

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
Facultad de Ciencias Médicas
UNAN-LEÓN



Tesis para optar al grado de Master en Bioquímica Clínica

**Validación de una Prueba de Aglutinación de Látex
con Antígenos de Cepas Nicaragüenses de
Trypanosoma cruzi**

Presentada por

Elizabeth Meyer Segráñez

**Tutores: MSc. Rosario Palma Guzmán
MSc. William Morales G.**

LEÓN, ENERO 2003

INTRODUCCION

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas fue descubierta en 1909, en Brasil, por Carlos Chagas, quien posteriormente estudió en forma completa sus aspectos parasitológicos, epidemiológicos y clínicos. Es una enfermedad parasitaria crónica causada por un protozoo flagelado, el *Trypanosoma cruzi*. Este parásito normalmente se transmite al ser humano y a otros mamíferos a través de insectos triatomíneos, de la familia Reduviidae, en el momento en que perforan la piel para succionar la sangre que los alimenta. Sin embargo, no se inocula directamente por intermedio de las estructuras bucales del insecto en el momento de la picadura, como en el caso de las tripanosomiasis africanas, sino que se deposita pasivamente en la piel a través de las heces del insecto, penetrando en el cuerpo por la herida que causa la picadura u otras abrasiones de la piel o la mucosa. El *Trypanosoma cruzi* también puede transmitirse por infección congénita, por transfusión de sangre contaminada o por el trasplante de órganos contaminados. El ciclo vital del parásito es largo y complejo y su desarrollo tiene varias etapas, tanto en el vector triatomíneo como en el huésped vertebrado.

El parásito

Taxonomía

El *Trypanosoma cruzi* pertenece al subfilo Mastigophora del filo Sarcomastigophora, orden Kinetoplastida, que se compone de organismos flagelados con un quinetoplasto, una organela localizada en el mitocondrio de la célula que contiene una red fibrosa de DNA. El *Trypanosoma cruzi* se incluye en la sección estercorácea, junto con el grupo de tripanosomas cuyas etapas infectivas se desarrollan en el tracto digestivo y contaminan a los huéspedes mamíferos a través de las heces. Se ha adoptado el subgénero *Schizotrypanum* para los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados por medio de fases intracelulares. De ahí que el nombre taxonómico completo sea *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

Aislamiento y mantenimiento de cepas de T. cruzi

Las cepas de *T. cruzi* pueden aislarse por xenodiagnóstico, por cultivo sanguíneo y en casos agudos por inoculación de sangre en ratones recién nacidos. Las poblaciones aisladas

se amplían mediante pasajes seriales a través de animales y el cultivo en medios axénicos y tisulares.

Los vectores

Casi todas las especies triatomíneas se limitan a las regiones neotropicales y neoárticas, encontrándose algunas de ellas en ambas regiones. Se distribuyen geográficamente desde la ciudad de Salt Lake City, a 41° de latitud N, en los Estados Unidos de América, hasta la Patagonia, en América del Sur, a los 46° S.

Taxonomía

Los triatomíneos son insectos del orden Hemiptera, de la familia Reduviidae y de la subfamilia Triatominae

Los triatomíneos de los Estados Unidos de América no se han adaptado a los hábitats domiciliarios. Desde México hasta el Norte de Sudamérica, las especies más importantes son el *Rhodnius prolixus* y el *Tryatoma dimidiata*.

Biología y comportamiento

La principal característica biológica de los triatomíneos es la de succionar sangre en un solo ambiente, y esto se aplica tanto a las ninfas como a los adultos de ambos sexos. De ahí que sus hábitats naturales sean los ecotopos silvestres que sirven como nidos, refugios o lugares de descanso para los mamíferos, aves y reptiles, donde los triatomíneos viven en fácil contacto con los vertebrados, los cuales constituyen sus fuentes naturales de alimentación de sangre. Algunos triatomíneos tienen preferencia hacia cierta especie en particular, pero la mayoría de ellos se alimenta de una amplia variedad de huéspedes. Mediante la asociación de los triatomíneos con el *Trypanosoma cruzi* y con los mamíferos silvestres se establecieron nichos naturales dentro de una variedad de biocenosis, hasta que el ambiente fue invadido y perturbado por el hombre. Debido a la destrucción de los hábitats naturales, algunas especies de triatomíneos ocuparon ambientes peridomésticos y domiciliarios. El hambre es aparentemente uno de los factores principales en la dispersión de los insectos a otros ecotopos. La creación de nuevas condiciones epidemiológicas involucra a seres humanos y a animales domésticos en el ciclo de transmisión, convirtiendo a la asociación natural del *Trypanosoma cruzi* y

los triatomíneos en una verdadera antropozoonosis. En consecuencia, además de encontrarse en los nidos de aves, árboles ahuecados, intersticios de rocas, troncos caídos, raíces expuestas, corteza suelta, hojas de palma y bromeliadas epifíticas, en la actualidad los triatomíneos invaden también los hábitats domiciliarios y peridomiciliarios.

Todas la especies son vectores potenciales del *Trypanosoma cruzi*, pero seis tienen una importancia epidemiológica especial en América del Sur (*Tryatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Pastrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus*) y una séptima especie (*R. pallescens*) juega un papel importante en América Central y Panamá.

El *Rhodnius prolixus* es el vector más importante de la enfermedad de Chagas en gran parte de la América tropical, y al igual que el *T. infestans*, ha evolucionado hasta adaptarse a las viviendas humanas. Esta especie es originaria del norte de Sudamérica, donde también ocupa numerosos hábitats arbóreos silvestres relacionados con mamíferos y aves que anidan en palmeras o bromeliadas. En varios países de Centroamérica y en parte de México, sin embargo, se encuentra solamente dentro de las viviendas. En el ambiente domiciliario, el *Rhodnius prolixus* se alimenta principalmente de sangre humana y sangre de pollo, aunque se ha comprobado que también se alimenta de sangre de gato y perro. En el ambiente selvático, sus principales fuentes de alimentación son la zarigüeya y los roedores. Dentro de las viviendas, se localiza en los techos de palma, las rendijas de las paredes y los enseres domésticos.

El *Tryatoma dimidiata* es una especie domiciliaria encontrada en casas de madera y pisos de tierra, como también en amontonamientos de madera en lugares peridomiciliarios. Es un vector importante en Centroamérica y partes de México. En Costa Rica se alimenta principalmente de sangre humana, y con frecuencia también de sangre de roedores, perros y zarigüeyas. En el Ecuador y México, su principal fuente de alimentación es la sangre de pollo y de roedores.

Factores ecológicos.

Además de los aspectos relacionados con la interrelación entre *Trypanosoma cruzi* y su ambiente, los siguientes factores ecológicos influyen en la transmisión vectorial del parásito.

Factores climáticos.

Los factores climáticos, principalmente la temperatura, al parecer controlan el índice de aumento de las poblaciones de insectos triatomíneos. En los climas cálidos, la transmisión se efectúa durante todo el año, alcanzando su punto máximo en el verano, mientras que en las regiones templadas se concentra en la segunda mitad del año, que es la más calurosa. Este hecho se refleja en el hallazgo epidemiológico de que la frecuencia de casos agudos de la enfermedad de Chagas en seres humanos aumenta marcadamente durante los meses de verano.

Presencia de animales sinantrópicos.

La presencia de animales sinantrópicos tiene un triple significado: constituyen fuentes de sangre, contribuyendo así a preservar o aumentar la densidad de las poblaciones de vectores domiciliarios y peridomiciliarios; pueden ser predadores de los triatomíneos y pueden desempeñar un papel en la dispersión pasiva de los vectores.

Aunque por lo general se acepta que los triatomíneos son succionadores de sangre oportunistas, existen pruebas de que tienen preferencia por un huésped, como en el caso de las especies peridomiciliarias como la *Tryatoma sordida*. Esta es la razón principal por la cual algunas especies son predominantemente domiciliarias y otras peridomiciliarias.

Mediante estudios realizados en varios países endémicos con las seis especies principales de vectores se ha logrado identificar un patrón general con respecto a la succión de sangre (con algunas excepciones). En la mayoría de las regiones es el hombre la principal fuente de sangre, seguida por las aves, especialmente los pollos y a veces las palomas. El perro, y en grado menor el gato, son la tercera fuente más importante. La importancia de los roedores es muy limitada, aunque tienen mucho valor como predadores de insectos triatomíneos. Los pollos y los gatos también pueden atacar a estos insectos, contribuyendo a disminuir su número.

Los animales pueden servir como vehículos para la dispersión pasiva de los vectores. Por ejemplo, se considera que la cigüeña migratoria de los bosques (*Mycteria americana*), aunque no es sinantrópica, ha llevado el *Rhodnius prolixus* desde el norte de Sudamérica hasta Centramérica y México.

Construcción de viviendas y condiciones domiciliarias

La naturaleza y calidad de las edificaciones como también las condiciones de vivienda, incluyendo el almacenamiento de muebles y otros enseres del hogar dentro de la casa y en sus

alrededores, son importantes determinantes de la colonización domiciliaria por los insectos triatomíneos. A través de los hábitats domiciliarios y peridomiciliarios se crean microhábitats que protegen a dichos insectos de los predadores.

Constituyen hábitats domiciliarios relacionados con la construcción de viviendas las rajaduras y grietas en las paredes de cemento o barro, las uniones entre ladrillos de adobe o bloques de cemento, los espacios entre tablas de madera o secciones de bambú, los techos de hojas de palma y los pisos de tierra. Entre otros factores que favorecen la infestación de insectos se incluye el uso de telas (cortinas, por ejemplo), el almacenamiento de productos cosechados dentro de la vivienda, el depósito de ladrillos de adobe en corredores y pasillos interiores y el amontonamiento de palos dentro de la casa.

La presencia de animales domésticos en el interior de la vivienda, el tipo de construcción de las edificaciones complementarias (sean éstas destinadas a almacenar productos o guardar animales) y la distancia entre dichas edificaciones y la vivienda también influyen considerablemente en la presencia de vectores y en la transmisión del parásito.

La importancia de los diversos factores domiciliarios y peridomiciliarios depende de la especie a que pertenezca el vector local; así por ejemplo, los pisos de tierra son favorables al *Tryatoma dimidiata*, y los techos de palma, al *Rhodnius prolixus*. En este último caso, no sólo el techo de palma de por sí proporciona un hábitat apropiado para el vector, sino que las frecuentes reparaciones del mismo conllevan el riesgo pasivo de que entre las hojas provenientes del ambiente selvático y destinadas al nuevo techo se transporten los huevos de los vectores. Para todas las especies, sin embargo, las rajaduras y grietas de las paredes y otras fallas de construcción son sumamente importantes.

