

Artículo original

Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados

Mariolga Berrizbeitia^{a,b,*}, Giovanna Aguilera^c, Brian Ward^d, Jessica Rodríguez^a, Alicia Jorquera^e, Momar Ndao^d

^aPostgrado en Biología Aplicada, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente (UDO). ^bInstituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, UDO. ^cDepartamento de Bioanálisis, Núcleo de Sucre, UDO. ^dNational Reference Centre for Parasitology, Montreal General Hospital, McGill University, Montreal, Québec. ^eCentro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, UDO.

Recibido 24 de octubre de 2009; aceptado 9 de junio de 2010

Resumen: Se evaluó la seroprevalencia de anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi*, en la población rural de Miraflores, estado Monagas. En el estudio participaron 106 individuos (edades: 4 a 79 años) de cualquier género. El diagnóstico serológico fue realizado mediante la prueba de ELISA utilizando antígenos fijados de las formas epimastigotes de *T. cruzi*. Se evaluó la estabilidad del antígeno utilizado y las diferencias en la reactividad de dos cepas distintas de *T. cruzi* (complejo Tulahuen-Brasil y cepa RG1). La seropositividad de anticuerpos de tipo IgG anti-*T. cruzi*, con la cepa RG1 y la mezcla de cepas Tulahuen-Brasil, fue 2,8%. Se observó una correlación positiva entre la edad de los pacientes y la densidad óptica de la determinación de anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi* presentada por la prueba de ELISA, para las dos cepas. La cepa Tulahuen-Brasil mostró mayor reactividad que aquella obtenida con la cepa RG1. Los antígenos fijados (mezcla de cepas Tulahuen-Brasil) mantuvieron su estabilidad y reactividad por un período de 5 años, lo cual hace de este tipo de antígeno un excelente candidato para las pruebas de diagnóstico. En la zona de estudio estuvieron presentes las variables epidemiológicas de riesgo para la reactivación de la infección en esta región de Venezuela.

Palabras clave: seroprevalencia, *Trypanosoma cruzi*, ELISA, infección, población rural, Venezuela

Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in the rural population of Miraflores, Monagas State, Venezuela. Stability and reactivity differences of fixed epimastigotes

Abstract: The seroprevalence of anti-*Trypanosoma cruzi* IgG was evaluated in the rural population of Miraflores, Monagas State. The study included 106 individuals (ages: 4 to 79 years) of any sex. The serologic diagnosis was done through the ELISA test using as antigen fixed *T. cruzi* epimastigote forms. The stability of the antigen used was evaluated, as well as the differences in reactivity of the two different *T. cruzi* strains used (the Tulahuen-Brasil complex, and the RG1 strains). Seropositivity of anti-*T. cruzi* IgG type antibodies with the RG1 strains and the mixture of Tulahuen-Brasil strains was 2.8%. There was a positive relationship between the age of patients and the optical density of the anti-*T. cruzi* IgG type antibody determination shown by the ELISA test for both strains. The Tulahuen-Brasil strains showed greater reactivity than the one seen with the RG1 strain. Fixed antigens (mixture of Tulahuen-Brasil strains) maintained their stability and reactivity during a five-year period, which means that this antigen is an excellent candidate for diagnostic tests. The epidemiological risk variables for the reactivation of this infection were present in this region of Venezuela.

Keywords: seroprevalence, *Trypanosoma cruzi*, ELISA, infection, rural population, Venezuela

* Correspondencia:
E-mail: mberriz@yahoo.com

Introducción

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública en Latinoamérica ya que 16 a 18 millones de personas se encuentran afectadas y la incidencia reportada

es de 500.000 nuevos casos por año [1]. En Latinoamérica, la enfermedad de Chagas ocupa el primer lugar entre las enfermedades tropicales y el cuarto entre las enfermedades transmisibles, lo cual representa una pérdida económica de 6,5 billones de dólares por año [2].

Diversos programas de control en América Latina han logrado reducir las cifras de infección y las tasas de infestación vectorial. Como resultado de estas intervenciones, diferentes países, como es el caso de Chile y Uruguay, han sido declarados libres de transmisión vectorial de infección por *T. cruzi* [3]. En Venezuela, el programa nacional para el control de la enfermedad de Chagas iniciado en 1960 logró reducir sustancialmente la transmisión vectorial intradoméstica a través de diferentes intervenciones: rociamiento de insecticidas (dieldrín, hexaclorociclohexano, fenitrotion), mejoramiento de las viviendas rurales y programas de educación a la población. Sin embargo, los indicadores epidemiológicos analizados en los últimos 10 años, han mostrado que la transmisión no ha sido interrumpida, sino que puede estar aumentando [4-6].

