, Sánchez GMC, González AC, Monteón PVM, Reyes LPA, Rosales E JL. **Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic an indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen**
25. Gurtler, R.E., Cécere, M.C., Rubel, D.N., Petersen, R.M., Schwigman, N.I., Lauricella, M.A. **Infected dogs as a risk factor for the domestic transmission of *Trypanosoma cruzi*.** Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene, 85, 741-745

26. Cecere MC, Castañera MB, Canale DM, Chuit R, Gurtler RE. *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans* and other triatomines: long-term effects of a control program in rural northwestern Argentina. Rev Panam Pub 1999, 5(6)
27. Solis FRR, Romo ZJA, Martínez IA. Wild reservoirs infected by *Trypanosoma cruzi* in the ecological park "El Zapotal" Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1997, 92(2):163-164.
28. Camargo ME, Segura EL, Kagan IG. Normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Las Américas: Evaluación de tres años de colaboración. Biol Sanit Panam 1987, 102(5):449-492.
29. Monteón PVM, Guzmán BMC, Floriani VJ, Ramos EA, Velasco CO, Reyes LPA. Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas: autosuficiencia y concordancia interlaboratorios. Sal Pub Mex 1995, 37(3): 232-235.
30. Wolpert E. El papel de la SSA en la prevención de la enfermedades por transfusión de sangre. Gac. Med Méx 130(6) 412-424.
31. Trujillo CF, Lozano KF, Soto GM, Hernández GR. Prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en el Estado de Jalisco. Rev Soc Bra Med Trop 1993 26(2):89-92
32. Rodríguez FME, Zavala VJ, Barrera PMA, Guzmán ME, Ramírez SM, Alvarez MR. Riesgos de transmisión de la enfermedad de Chagas por donantes de sangre Rev Biomed 1995 6:70-75.
33. Rangel H, Gatica R, Ramos C. Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in donors from a blood bank in Cuernavaca, Morelos, México. Arch Med Res 1998 29(1):79-82.
34. Monteón PVM, Hernández BN, Guzmán BMC, Rosales EJM, Reyes LPA. American Trypanosomiasis (Chagas' disease) and blood banking in Mexico City: Seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. Arch Med Res 1999 30:393-398
35. Salazar SPM, Tay ZJ, Ruíz HAL y col Seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro grupos de población del Estado de Oaxaca. Sal Púb Méx 1984, (26):589-595.
36. Ruegger LG, Monteón PVM, Marcuschamer J, Reyes LPA. Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Encuesta Clínico-epidemiológica en un Municipio rural oaxaqueño. Arch Inst Cardiol Mex 1993, 63:341-346.
37. Cortés JM, Velasco CO, Labastida MH, Duarte N, De Torre R. La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche Oaxaca, México. Sal Pub Mex , 1985 27(1)
38. Salazar SPM, Ruíz HAL, de Haro AI, Tay ZJ. Gutiérrez QM, Serología y electrocardiografía en jóvenes de áreas endémicas de enfermedad de Chagas. Rev Med IMSS 1989, 27:59-65

39. Ortega PG, López AF. **Taller internacional sobre epidemiología molecular. Propuestas del grupo interdisciplinario sobre Tripanosomosis Americana y Leishmaniosis.** Gac Méd Méx 1997, 133 Suppl 1: 49-62.
40. Lara CC, Galaviz SL, Alvarez JA. **Prevalencia de sueros reactivos a trypanosoma cruzi en habitantes de cuatro localidades al sureste de Gral Terán, Nuevo León y obtención de los indicadores entomológicos.** Gac Méd méx 1994 Congreso Acad Med (resumen)
41. Del Rio A, Cortes JM, Cabral J. **Estudio seroepidemiológico en dos comunidades del Estado de Zacatecas.** Enfermedad de Chagas II Reunión Nacional 1990 (resumen)
42. Velasco CO, Gamboa ST, Carrera S. **Enfermedad de Chagas en Palma Arriba Veracruz.** Enfermedad de Chagas II Reunión Nacional 1990 (resumen)
43. Legislación en Sanitari. Ley General de Salud, Título octavo pag 30 –31 Ed Delma 2da Ed. 1998 México D.F.
44. OPS **Programas sustantivos para el control de la enfermedad de Chagas INTERNET**
45. Ibañez-Bernal S, Godínez AA, Paz RR. **El estudio sobre vectores de la enfermedad de Chagas en México por el INDRE.** Topico Control de vector Chagas. Noticias de interes SSA. Septiembre de 1998.
46. Coordinación de vigilancia epidemiológica. **Programa de enfermedades transmitidas por vector y zoonosis.** INTERNET
47. Dumonteil E. **Update on Chagas' disease in Mexico.** Sal Pub Mex 1999 41(4):322-327.
48. OPS **Chagas. General information and disease control activity related links.** 2000 INTERNET.
49. Sosa JF, Reyes MFA. **Diagnóstico de Salud del Municipio de Palmar de Bravo, Puebla en el año de 1999.** Biblioteca de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.
50. Frenk Julio **Priorización de los problemas de Salud.** El observatorio de la salud
51. Coura, J.R., Abres, L.L., Dubois, L., Correia Lima F. De Arruda, J.R. **1984 Morbilidad e da doenca de Chagas. II Estudo seccionais em quatro areas de campo Brasil** Memorias do INSTITUTO Oswaldo CRUZ 79, 101 –124
52. Alejandrez R. y col **Comunicación personal** Laboratorio de Entomología; Escuela de Ciencias Biológicas; Instituto Politécnico Nacional.