Cambios ambientales causados por seres humanos

En la actualidad se acepta que la adaptación de los triatomíneos al ámbito doméstico ha tenido lugar principalmente en regiones naturales de América Latina.

a través de los asentamientos humanos sobrevinieron cambios drásticos de la naturaleza, especialmente debido a la intensa deforestación. Como reacción a esos cambios y para superar la escasez de fuentes de sangre y de refugios naturales, las poblaciones de triatomíneos colonizaron las viviendas de los seres humanos.

Predadores

Entre los enemigos naturales de los triatomíneos se cuentan muchas especies de predadores y parásitos. Los predadores artrópodos incluyen numerosas arañas, pseudoescorpiones, acáridos, cucarachas, hormigas y otros hemípteros reducidos no triatomíneos. Los lagartos, roedores y aves domésticas también se alimentan de los insectos triatomíneos. Varias especies de avispa microhemípteras muy pequeñas parasitan los huevos de los triatomíneos y algunos nemátodos, hongos y bacterias atacan ninfas y adultos.

Relaciones entre vectores y parásitos

La interacción de las distintas especies de vectores y las diversas cepas de *Trypanosoma cruzi* constituye un importante parámetro que influye en la susceptibilidad de un vector a la infección. Dicha susceptibilidad y su habilidad de adaptarse a un hábitat domiciliario son dos determinantes sumamente importantes de su capacidad vectorial.

Los factores que influyen en la susceptibilidad del vector son:

- Factores genéticos. Con respecto a *Rhodnius prolixus*, por ejemplo, se ha demostrado que la susceptibilidad, intensidad de la infección y densidad parasitaria en las heces son reguladas genéticamente y que las características genéticas son transmisibles.
- Trypomastigotes. Al igual que con los tripanosomas africanos, la forma morfológica de los trypomastigotes ingeridos con la sangre influye en el nivel de la infección: las formas "robustas" parecen ser más infectivas que las "delgadas".
- Cepas de *Trypanosoma cruzi*. Las especies de vectores locales generalmente se infectan más fácilmente con las cepas locales de parásitos que con las cepas de otras zonas endémicas. El vector posee la capacidad de "seleccionar" a las subpoblaciones de *Trypanosoma cruzi* dentro de una población heterogénea natural, lo cual puede influir en la patogenicidad del parásito en los huéspedes humanos.
- Otros. Otros factores importantes son la cantidad de sangre succionada, el número de parásitos ingeridos, la etapa en que se encuentra el insecto vector y su edad, la habilidad del parásito de establecer infecciones en las glándulas del recto del vector y la cinética de la transformación del parásito en el tracto digestivo del insecto.

Una vez infectados, los tritomíneos generalmente siguen siendo portadores de parásitos durante toda su vida, aunque existen algunos informes laboratoriales que sugieren que los vectores pueden liberarse de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Los vectores infectados por el *Trypanosoma cruzi* no denotan diferencias biológicas significativas respecto a los no infectados, por lo que aparentemente la infección no causa efectos patogénicos en el insecto (OMS, Control de la Enfermedad de Chagas, 1991).

Ciclo vital

En el ciclo vital del *Trypanosoma cruzi* se distinguen cuatro formas evolutivas:

1. Tripomastigote sanguíneo. Es la forma flagelada que circula en la sangre. No se multiplica y es la forma infectante para el vector.
2. Tripomastigote metacíclico. Es una forma flagelada, semejante a tripomastigote sanguíneo, que se encuentra en las heces del vector infectado. Esta es la forma infectante para el hombre y los mamíferos.
3. Amastigote. Es la forma intracelular multiplicativa del parásito en el mamífero. Tiene forma esférica y carece de flagelo.
4. Epimastigote. Es una forma flagelada que se reproduce en el intestino del vector y los medios de cultivo.

Sólo los mamíferos son susceptibles a la infección por el *Trypanosoma cruzi* (unas 150 especies). Las aves, reptiles y anfibios son resistentes naturalmente a la infección. En el ciclo doméstico, además del hombre, se hallan infectados otros mamíferos como perros, gatos, ratas y conejos. Las aves de corral, aunque no se infecten, son fuente importante de alimento para los chinches.

El ciclo de *Trypanosoma cruzi* se desarrolla en insectos de la familia Reduviidae y en diferentes especies de mamíferos. Los vectores se infectan cuando pican e ingieren sangre de un hospedador infectado que tiene tripomastigotes circulantes. Una vez en el intestino del vector los parásitos se transforman en epimastigotes que se multiplican extracelularmente. Después de migrar al intestino posterior del insecto los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos, formas no multiplicativas, que son eliminadas con las heces cuan-

do el insecto se alimenta nuevamente. La transmisión al nuevo hospedador mamífero ocurre cuando la conjuntiva, mucosas o cortaduras en la piel son contaminadas con las heces conteniendo los tripomastigotes metaciclícos. Dentro del nuevo hospedador estos parásitos penetran en diversas células en donde se transforman en amastigotes y se reproducen. Cuando los amastigotes en reproducción llenan la célula hospedadora se transforman de nuevo en tripomastigotes y rompen la célula. Los parásitos liberados invaden los tejidos adyacentes y se diseminan por la sangre a sitios distantes en donde inician nuevos ciclos reproductivos. De esta forma mantienen su presencia en la sangre para infectar a los vectores y continuar su ciclo (Carlier Y. et al., 2001).

Reservorios animales

Originalmente, la enfermedad de Chagas era exclusivamente una zoonosis que afectaba a numerosos triatomíneos selváticos y a animales salvajes en focos naturales, de los cuales estaban ausentes los seres humanos y los animales domésticos. Como resultado del contacto del hombre con el vector (en los asentamientos rurales, por ejemplo) y de las modificaciones sufridas por los hábitats naturales, la enfermedad se propagó a los ciclo domiciliarios y peridomiciliarios.

En casi todos los países donde el *Trypanosoma cruzi* es endémico se han registrado ciclos de transmisión que involucran a una amplia gama de huéspedes. En la actualidad, se ha registrado la infección por el *T. Cruzi* en más de 150 especies de 24 familias de mamíferos silvestres y domiciliarios o peridomiciliarios. El perro y en ciertas regiones la zarigüeya y los roedores son probablemente los huéspedes reservorios más importantes dentro del ciclo peridomiciliario, destacándose en el ciclo selvático la zarigüeya y el armadillo.

Distribución geográfica

Los huéspedes reservorios animales del *T. cruzi* tienen una amplia distribución geográfica, que en líneas generales coincide con la de los triatomíneos (latitudes 43° N en los Estados Unidos de América hasta 46° S en la Argentina).

Función e importancia de los huéspedes reservorios animales en los ciclos selvático y doméstico del T. cruzi.

La importancia y el papel que desempeña un huésped reservorio animal en los ciclos vitales selvático y doméstico del *T. cruzi* se vincula con la especie a que pertenece; su hábitat o ecotopo (domiciliario, peridomiciliario o selvático); el alcance de su dispersión; su densidad poblacional; su distribución geográfica; su disponibilidad con respecto al vector y el grado de contacto con éste; las preferencias tróficas de los vectores y las relaciones parásito/reservorio-huésped.

En el ciclo vital doméstico de la transmisión parasitaria, el ser humano es el huésped reservorio más importante. Existe un contacto estrecho entre las personas y los insectos triatómicos domiciliarios en el limitado espacio intradomiciliario, y los insectos frecuentemente pican a las personas durante el sueño nocturno.

Huéspedes reservorios animales domiciliarios y peridomiciliarios

En el ciclo vital doméstico participan los triatómicos domiciliarios y varios animales domésticos. A causa de la permanente disponibilidad de sangre, la densidad de los triatómicos domiciliarios es elevada y el contacto entre el ser humano y el vector es estrecho. Aunque las probabilidades de transmisión por cada contacto entre el ser humano y el vector sean bajas, el índice general de transmisión puede ser elevado cuando el contacto es frecuente.

Se ha establecido que la mayoría de las especies de pequeños animales domésticos se infectan con *T. cruzi*, pero solo unos pocos sufren un índice elevado de infección. Los animales domésticos de mayor tamaño (cerdos, caballos y vacas, por ejemplo) no se infectan con frecuencia.

Los pollos y las palomas no son susceptibles a la infección por *T. cruzi*

Animales selváticos huéspedes reservorios

Numerosas especies arbóreas y terrestres de mamíferos se encuentran involucrados en el ciclo selvático; se han recibido notificaciones de casi todos los países americanos sobre infecciones naturales por *T. cruzi*. Algunas especies invaden las zonas peridomiciliares, donde probablemente incrementen el riesgo de transmisión al ser humano.

Relaciones entre huéspedes reservorios y parásitos

En la relación entre los huéspedes reservorios animales y los parásitos existe una interacción sumamente dinámica. Aunque generalmente los huéspedes selváticos infectados presentan una parasitemia muy elevada, al parecer el parásito no los afecta adversamente. En el ciclo doméstico de la enfermedad, sin embargo, algunos animales pueden sufrir efectos adversos; así por ejemplo, perros infectados naturalmente a veces presentan lesiones crónicas. Los animales jóvenes son generalmente más susceptibles que los adultos. Algunos animales, como la cabra y algunas especies de rata, aparentemente pueden eliminar la infección.

Formas de transmisión a seres humanos

En las zonas rurales de Latinoamérica, el *Trypanosoma cruzi* se transmite a los seres humanos a través de las heces de los insectos triatomíneos infectados. En las ciudades, sin embargo, donde los triatomíneos se encuentran presentes sólo ocasionalmente como resultado de una introducción accidental, el parásito se transmite principalmente por transfusión sanguínea o congénitamente; otros medios de transmisión son la contaminación por la boca, el trasplante de órganos infectados, menos comúnmente, la infección en el laboratorio.

Transmisión por el insecto vector

En la mayoría de los casos de enfermedad de Chagas, la transmisión puede efectuarse mediante una de las siete especies domiciliarias: *Tryatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *Pastrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus* y *R. pallescens*. Estas especies son características de los espacios abiertos de América Central y del Sur, sean ellos zonas naturales o bien hábitats preparados por el hombre.

La transmisión vectorial (por las heces de los triatomíneos) es responsable del 80% de las infecciones humanas. La entrada de los tripomastigotes metacíclicos por la mucosa (oral o conjuntival) es fácil. La penetración directa a través de la piel parece más difícil y generalmente el parásito entra por el sitio de la picadura o por abrasiones del rascado.

Transmisión por transfusión sanguínea

La transfusión de sangre infectada es responsable del 5-20% de los casos humanos de enfermedad de Chagas, principalmente en los centros urbanos.

Transmisión congénita

La transmisión maternofetal (congénita o vertical) ocurre en 2-10% de los niños de madres infectadas. A diferencia de la toxoplasmosis, la transmisión vertical del *T. cruzi* puede ocurrir en cada embarazo, tanto en la etapa aguda como en la crónica. La transmisión por la leche materna es extremadamente rara.

Transmisión oral

La transmisión oral se relaciona con la ingestión de alimentos contaminados con las heces del vector. Este modo de transmisión se ha observado en los colonizadores de áreas amazónicas.

Transmisión por trasplante de órganos

El trasplante de órganos de donantes infectados es una nueva forma de transmisión de *T. cruzi* que ha sido objeto de escasa atención. Los pacientes que han recibido órganos de donantes con enfermedad de Chagas crónica han sufrido episodios agudos de enfermedad y el parásito ha sido aislado de sangre periférica.

Aspectos clínicos

La evolución clínica de la enfermedad se inicia después de un período de incubación de dos a cuatro semanas.

Se reconocen tres fases en la enfermedad de Chagas: una fase aguda corta y una fase crónica de larga duración, separadas por una fase clínicamente asintomática llamada fase indeterminada. En la primera y tercera fases pueden verse afectados diversos órganos y la enfermedad puede ser mortal en cualquiera de ellas.

Fase aguda

Se caracteriza por producir malestar general con diversas manifestaciones clínicas. Los síntomas pueden ser muy leves y atípicos, razón por la cual la enfermedad con frecuencia no se detecta en esa fase; en efecto, se diagnostica sólo en el 1-2% de todos los pacientes, pasando desapercibida en los casos restantes. Coincide con una intensa multiplicación parasitaria en los tejidos y elevada parasitemia. La fase aguda de la enfermedad de Chagas puede

presentarse a cualquier edad, pero en la zonas altamente endémicas, los casos reconocidos generalmente se detectan en personas menores de 15 años, y en su mayoría menores de 10 años. Cuanto más joven el paciente, más importantes son las manifestaciones clínicas, siendo la enfermedad muy grave y aun mortal en niños menores de dos años.

La inflamación localizada en la puerta de entrada del *T. cruzi* se llama chagoma. Los signos y síntomas son diferentes según el sitio de la infección. Cuando ocurre una infección a través de la conjuntiva o la piel del párpado, se forma una celulitis perioftálmica rojiza, indolora, con un característico edema unilateral bpalpebral y linfadenitis regional. El chagoma del ojo (signo de Romaña) aparece en más del 90% de los pacientes diagnosticados como recién infectados. Son menos características las infecciones en otras partes del cuerpo: pueden asemejarse a erisipelas o tumor dérmico o tener forma de forúnculos o nódulos subcutáneos. Tales lesiones pueden también estar relacionadas con linfadenitis regional.

Los síntomas generales de la enfermedad de Chagas en su fase aguda son fiebre, agrandamiento del hígado y del bazo, edema generalizado y adenomegalia. A veces se presenta un exantema generalizado, como también anorexia, diarrea y vómitos.

Fase indeterminada

Esta fase comienza unas 8-10 semanas después de la fase aguda, haya habido o no manifestaciones clínicas y puede durar varios años o indefinidamente. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y el enfermo tiene plena capacidad para realizar actividades físicas, y sus electrocardiogramas y radiografías torácicas son normales. La respuesta inmune provoca una disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Durante esta etapa indeterminada, la mayoría de los pacientes no tienen conciencia de que están infectados con *T. cruzi*, y durante este largo intervalo constituyen un importante reservorio de la infección y contribuyen a mantener el ciclo vital del parásito.

Fase crónica

Se estima que hasta el 30% de las personas que sufren la forma indeterminada de la infección sufrirán un daño cardíaco, digestivo o neurológico unos 10-20 años después de haber contraído la enfermedad, mientras que en los demás enfermos no se manifestará ninguna alteración orgánica. Se caracteriza por una reducida parasitemia.

Tratamiento

Deben considerarse dos aspectos principales del tratamiento de la enfermedad de Chagas: el tratamiento tripanosomicida y el tratamiento sintomático de las distintas formas clínicas de la enfermedad.

Tratamiento tripanosomicida es el indicado para los pacientes que sufren enfermedad de Chagas aguda, la mayoría de los cuales son jóvenes y, por lo tanto, toleran mejor que los adultos los efectos de los fármacos empleados. El nifurtimox (un derivado del nitrofurán) y el benznidazole (un nitroimidazole) son fármacos eficaces tanto contra los tripomastigotes como contra los amastigotes. El nifurtimox se administra en dosis diarias de 10mg por kg de peso corporal a los adultos y de 15mg por kg de peso a los niños durante 60-90 días, mientras que el benznidazol se administra en dosis diarias de 5-10mg/kg durante 30-60 días.

Debido a que no se dispone de información acerca de la eficacia del tratamiento tripanosomicida en la prevención del desarrollo de la enfermedad de Chagas crónica, no está indicado durante la fase indeterminada de la infección.

Actualmente existe el consenso de que los pacientes en la fase crónica de la enfermedad, con lesiones orgánicas manifiestas, no se benefician con el tratamiento tripanosomicida.

Factores de riesgo de infección por *T. cruzi*

Las infecciones por *T. cruzi* están muy difundidas en los animales de todas las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, y la enfermedad de Chagas es endémica en el ser humano en la mayor parte de América Central y del Sur, donde debido a las condiciones socioculturales existe un estrecho contacto entre las poblaciones humanas y los insectos vectores. Los vectores, por su parte, han cambiado sus hábitats y su adaptación ha sido tal que comparten naturalmente con el hombre los ámbitos domiciliario y peridomiciliario en la mayoría de las zonas rurales de América Latina. La enfermedad de Chagas es el resultado de la interacción del *T. cruzi*, los insectos reduvidos y las personas que viven en condiciones socioculturales inadecuadas. Tal interacción depende de la coexistencia del agente etiológico, el insecto vector, el animal reservorio y la persona susceptible dentro de un marco de factores geográficos y climáticos y en combinación con una serie de condiciones culturales, sociales y económicas. Estos factores y condiciones determinan la colonización, alimen-

tación y reproducción de los vectores, la disponibilidad de reservorios y la presencia del huésped humano.

Factores biológicos

Entre los factores biológicos que influyen en el riesgo de infección humana se incluyen las siguientes variables relacionadas con el vector: a) hábitos fisiológicos de alimentación y defecación; b) antropofilia; c) adaptación a la colonización de viviendas humanas; d) susceptibilidad a la infección; e) resistencia a los insecticidas; f) densidad de las colonias, y g) disponibilidad de huéspedes reservorios.

Con respecto al *T. cruzi*, entre los factores que influyen en el riesgo de infección humana se incluyen: a) disponibilidad y movilidad de los reservorios (ciclos domiciliario, peridomiciliario y selvático); b) infectividad de las cepas, y c) forma morfológica en el momento de la ingesta del parásito por el vector.

Factores sociales

En las zonas rurales de América Latina, la construcción y terminación de la mayoría de las viviendas humanas son inadecuadas y se emplean materiales tales como palos y arcilla para las paredes sin revocar y techos de paja y palma, que son materiales que ofrecen excelentes hábitats para los triatomíneos. Esta situación tiene su origen en la evolución económica y cultural de la sociedad rural de América Latina en general y está asociada a prácticas de economía doméstica, hábitos individuales y patrones psicosociales. Estas características dan lugar a que sobrevengan cambios en los hábitats naturales de los vectores, los cuales invaden las viviendas humanas y transforman las zonas peridomiciliarias en lugares de multiplicación y focos de dispersión de sus colonias. Además, los patrones socioculturales también favorecen el movimiento frecuente de las poblaciones humanas y la infestación pasiva de las viviendas por parte de los vectores alojados en los objetos y productos que se transportan de la morada anterior a la nueva. Las migraciones humanas, sean estacionales o recurrentes, que responden a la necesidad de buscar mejores condiciones de vida, no solamente aumentan el riesgo de la dispersión pasiva de los vectores al trasladarlos con los enseres hogareños, sino que también incrementan la contaminación de los bancos de sangre debido a que los migrantes pobres a menudo venden sangre (OMS, Control de la Enfermedad de Chagas, 1991).

Métodos de prevención y control

Diagnóstico

El *Trypanosoma cruzi* es un microorganismo antigénicamente complejo que induce en el huésped mamífero una vigorosa y compleja respuesta inmune específica y altera en forma inespecífica y generalizada la funcionabilidad del sistema inmune.

Las pruebas diagnósticas, tanto a nivel individual como poblacional, deben permitir determinar la presencia de infección al tiempo del estudio o en algún momento del pasado.

Para ello, el diagnóstico de laboratorio se basa en procedimientos diseñados para poner de manifiesto al parásito o detectar la presencia de anticuerpos circulantes.

Si bien la demostración de la presencia del parásito constituye un diagnóstico de certeza de la infección, sólo es posible practicarlo con éxito en la etapa aguda de la infección, cuando la concentración de formas circulantes del *T. cruzi* en el organismo es relativamente alta. En etapas posteriores, el diagnóstico debe apoyarse en la detección de elementos que señalen indirectamente la existencia de la infección, tales como antígenos parasitarios circulantes o, más comúnmente, anticuerpos séricos. (CURA E. N. Et al., 1992).

Métodos parasitológicos

Métodos directos.

Por lo general, la observación directa del parásito se efectúa en la sangre. Las técnicas más comúnmente empleadas son el frotis sanguíneo delgado, el frotis sanguíneo grueso o el examen de una muestra de sangre fresca colocada entre el portaobjetos y el cubreobjetos. En tanto que el examen de preparaciones coloreadas permite la caracterización morfológica del parásito (lo cual es importante en zonas donde también se encuentra *T. rangeli*), las preparaciones con sangre fresca permiten detectar más fácilmente los parásitos debido a su movilidad. Los métodos de concentración de parásitos aumentan la probabilidad de detectar la parasitemia. El más sencillo es el de la centrifugación de la sangre. Otro método consiste en dejar que la sangre se coagule, centrifugar el suero a baja velocidad para eliminar los glóbulos rojos restantes y luego centrifugar a una mayor velocidad (600 g) para concentrar los parásitos en el sedimento (método de Strout). Una manera eficiente de modificar este método es colectar sangre en un tubo capilar heparinizado, centrifugar el tubo y examinar bajo el microscopio la

interfase entre los glóbulos rojos y la capa amarillenta de leucocitos. También puede cortarse el tubo capilar a un nivel entre los glóbulos rojos y la capa amarillenta y luego examinar una gota bajo el microscopio. Sin embargo, este último procedimiento implica un riesgo de contaminación.

Pueden emplearse, asimismo, la centrifugación y la observación microscópica directa para detectar parásitos en el fluido cefalorraquídeo.

Métodos indirectos.

Los métodos indirectos permiten la multiplicación de los parásitos en la muestra colectada, ya sea en el vector (xenodiagnóstico) o en medios de cultivo (hemocultivo).

Xenodiagnóstico.

Para el xenodiagnóstico es necesario contar con triatomíneos libres de infección criados en el laboratorio. La técnica es emplear 40 ninfas de tercer estadio, distribuidas 10 por caja y se ponen en contacto con la piel del paciente para que se alimenten de su sangre. A los 30 y 60 días después de la succión de sangre se examinan sus heces trypomastigotes o epimastigotes del *T. cruzi*. Una fuente de error en el xenodiagnóstico es la presencia de *T. rangeli*, que se encuentra en seres humanos (pero no es patogénico) en Centroamérica y el norte de Sudamérica. En este caso, además de las heces deben examinarse también la hemolinfa y la saliva del *R. Prolixus* para detectar el *T. rangeli*, porque aunque este último, al igual que el *T. cruzi*, es un tripanosoma estercoráceo (se desarrolla en el intestino del insecto vector) más tarde migra a las glándulas salivares.

Hemocultivo.

Cada vez con más frecuencia se utiliza el cultivo sanguíneo para la amplificación de los parásitos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en las zonas endémicas. Se emplean medios líquidos, tales como LIT (infusión de hígado y triptosa) o BHI (infusión de cerebro-corazón), y la eficacia del método puede aumentarse mediante la centrifugación diferencial de la sangre antes de inocular el medio. En la etapa crónica de la enfermedad se pue-

den detectar parásitos en el 40-50% de los pacientes. Para evaluar la curación después del tratamiento se utilizan repetidos cultivos sanguíneos, juntamente con métodos serológicos.

Métodos serológicos

En una etapa inicial de la infección, los anticuerpos contra el *T. cruzi* se encuentran en la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por anticuerpos IgG a medida que progresa la enfermedad. Las concentraciones totales de IgM son más elevadas en personas con infección aguda que en las personas no infectadas, pero no aumentan las concentraciones de inmunoglobulina durante la etapa crónica.

Entre las diversas pruebas serológicas disponibles para el diagnóstico de la infección por el *T. cruzi*, las más difundidas son la prueba de fijación del complemento (FC o prueba de Guerrero Machado); la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI); la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). la prueba de aglutinación directa, con o sin tratamiento del suero con 2-mercaptoetanol (AD y 2-MEAD), y el inmunoensayo enzimático (ELISA). Otras pruebas que se han empleado, pero que no son de uso corriente, son la de inmunoperoxidasa, que es similar a la IFI, excepto que se emplea un conjugado rotulado de peroxidasa en lugar de uno fluorescente; una prueba de inmunodifusión; una prueba de ELISA "dot-blot", y una prueba ELISA de captura utilizando anticuerpos monoclonales. Se utiliza, así mismo, una prueba de aglutinación de látex para pruebas de selección en bancos de sangre.

Los antígenos empleados en esas pruebas son:

- Prueba de fijación de complemento (FC). Se han empleado extensamente extractos acuosos o de metanol del *T. cruzi* entero, pero han sido sustituidos por fracciones purificadas del parásito en un intento de normalizar la sensibilidad y especificidad.

- Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los epimastigotes fijados con formol son antígenos estables. La IFI ofrece la ventaja de que puede emplearse para diferenciar anticuerpos IgM de los IgG.

- Prueba de hemaglutinación indirecta (HAI). Los antígenos son fracciones de polisacáridos o de glicoproteínas de epimastigotes. Los glóbulos rojos sensibilizados con estos antígenos pueden almacenarse liofilizados o en suspensión.

-Prueba de aglutinación directa (AD y 2-MEAD). El antígeno consiste en epimastigotes enteros tratados con tripsina fijados con formol y filtrados para prevenir la autoaglutinación. Esta prueba puede emplearse para la detección de anticuerpos IgG o IgM.

-ELISA. El antígeno consiste en conjugados rotulados de peroxidasa o fosfatasa o fracciones del *T. cruzi* adsorbidas a platos de polivinilo y otros materiales, y es estable. La prueba puede usarse para la detección de anticuerpos IgG o IgM.

-Aglutinación de látex. Se usan partículas de poliestireno adsorbidas con extractos de *T. cruzi*.

Para la mayoría de los métodos disponibles para el diagnóstico serológico se requieren reactivos que deben almacenarse a 4 °C. La prueba de FC es la que requiere mayor número de reactivos normalizados. Los antígenos para AD, HAI y ELISA pueden mantenerse a temperatura ambiente. Para la prueba de ELISA se necesita un dispositivo de lectura y para el IFI un microscopio fluorescente. Para la prueba de inmunoperoxidasa indirecta se debe disponer de un microscopio óptico. Para fines de selección, la prueba de látex es la más sencilla, pero las muestras positivas deben confirmarse mediante otras pruebas. Si se dispone de equipos de microtitulación, se recomienda la combinación de 2-MEAD con AD, HAI, IFI o ELISA para obtener resultados cuantitativos.

La prueba que más precozmente puede dar resultados positivos durante la infección es la IFI para la detección de anticuerpos IgM seguida por la combinación de la 2-MEAD y AD, que también detectan anticuerpos IgM. Subsiguientemente dan resultados positivos la IFI-IgG, la FC y la HAI. En personas que sufren infección crónica con parasitemia comprobada, todas las pruebas mencionadas han dado resultados positivos en un 95% de las muestras de suero. No obstante, pueden ocurrir reacciones falso-positivos con sueros provenientes de pacientes con leishmaniasis o de personas que han adquirido el *T. rangeli*. (OMS, Control de la Enfermedad de Chagas. 1991).

Los métodos a utilizar para el diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas dependerán de la etapa clínica que curse el paciente, ya que según la misma las características biológicas y patológicas del agente son diferentes.

En las etapas iniciales de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes, las que a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias. Por lo tanto, al inicio de la infección los estudios van a centrarse en la búsqueda del

agente, mientras que en las etapas latente y crónica el diagnóstico se realiza fundamentalmente por los métodos serológicos.

Etapas aguda

En esta etapa se incluyen, además de los cuadros agudos por transmisión vectorial, los cuadros producidos por transmisión sanguínea, por trasplante de órganos, la reactivación en inmunodeprimidos y transmisión congénita.

Los estudios estarán centrados en la búsqueda de *T. cruzi* en sangre, por lo que deberán ser realizados por personal debidamente entrenado en el diagnóstico y reconocimiento de dicho protozoo parásito.

La sensibilidad de los mismos es variable, por lo que se aconseja mantener la siguiente rutina diagnóstica de acuerdo a protocolos establecidos:

-Examen directo: búsqueda de *T. cruzi* en sangre periférica. Es un método 100% específico, pero de muy baja sensibilidad, dando numerosos falsos negativos, ya que la observación de los mismos depende del tamaño de la gota y la cantidad de parásitos circulantes.

-Método de Strout: este método concentra los elementos parasitarios mediante centrifugación. La especificidad es de 100% y la sensibilidad de 95%.

-Microhematócrito: la sangre es extraída por capilaridad mediante punción digital o plantar en tubos de microhematócrito, centrifugándose posteriormente. Este método es recomendado en los recién nacidos, por la escasa cantidad de sangre utilizada. Su sensibilidad es de 95% y la especificidad de 100%.

-Xenodiagnóstico: este método continúa siendo el de elección en la etapa aguda, por su especificidad de 100% y sensibilidad cercana a 100% en esta etapa, debido a la amplificación parasitaria producida.

-Hemocultivo: consiste en la siembra de sangre venosa en un medio apropiado en busca de crecimiento parasitario.

Etapas latente y crónica

En estas etapas, las parasitemias son transitorias, por lo que la detección del parásito en sangre es totalmente aleatoria. El diagnóstico se basa en el hallazgo de anticuerpos circulantes anti *T. cruzi*, los que pueden ser detectados desde las primeras semanas de infección.

Se recomienda utilizar al mismo tiempo por lo menos dos técnicas complementarias para identificar a un paciente como chagásico, siendo una de ellas, en lo posible, la inmunofluorescencia indirecta (IFI).

-Inmunofluorescencia indirecta (IFI): la sensibilidad es de 100% en estas etapas, y su especificidad es cercana a 100%. Se consideran títulos significativos las diluciones superiores a 1/30.

-Hemaglutinación indirecta (HAI): se consideran títulos significativos los superiores a la dilución 1/16.

-ELISA(Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima): se destaca su utilización para "screening" por su alta sensibilidad.

Existen actualmente diversas técnicas en estudio para el diagnóstico de esta enfermedad. Caben citar, por ejemplo, ELISA directo para la detección de antígenos en la etapa aguda, tanto en sangre como en orina; la búsqueda de enzimas parasitarias en sangre, y lo que parece más prometedor, la detección de ADN parasitario mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Enfermedad de Chagas congénita

Esta vía de transmisión excede el área de transmisión endémica vectorial pudiendo ocurrir en zonas no endémicas.

El riesgo de transmisión está presente durante cualquier etapa de la infección materna y el parásito puede infectar al feto con o sin compromiso placentario. Cuando existen lesiones placentarias pueden ser desde escasos infiltrados linfocitarios con presencia de nidos de amastigotes hasta lesiones con grave destrucción celular.

La posibilidad de acceder a un tratamiento etiológico curativo únicamente en la etapa aguda de la enfermedad hace extremar las precauciones para el diagnóstico temprano de la infección congénita.

Los métodos diagnósticos de elección son aquellos que permitan la identificación del agente mediante la observación directa.

Se buscará IgM específica por IFI, aglutinación directa (AD) o ELISA de captura. Si es positiva, intensificar la búsqueda del parásito.

Enfermedad de Chagas transfusional

El riesgo de transmisión del parásito por transfusión de sangre radica en las características biológicas de éste, que sobrevive en sangre total mantenida a 4°C por períodos prolongados, en hemoderivados de sangre, concentrados de glóbulos rojos y crioprecipitados. Siendo viable hasta 250 días en muestras con citrato, a temperatura ambiente y en sangre refrigerada hasta 18 días (Rosa R. et al., 2001).

La utilidad y aplicabilidad de las pruebas serológicas de diagnóstico no son universales. Las diferencias parten, entre otras condiciones, de las distintas situaciones epidemiológicas, de los recursos disponibles y de la organización de los servicios de salud donde se emplean.

El diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas puede efectuarse con dos criterios distintos: a) de “tamizaje” (“screening”), para identificar fácilmente a un presunto infectado crónico, por ejemplo, un donador de sangre; y b) de confirmación, por lo menos con dos reacciones serológicas normatizadas, cuando así lo exijan las necesidades clínicas o epidemiológicas. Para el primer caso, sin duda, son preferibles las técnicas de alta sensibilidad (prueba de aglutinación y Ensayo Inmunoenzimático). En el diagnóstico confirmado se deben combinar distintas reacciones serológicas considerando qué tipo de anticuerpos se demuestran. Para el Chagas es aconsejable que una de las reacciones utilice un antígeno total (IFI, FC, IEE, HAI). Practicando simultáneamente dos reacciones serológicas, se puede efectuar el diagnóstico de infección chagásica con una sensibilidad y una especificidad cercanas al 100%. Si las dos reacciones efectuadas coinciden en sus resultados, se puede certificar o descartar un diagnóstico de infección chagásica. Las muestras con resultados discordantes se pueden analizar con otras técnicas y, si la discordancia se repite, solicitar una nueva muestra (CURA E. N., et al 1992).

Reacciones serológicas clásicas utilizadas para el diagnóstico de Chagas

La reacción de Fijación de Complemento se basa en el principio de la hemólisis que produce el complemento cuando se fija a hematíes sensibilizados. Esta reacción, mediante un sistema indicador, permite determinar la fijación del Complemento a cualquier complejo antígeno-anticuerpo. El reactivo indicador es el sistema hemolítico (hematíes de carnero y hemolisina) el que, añadido en segunda instancia al tubo que contiene el complejo antígeno-

anticuerpo que se analiza y Complemento, dará hemólisis o no, según exista o no Complemento libre. De haber Complemento libre, significa que no hay correlación entre el antígeno y anticuerpo analizado, en tanto que la ausencia estaría indicando que el Complemento ha sido fijado por el primer sistema y que en este caso Antígeno y Anticuerpo se relacionan.

La reacción de Hemoaglutinación Indirecta está basada en la modificación de la membrana de los hematíes por medio de ácido tánico. Los glóbulos así tratados se comportan como partículas inertes capaces de adsorber los antígenos parasitarios. Estos hematíes sensibilizados aglutinan cuando se ponen en presencia de sueros con anticuerpos específicos.

La reacción de Inmunofluorescencia Indirecta se basa en la capacidad de las proteínas de unirse a ciertos colorantes fluorescentes sin alterar sus propiedades inmunológicas, pudiendo por lo tanto actuar normalmente al antígeno específico. Esto permite observar al microscopio la unión antígeno-anticuerpo, evidenciada por la fluorescencia que adquiere el microorganismo antigénico al unírsele el anticuerpo fluorescente. Basándose en este principio se emplean anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes como el Isotiocianato de fluoresceína o lisamina-rodamina. Esta sustancia al ser excitada con longitudes de onda del rango ultravioleta, emiten luz de mayor longitud, la que se demuestra por fluorescencia amarillo verdosa o anaranjado-rojiza, respectivamente. En la IFI se emplea como reactivo marcado un suero antigammaglobulina (contra la gammaglobulina de la especie animal de la que proviene el anticuerpo). Se lo hace actuar sobre el complejo antígeno-anticuerpo no marcado que ha reaccionado en una primera etapa.

La reacción de Ensayo Inmunoenzimático o ELISA se basa en la conjugación de una enzima a una antiglobulina humana. La actividad enzimática, medida por adición del sustrato específico, con desarrollo de una reacción de color, es una función directa de la cantidad de conjugado ligado al complejo antígeno-anticuerpo y en consecuencia a la concentración de antígeno o anticuerpo presentes en la muestra biológica (SEGURA E. L. et al., 1986).

FUCHS *et al.*, (1980) encontraron que las reacciones serológicas IFI y ELISA presentaron mayor sensibilidad (95.2% y 98.5%) que la FC y HAI (73.1% y 75.2%). Por su parte, CURA y WENDEL (1994) reportaron para FC valores de sensibilidad de 90-95%, después de 4-6 semanas de infección; para ELISA, una sensibilidad mayor de 99.0% y especificidad adecuada; para HAI, una sensibilidad y especificidad variable; y para IFI, alta sensibilidad y especificidad (98-99%) .

Otra prueba serológica utilizada para el diagnóstico de Chagas es la reacción de Aglutinación de Látex, basada en la utilización de un soporte inerte (látex) al que se adsorben los antígenos parasitarios sin alterar sus propiedades, permitiendo visualizar la reacción antígeno-anticuerpo en presencia de sueros con anticuerpos específicos (CERISOLA et al., 1980).

La prueba de Látex para el diagnóstico de Chagas ha sido evaluada en diferentes grupos de poblaciones en áreas endémicas. En 1975 ENDERS *et al.*, en un estudio realizado en varios laboratorios sudamericanos, encontró que la sensibilidad de la prueba de Látex tuvo una coincidencia de 90% con el Xenodiagnóstico; de 88% con FC; de 75% con IFI y de 83 % con HAI.

En 1980 CERISOLA *et al.*, en Buenos Aires, Argentina desarrollaron una prueba de Aglutinación de Látex, reportando una sensibilidad de 97.3% y una especificidad de 95% tomando como referencia la seropositividad de las pruebas IFI, HAI y FC. En la fase aguda la prueba fue positiva en el 71.9% de los casos, mientras que la IFI lo fue en el 84.3%.

SCHATTSCHNEIDER et al.(1992) encontraron que, mientras la Aglutinación en Látex (LA), IFI y ELISA identificaron el 81% de pacientes brasileños con enfermedad de Chagas aguda, la FC no diagnosticó esta fase de la enfermedad. En estados tardíos la FC mostró una sensibilidad de 69% comparada con el 100% de LA, IFI y ELISA, independientemente que fueran casos crónicos asintomáticos o sintomáticos. Reactividad cruzada con anticuerpos anti-*Leishmania* fue observada en 23%, 38% y 77% de muestras de suero en LA, ELISA e IFI, respectivamente, pero no en la FC.

En un estudio de evaluación de métodos serológicos realizado por MATTA et al.(1993), en Guatemala, la prueba de látex de la casa Weiner mostró el más alto valor predictivo positivo y una eficiencia de 93% en relación a IFI, como prueba de referencia.

Una prueba comercial de Látex (Cruzi-Látex), desarrollada recientemente en Guatemala (FONACIT, 1998), mostró una excelente correlación con otras pruebas serológicas y una sensibilidad de 100%.

La enfermedad de Chagas es endémica en 18 países de Centro y Sur América. Conforme estimaciones recientes (TROPICAL DISEASE RESEARCH, 1999) 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas, 100 millones están expuestas a riesgo de infección y anualmente ocurren 150.000 nuevos casos. De los infectados aproximadamente un 30% des-

arrollará la enfermedad crónica caracterizada por cardiopatías y dilataciones de las vísceras huecas y más de 45.000 mueren al año de esta enfermedad.

De acuerdo al reporte de desarrollo humano de la UNDP, el promedio anual del producto nacional bruto per-cápita en América Latina es de US\$ 2,966. Por tanto, la enfermedad de Chagas en jóvenes adultos económicamente más productivos, asciende corrientemente a US\$ 8,156 millones, lo que equivale a 2.5% de la deuda externa del Continente en 1995 (WHO CHAGAS DISEASE, 2000).

La enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida en la región centroamericana habiéndose encontrado seroprevalencias de 27% a 67% en Honduras (PONCE *et al.*, 1992), 9% a 46.7% en El Salvador (CEDILLOS, 1975), 15% en Guatemala (GREER *et al.*, 1999), y 2% en Costa Rica (REYES *et al.*, 1998).

La existencia de la enfermedad de Chagas en Nicaragua fue reportada por primera vez en 1971 por URROZ *et al.*, siendo identificadas dos especies vectoras: *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*. En 1995, RIVERA *et al.*, realizaron un estudio seroepidemiológico y clínico de la enfermedad en comunidades rurales de los departamentos de Madriz, Masaya y León, encontrando prevalencias de 13.1, 4.3 y 3.2% respectivamente. En el aspecto clínico, las alteraciones electrocardiográficas en los seropositivos no fueron significativamente diferentes de las del grupo de control. Una encuesta vectorial realizada en estas comunidades por PALMA-GUZMAN *et al.* (1996) mostró que el 54, 51 y 5.9% de las viviendas estaban infestadas por *Triatoma dimidiata* y que de 50 a 60% de los vectores capturados estaban infectados por *T. cruzi*. Posteriormente, otras encuestas seroepidemiológicas en comunidades rurales o periurbanas (GASTEAZORO *et al.*, 1991; FISHER *et al.*, 1994; MENDOZA & RIVERA, 1994; ALTAMIRANO *et al.*, 1998; ARGUERTA *et al.*, 1999; MORALES W., 2000) han revelado la presencia de la infección chagásica en los departamentos de Nueva Segovia, Matagalpa, Zelaya, Río San Juan, Carazo, Granada y Rivas con prevalencias de 2.4 a 48%. La infección chagásica también se ha reportado en hemodonantes, en diferentes bancos de sangre del país, con frecuencias de seropositividad de 3.7 a 17.5% (HERNANDEZ & PALMA, 1991; PONCE *et al.*, 1998; VELAZQUEZ *et al.*, 1998). Así mismo se ha detectado la infección en 12.2% de embarazadas en Matagalpa (MONTENEGRO *et al.*, 1998) y 10.6% de Somoto (CABALLERO *et al.*, 1998). Tres recién nacidos de las madres seropositivas estudiadas aquí tenían anticuerpos IgM a *T. cruzi*.

En 1997 el Ministerio de Salud de Nicaragua incluyó la enfermedad de Chagas dentro de su programa de control de enfermedades transmisibles y en el marco de la Iniciativa Centroamericana para la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas, promovida por el TDR/OMS (Programme for Research and Training in Tropical Diseases) (OPS/OMS, 1998) ha realizado encuestas seroepidemiológicas en 8 comunidades rurales del departamento de Somoto, reportando seroprevalencias de 6.8 a 13.7%, y una encuesta vectorial en los departamentos de la costa del pacífico y región central del país (Minsa. Boletín Epidemiológico 33-99). En ésta el 96% de los triatomíneos capturados fueron *Triatoma dimidiata*, 3% *Rhodnius prolixus* y 0.4% *Triatoma rickmani* y se reportaron índices de infestación de las viviendas por SILAIS desde 13% en Madriz hasta 0.6% en Chontales. La infección de triatomíneos por *T. cruzi* fue de 14% para *Triatoma dimidiata*, 0.63% para *Rhodnius prolixus* y 0.05% para *Triatoma rickmani*. Además se ha introducido el tamizaje de Chagas en 12 Bancos de Sangre del Sistema nacional de Salud (Minsa. Boletín Epidemiológico 11-01) e implementado el diagnóstico y tratamiento centralizado de los casos agudos de enfermedad y se está aplicando rociado intradomiciliario con Etofenprox al 20%, en todas las localidades con presencia de *Rhodnius prolixus*. Por otra parte se han evaluado estrategias de intervención para el control y erradicación del *Triatoma dimidiata*, encontrándose que la más efectiva fue el rociamiento sólo de las casas infestadas (ACEVEDO, GODOY y SCHOFIELD, 2000). Sin embargo, aún no se emprenden acciones específicas de control y prevención de la enfermedad.

Los datos anteriores demuestran que la infección por *T. cruzi* se encuentra ampliamente distribuida por todo el país, con tasas de prevalencia que van desde 2.4% hasta 48% y se estima que la mitad de la población del país está en riesgo de adquirir la infección. Por lo tanto, la enfermedad de Chagas constituye un problema de salud nacional cuya solución exige no sólo recursos para control y prevención, sino también recursos de diagnóstico y tratamiento en gran escala.

Las pruebas serológicas son el principal recurso para el diagnóstico de la fase indeterminada y la fase crónica de la enfermedad, y también pueden ser útiles en la fase aguda. Los métodos más utilizados han sido la HAI, la IFI y ELISA. Sin embargo, estos métodos son complejos, de coste elevado y requieren de equipo y personal especializado, lo que los hace inadecuados para la implementación de su uso en la mayoría de los laboratorios y bancos de

sangre del Sistema Nacional de Salud. La prueba de aglutinación en látex, por su facilidad de ejecución, bajo costo y buena estabilidad podría constituir el recurso apropiado para las necesidades del país. El test de látex está disponible comercialmente, pero la adquisición de este producto para su uso en gran escala y de manera sostenida representaría un gasto muy elevado para nuestro país. Una alternativa menos costosa sería producir localmente los reactivos. Por tanto se validará una prueba de aglutinación en látex elaborada con antígenos de cepas locales de *T. cruzi*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Validar una prueba de látex para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas elaborada con antígenos de aislados nicaragüenses de *T. cruzi*.

Objetivos específicos

1. Elaborar y estandarizar una prueba de látex para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
2. Determinar sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y concordancia de la prueba de látex elaborada en relación a la IFI.

MATERIAL Y METODO

Tipo de estudio:

Validación de una prueba diagnóstica.

1. Selección y tamaño de la muestra:

Se determinó un tamaño de muestra de sueros positivos y negativos en base a una sensibilidad y especificidad esperada de al menos 90% y límites de confianza de 95%, utilizando una tabla de tamaño de muestra para estudio de variable dicotómica (HULLEY et al., 1993).

De este modo, se utilizarán al menos:

- 139 sueros de reactividad positiva a *Trypanosoma cruzi*, incluyendo de pacientes con infección aguda y crónica, comprobados por IFI (prueba de referencia).
- 139 sueros no reactivos a *Trypanosoma cruzi* determinados por IFI (prueba de referencia).
- Adicionalmente se probarán 100 sueros de reactividad positiva a *Leishmania sp*, *Toxoplasma gondii*, *Palmodium sp* y *Mycobacterium tuberculosis*.

2. Cultivo de las formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Se ensayaron tres medios de cultivos monofásico: 1. Medio del Instituto de Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas (INDIECH) modificado (WYNNE DE MARTINI, 1980) 2. Medio INDIECH (SEGURA et al., 1986) y 3. Medio Infusión Cerebro-Corazón (BHI) , SWEDEN.

Cuyas fórmulas son:

Medio bifásico con sangre para el mantenimiento de cepas.(INDIECH, 1986).

Base:

Nutrient Agar 1.5%	31 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Sobrenadante:

Brain Heart Infusion	37 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Sangre de conejo desfibrinada

Penicilina:	1.000 UI/ml
Estreptomicina:	1 mg/ml
pH: 7.4	

Medio monofásico INDIECH modificado.

Extracto de hígado en pasta	35.00g
Tryptosa	10.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Glucosa	5.00 g
Fosfato disódico con 2 moléculas de agua (Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O)	8.00 g
Cloruro de sodio (NaCl)	4.00 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.04 g
Hemina	0.02g
Agua destilada	1.000 ml
pH 7,8	

Esterilización: 15 minutos a 115°C

2. Medio de cultivo monofásico (INDIECH, 1986).

Extracto de hígado en pasta	10.85 g
Tryptosa	10.00 g
Extracto de levadura	3.00 g
Glucosa	5.00 g
Fosfato disódico con 2 moléculas de H ₂ O (Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O)	10.00 g
Cloruro de Sodio (NaCl)	4.00 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.40 g
Hemina	0.02 g
Agua destilada	1,000 ml
pH 7.2-7.4	

Esterilización: 10 minutos a 1 atmósfera

3. Medio de cultivo monofásico: BRAIN AND HEART (SWEDEN).

Infusión cerebro-corazón	33.00 g
Tryptosa	3.00 g
Fosfato disódico con 2 moléculas de H ₂ O (Na ₂ HPO ₄ -2H ₂ O)	4.00 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.40 g
Glucosa	0.30 g
Hemina (0.03g/ml de NaOH 0.1M)	1.0 ml
Agua destilada	1,000 ml
pH 7.4	
Esterilización: 15 minutos a 1 atmósfera.	

Procedimiento de cultivo

Siembra

A partir de aislados autóctonos de pacientes con enfermedad aguda (cepas de *T. cruzi*: Nicaragua, Nicaragua I, Isayana, Yarrinse y Adiact) y mantenidos en medio de cultivo bifásico (SEGURA E. et al, 1986). Para la siembra inicial. se revisó cada una de las cepas autóctonas a utilizar como semillas. Para ello se observó cada uno de los subcultivos de las cepas (sembrados en medio bifásico en tubos de 10 ml,) en microscopio de luz invertida. Se determinó ausencia de contaminación, buen desarrollo de las formas epimastigotes de *T. cruzi*, buena movilidad.

Una vez seleccionadas las semillas se inoculó (en campana de flujo laminar), previa agitación, 1 ml del cultivo conteniendo, según cada cepa, entre 0.02×10^6 y 1×10^6 epimastigotes ml 25ml de medio monofásico (en erlenmeyers de 250ml).

El cultivo monofásico se mantuvo a 25°C. y se hizo revisión y recuento de los parásitos en cámara de Neubauer cada dos días.

3. Preparación y estandarización de la solución antigénica de látex.

La solución antigénica de látex se preparará según el siguiente procedimiento:

1. Se tomarán 0.5ml de una suspensión de partículas de látex de 0.982 μ m de diámetro al 2.5% en tubo ependorf (1.5-1.9ml de capacidad).
2. Se llenará el tubo con buffer borato 0.1 M, pH 8.5, y se centrifugará por 5-6 minutos en microcentrífuga.
3. Se removerá el sobrenadante usando pipeta Pasteur, se llenará el tubo con buffer borato, se resuspenderán las partículas usando Vortex, y se centrifugará por 5-6 minutos.
4. Se repetirá el paso 3 (dos veces).
5. Se removerá el sobrenadante y se resuspenderá el sedimento en 1ml de buffer borato.
6. Se agregarán 300-400ug de la proteína a acoplar (en masa húmeda) y se incubará toda la noche a temperatura ambiente, mezclando gentilmente.
7. Se centrifugará por 10 minutos. Se guardará el sobrenadante para determinar proteínas. La cantidad de proteínas agregadas en el paso 6., menos la cantidad en el sobrenadante, representará la cantidad adherida a las partículas de látex.
8. Se resuspenderá el sedimento en 1ml de BSA/buffer borato (10mg/ml).
9. Se incubará por 30 minutos a temperatura ambiente mezclando gentilmente.
10. Se centrifugará por 5-6 minutos y se removerá el sobrenadante.
11. Se repetirán los pasos 8. y 10., dos veces.
12. Se resuspenderá el sedimento en 1ml de PBS, pH 7.4, conteniendo 10mg/ml de BSA, 0.1% de NaN₃ y 5% de glycerol.

Se guardará a 4°C. No debe congelarse.

Para determinar las condiciones óptimas de sensibilización de las partículas de látex se titulará el antígeno agregando distintas cantidades del mismo a un volumen fijo de suspensión de partículas de látex. Se incubará esta mezcla a distintas temperaturas, a diferentes tiempos, con y sin agitación, durante el tiempo de incubación, y se determinarán las condiciones óptimas de preparación del reactivo y técnica de la reacción, utilizando sueros patrones de reactividad conocida en la reacción de Inmunofluorescencia Indirecta.

4. Validación de la prueba

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

El principio del método de anticuerpos fluorescentes (Coons 1942) está basado en la capacidad de las proteínas de unirse a ciertos colorantes fluorescentes sin alterar sus propiedades inmunológicas, pudiendo por lo tanto actuar normalmente contra el antígeno específico. Esto permite observar al microscopio la unión antígeno-anticuerpo, evidenciada por la fluorescencia que adquiere el microorganismo antigénico al unírsele el anticuerpo fluorescente. Basándose en este principio se emplean anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes como el Isotiocianato de fluoresceína. Esta sustancia al ser excitada con longitudes de onda del rango ultravioleta, emite luz de mayor longitud, la que se demuestra por fluorescencia amarillo-verdosa. En la IFI se emplea como reactivo marcado un suero antigammaglobulina (contra la gammaglobulina de la especie animal de la que proviene el anticuerpo). Se lo hace actuar sobre el complejo antígeno-anticuerpo no marcado que ha reaccionado en una primera etapa.(SEGURA et al., 1986; margn rt sl., 1996).

Procedimiento:

Las placas portaobjetos con antígeno (epimastigotes de *T. cruzi*), se cubrieron con el anticuerpo no marcado (suero problema) y se dejaron en cámara húmeda a 37 grados C durante 30—60 minutos. Se lavaron tres veces por 5 minutos cada vez con solución salina tamponada; se cubrieron con antigammaglobulina marcada con Isotiocianato de fluoresceína y azul de Evans, como medio de contraste y se dejaron en cámara húmeda 30-60 minutos a 37 grados C. Se lavaron con solución tamponada (igual que el lavado anterior) y se enjuagaron con agua destilada. Se dejaron escurrir y secar y, previamente a la observación microscópica se los montó en glicerina tamponada. La lectura se realizó en microscopio de epifluorescencia con filtro de excitación de 450-490 nanómetros. Las reacciones positivas mostraron fluorescencia amarillo verdosa.

Aglutinación en látex

Se basa en la utilización de un soporte inerte (látex) al que se adsorben los antígenos parasitarios, sin alterar sus propiedades, permitiendo visualizar la reacción antígeno-anticuerpo en presencia de sueros positivos (CERISOLA ET AL., 1980)

Procedimiento

Cualitativo:

Se colocarán volúmenes iguales (0.05ml) de suero problema, sueros control (positivo y negativo) y reactivo de látex en placa fondo blanco o transparente. Se mezclará con varilla y se agitará por rotación suave manual o mecánica (de 2-7 minutos). Las reacciones positivas mostrarán aglutinación visible.

Cuantitativo

Todo suero positivo en el procedimiento cualitativo podrá ser evaluado de forma cuantitativa. Se diluirá el suero en solución salina fisiológica o PBS en diluciones dobles a partir de 1:2. Se realizará el procedimiento igual que el cualitativo con cada dilución hasta obtener un resultado negativo (Cruzi-Látex, Depto. de Citohistología. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos Guatemala).

Una vez preparada la solución antigénica de látex se procederá a su evaluación, comparativamente con la IFI como patrón de referencia o *estándar de oro*. Para ello se estudiarán los sueros que constituirán la muestra.

Con los resultados obtenidos se determinará sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo.

CONCEPTUALIZACION Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTO	PROCEDIMIENTO	VALORES
Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	Prueba para determinación de anticuerpos anti <i>T. Cruzi</i> utilizando sustancias fluorescentes para su detección. Prueba de referencia.	Determinación de la reactividad del suero a dilución de 1:32, detectado por microscopía de epifluorescencia.	Positivo Negativo
Aglutinación en látex	Prueba cualitativa y semi-cuantitativa para determinación de anticuerpos mediante partículas de látex revestidas de antígenos. Prueba a validar.	Determinación de la reactividad del suero por aglutinación en placa de vidrio.	Positivo Negativo

Plan de Análisis

Los datos obtenidos se dispondrán en una tabla de 2x2 para determinar los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo

		Test IFI		
		(+)	(-)	total
Test de látex	(+)	a	b	a+b
	(-)	c	d	c+d
total		a+c	b+d	n

En donde:

a+c=total de muestras con diagnóstico positivo confirmado por IFI.

b+d=total de muestras con diagnóstico negativo confirmado por IFI.

a+b=total de muestras con prueba de látex positivo.

c+d=total de muestras con prueba de látex negativo.

a=muestra con IFI positivo y prueba de látex positivo (verdadero positivo).

b=muestra con IFI negativo y prueba de látex positivo (falso positivo)

c=muestra con IFI positivo y prueba de látex negativo (falso negativo)

d=muestra con IFI negativo y prueba de látex negativo (verdadero negativo)

De allí que:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falso positivos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{falsos positivos}}$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Falsos negativos} + \text{verdaderos negativos}}$$

Adicionalmente se determinará la concordancia de la prueba de látex con la IFI, mediante el índice **Kappa**:

		Test IFI		
		(+)	(-)	total
Test de látex	(+)	a	b	a+b
	(-)	c	d	c+d
total		a+c	b+d	n

$$\mathbf{Kappa} = \frac{\mathbf{Po} - \mathbf{Pe}}{\mathbf{1} - \mathbf{Pe}}$$

$$Pe = \frac{(a+b)(a+c) + (c+d)(b+d)}{n^2}$$

$$Po = \frac{a + d}{n}$$

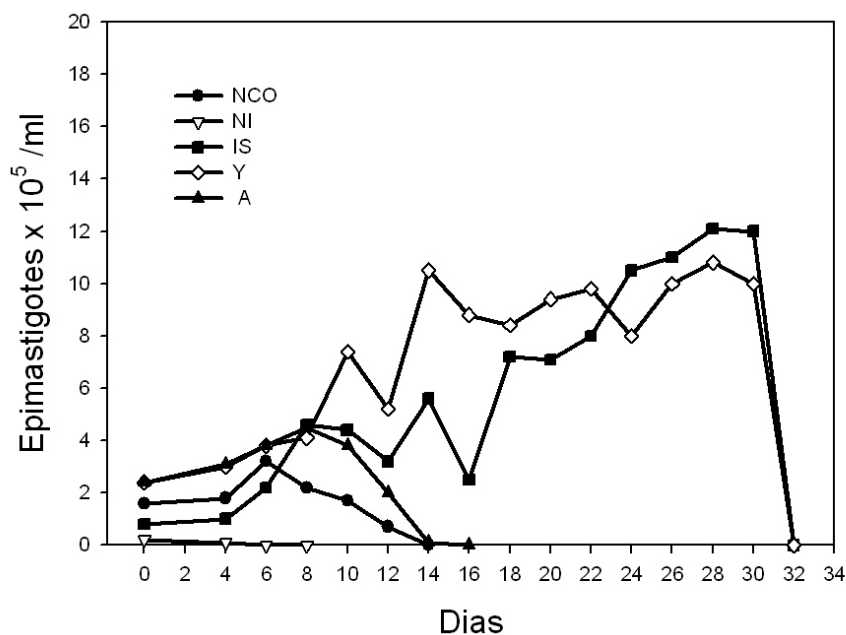
RESULTADOS Y DISCUSION

La producción del antígeno de *T. cruzi* se inició con la adaptación de las formas epimastigotes de *T. cruzi* a un medio de cultivo monofásico a partir de aislados autóctonos (cepas: Nicarao, Nicaragua I, Isayana, Yarrinse y Adiact) de pacientes con enfermedad aguda y mantenidos en medio de cultivo bifásico.(INDIECH, 1986).

Se procedió a estudiar las curvas de crecimiento en los distintos medios, efectuándose las cuentas cada dos días, a partir del quinto repique en el nuevo medio, considerando que en ese momento los epimastigotes del *T. cruzi* de algunas de las cepas estaban ya adaptados al medio en estudio.

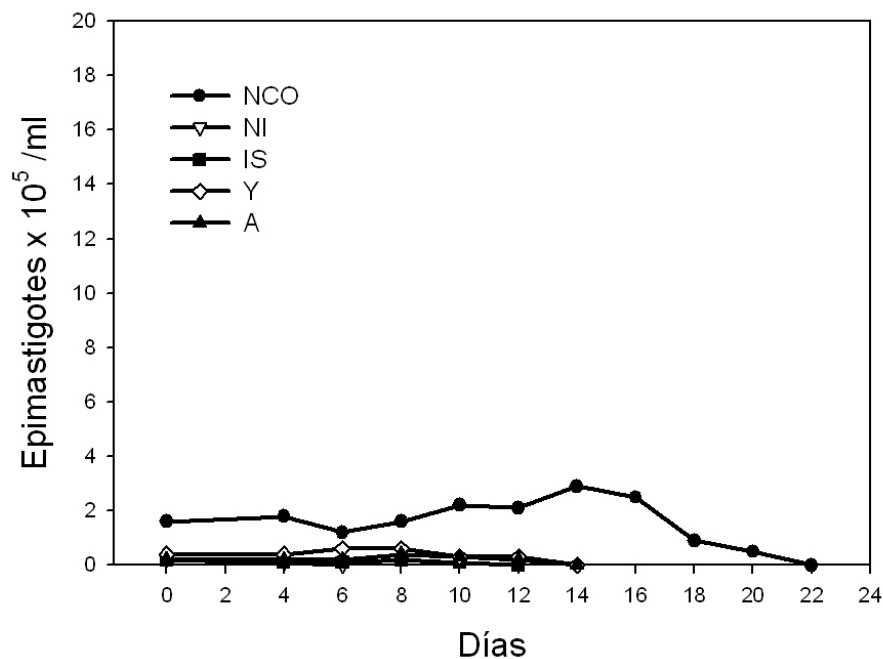
El crecimiento de las 5 cepas de *T. cruzi* en los diferentes medios de cultivo mostró varias diferencias (fig. 1), en el medio del INDIECH modificado (WYNNE DE MARTINI, 1980) las cepas Isayana y Yarrinse alcanzaron un crecimiento máximo de $1.2 \times 10^5/\text{ml}$ a los 6-8 días ; Las cepas Nicarao y Adiact mostraron un crecimiento notablemente menor. La cepa Nicaragua I no mostró un crecimiento sostenido que marcara una diferencia con el inóculo. En todo caso el crecimiento no fue satisfactorio y se interrumpió debido a contaminación.

Figura 1. Crecimiento de 5 cepas de *Trypanosoma cruzi* en medio INDIECH modificado.



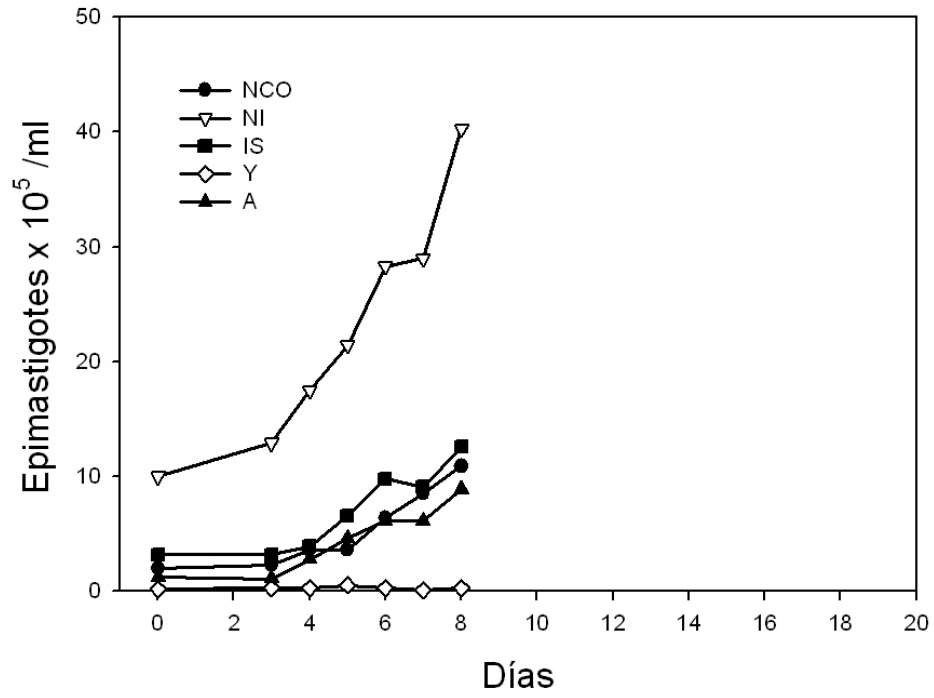
Debido al pobre crecimiento obtenido con el medio anterior se ensayo el medio del Instituto de Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, Argentina (INDIECH). Sin embargo, el crecimiento fue aún más pobre (figura 2).

Figura 2. Crecimiento de 5 cepas de *Trypanosoma cruzi* en el medio del INDIECH.



Con el medio BHI, a los 8 días de cultivo, la cepa Nicaragua I ha mostrado un crecimiento excelente, no así las cepas Nicarao, Isayana y Adiact, que han mostrado hasta el momento un crecimiento lento, pero sostenido. La cepa Yarrinse no creció (figura 3). Se continuará la observación del crecimiento de las cepas Nicaragua I, Nicarao, Isayana y Adiact, esperando que logren completar su curva de crecimiento, con el fin de conocer el día en que alcancen la fase logarítmica, a fin de obtener finalmente un buen rendimiento de la masa húmeda para la preparación del antígeno, completando así la primera etapa del presente estudio y continuar hasta la conclusión del mismo.

Figura 3. Crecimiento de 5 cepas de *Trypanosoma cruzi* en el medio BHI



Bibliografía

- Acevedo F., Godoy E and Schofield C.J. Comparison of Intervention for Control of *Triatoma dimidiata* in Nicaragua. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Dic 2000. 95(6): 867-871.
- Actualización sobre enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y Paludismo. Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben". Buenos Aires, Argentina 1986, p. 26-65.
- Altamirano J.C., Flores V.A., Fonseca M.L., Rivera T., Almendárez J. Estudio seroepidemiológico de *T. cruzi* en una zona urbana de Bluefields, departamento de Zelaya. En: Resúmenes IV Congreso Centroamericano de Parasitología y Medicina Tropical. Managua, Nicaragua, 1998.
- Argueta J., Blandón G., Bustamante L., Rivera T., Palma-Guzmán R. & Meyer E. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en tres comunidades rurales de Río San Juan. Monografía, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León, Nicaragua 1999.
- Minsa. Boletín Epidemiológico 33-99.
- Minsa. Boletín Epidemiológico 11-01.
- Bustamante D. y Rivera T. Algunos factores condicionantes de la presencia de vectores de la enfermedad de Chagas en la comunidad de Santa Ana, Quilalí, Nueva Segovia, 1996. Monografía UNAN, León.
- Caballero C., Paredes E. y Rivera T. Estudio serológico e histopatológico del Chagas congénito en Somoto. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1998.
- Carlier Y., Luquetti A., Pinto Dias J., et al., Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Publicado en Medicine Journal, October 1, 2001. Traducido al español por William Morales.
- Cedillos R.A. Chagas' disease in El Salvador. Bulletin of the Pan American Health Organization. 1975; 9(2): 135-141.
- Cerisola J. A., Álvarez M., Gladys J., Wynne de Martini. Reacción de Aglutinación de partículas de látex para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires), 1980; 40 (Supl.1): 132-136.
- Cifuentes U. y Palma-Guzmán R., Estudio seroepidemiológico y clínico de la enfermedad de Chagas en el barrio Eugenio Pérez de la ciudad de León. Monografía Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1996.

- Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud. Control de la Enfermedad de Chagas. OMS. Ginebra. (Serie de Informes Técnicos, 811), 1991: 102 pp.
- Cura Estela N., de Titto E. y Segura E. L. El diagnóstico y su control de calidad en la infección por *Trypanosoma cruzi*, en Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Simposio Satélite. Córdoba, Argentina. Noviembre 1992.
- Enders B., Hungerer K. D., Zwisler O. Survey on experiences with látex-Chagas-test in various countries. Tropenmed Parasitol 1975. Jun; 26(2): 252-60.
- Fisher M., Roque L.M., Valle N.A., Vargas J., Rivera T. Epidemiología y clínica de la enfermedad de Chagas en Los Callejones, Quilalí, Nueva Segovia. Monografía Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1994.
- FONACYT (Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología). Producción de un reactivo de látex para el diagnóstico de Chagas. Disponible en Internet en: <http://www.concyt.gob.gt>
- Fuchs A. P., Fioratti V. L., de Mello V. A. e Boainain E. Diagnóstico sorológico na doença de Chagas estudo comparativo de diferentes técnicas. Rev. Inst. Med, trop. São Paulo. 1980; 22(5): 242-245.
- Gasteazoro J.R., Montes A.Y., y Rivera T. Estudio seroepidemiológico y clínico de la enfermedad de Chagas en el barrio San Francisco, ciudad de Matagalpa. Monografía Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1991.
- Greer G.J., Nix N.A., Córdón-Rosales C., Hernández B., MacVean C., & Powell M.R. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in three rural communities in Guatemala. Revista Panamericana de Salud Pública. 1999; 6(2): 110-116.
- Hernández D. y Palma-Guzmán R. Prevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donadores del Banco Nacional de Sangre. Monografía Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1991.
- Hulley S. Y Cummings S. Diseño de la Investigación Clínica. Ediciones Doyma, Barcelona. España. 1993 p. 237.
- Matta V. L., de León M. P., Nave F. y Paz M. Evaluación y Estandarización de los Métodos Serológicos de la Enfermedad de Chagas. En: Enfermedades tropicales en Guatemala 93. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), Guatemala, 1993 (79-81).
- Mendoza Alexa y Rivera T. Estudio seroepidemiológico y clínico de la enfermedad de Chagas en una zona urbana de Ocotal. Monografía Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1994.
- Montenegro M.F., García A.J., Alemán M.C. y Palma-Guzmán R. Estudio epidemiológico y aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas que asistieron

- al control prenatal en el centro de salud Policlínica Guevara-Narváez, Matagalpa. Monografía Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. León, 1998.
- Morales W. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en 5 comunidades rurales de Nicaragua. Tesis. Universidad de Valencia. Valencia, España, 2000.
- Palma-Guzmán R., Rivera T. y Morales W. Domestic vectors of Chagas' disease in three rural communities of Nicaragua. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1996; 38(2):133-140.
- Pineda H., Sánchez K., Sánchez H., Palma-Guzmán R., Meyer E. Prevalencia de vectores de la enfermedad de Chagas en barrios y repartos periféricos de la ciudad de León. Monografía, UNAN-León 1999.
- Ponce C. Enfermedad de Chagas en Honduras: Prevalencia y Control. En Cosenza H. Y Kroeger A., editores. *Enfermedades parasitarias de mayor prevalencia y transmitidas por vectores en Centroamérica*. Tegucigalpa, Honduras. Litografía López; 1992. P. 71-76.
- Ponce W., Somarriba A., Somarriba J., Palma-Guzmán R., Meyer E. Infecciones de transmisión transfusional en hemodonantes del hospital España, Chinandega, Monografía, UNAN-León 1998.
- Reyes L., Bonilla A., Moya T., y Chinchilla M. Estudio serológico por inmunofluorescencia de la enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Parasitología al día (on line)* 998; 222(3-4) [citado 01-14-2000]. Disponible en internet en: [http://www.scielo.cl/cgi-bin/chile/fbtext/pid=S0716-0720\(98\)02200310](http://www.scielo.cl/cgi-bin/chile/fbtext/pid=S0716-0720(98)02200310).
- Rivera T., Palma-Guzmán R. y Morales W. Seroepidemiological and clinical study of Chagas' disease in Nicaragua. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1995; 37(3): 207-123.
- Rosa R., Basmadján Y., Murguiondo M., et al., Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Rev Med Uruguay* 2001; 17: 125-132.
- Schattschneider W., Lopes E. R., De Alencar J. E., Bienzle U., Feldmeier H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. *Trop Geogr Med*. 1992 Jul; 44(3): 210-8.
- Tropical Disease Research. Progress 1997-98. Chagas' disease. UNDP/World Bank/WHO. 1999.
- Umezawa E.S., Bastos S.F., Camargo M.E., Yamauchi L.M., Santos M.R., González A., Zingales B., Levin M.J., Sousa O., Rangel-Aldao R., and da Silveira J.F. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central América. *Journal of Clinical Microbiology*, May 1999; 37(5): 1554-1560.

- Urroz C. y Espinoza H. Situación actual de los conocimientos sobre la enfermedad de Chagas en Nicaragua. En: Resúmenes III Congreso Centroamericano de Microbiología, Guatemala, 1971.
- Velázquez M., Zeledón I., Zepeda S., Meyer E., Rivera T. Screening de anticuerpos anti-*t. cruzi* en donadores de sangre de los departamentos de Matagalpa y Estelí, Monografía, UNAN-León, 1998.
- WHO. Chagas' disease. [citado 30/08/00] disponible. En internet en <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>
- Wynne de Martini G., Abramo L, Rissio A.M. Alvarez M. y Mujica L. Cultivo de *Trypanosoma cruzi* en un medio monofásico. Medicina, Buenos Aires. 40 (supl 1): 109-114. 1980.