La enfermedad de Chagas afecta a los estratos más pobres de las comunidades rurales y la pobreza constituye un factor de riesgo para contraer la enfermedad [7]. Históricamente, en el país los estados más afectados han sido Trujillo, Lara, Portuguesa y Barinas. En el año 2000 la seroprevalencia en Venezuela alcanzó un 8,3% [8].

En nuestro país la mayoría de los estudios seroepidemiológicos son realizados utilizando pruebas importadas, costosas y que en algunos casos carecen de estabilidad debido a las limitaciones para mantener la cadena de frío necesaria para el funcionamiento adecuado de los reactivos. En el presente trabajo, se realizó un estudio seroepidemiológico en un área geográfica donde ha sido reportada la presencia de vectores transmisores de *T. cruzi*, con el objetivo de conocer la situación actual de la enfermedad de Chagas en la población rural de Miraflores, estado Monagas, utilizando una prueba ELISA estandarizada en el laboratorio con antígenos (epimastigotes) autóctonos y con cepas de *T. cruzi* de referencia internacional. Asimismo se evaluó la estabilidad y se establecieron las diferencias en la reactividad de dos cepas de *T. cruzi* y se recolectaron triatominos para determinar el porcentaje de infección.

Materiales y métodos

Área de estudio: La presente investigación se llevó a cabo durante el período enero-abril de 2008 en la población rural de Miraflores, ubicada al norte del municipio Acosta, estado Monagas, localizado a 10°11'19,96" de latitud norte y a 63° 37'45,21" de longitud oeste, a una altitud de 600 metros sobre el nivel del mar. Esta comunidad mantiene una actividad económica basada en el cultivo de café y en el turismo sostenido principalmente por las visitas a las pozas denominadas la poza Fría, Las Puertas de Miraflores y la poza Azul en el río Mapurite.

Selección de la muestra poblacional: Con el consentimiento informado y con la ayuda de los líderes de las comunidades se realizaron tres visitas a la comunidad y se aplicaron encuestas sobre los aspectos epidemiológicos relevantes como condiciones socio-sanitarias de las viviendas,

situación socio económica y grado de instrucción de los individuos del estudio, picadura y conocimiento del vector y de la enfermedad de Chagas. Se tomaron muestras de sangre venosa de todos los voluntarios que dieron su consentimiento para ingresar al estudio [9,10]. Según la información obtenida del resumen del Censo Sanitario, en el año 2007, el centro poblado Miraflores contaba con un total de 451 habitantes. Se evaluaron 106 individuos, lo cual representa el 23,5% de la población.

Se empleó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando epimastigotes de *T. cruzi* fijados (mezcla de dos aislados de referencia internacional v/v: Brasil y Tulahuen). Asimismo, se utilizaron epimastigotes fijados del aislado autóctono I/RHO/Ve/03/RG1 de *T. cruzi*, obtenido de un ejemplar de *Rhodnius prolixus* capturado en La Llanada de Cangua del municipio Arismendi, estado Sucre Venezuela. La confirmación taxonómica de esta cepa como *T. cruzi*, linaje TcI se realizó por medio de una prueba de PCR [11]. Para la determinación de anticuerpos anti *T. cruzi* se realizó una prueba de ELISA indirecta utilizando antígenos fijados de las formas epimastigotes de *T. cruzi*, los cuales fueron obtenidos del medio de cultivo LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino, durante la fase de crecimiento exponencial y fijados con formaldehído al 2%, siguiendo el procedimiento descrito por Berrizbeitia *et al.* [12,13].

Estabilidad de los epimastigotes fijados (mezcla de cepas Tulahuen-Brasil): La estabilidad de los antígenos epimastigotes fijados utilizados en la prueba de ELISA, se realizó comparando la media de la densidad óptica (DO), de un grupo de 75 controles positivos y negativos para la infección por *T. cruzi*, obtenida en los diferentes ensayos del presente trabajo de investigación y los valores obtenidos utilizando los mismos controles y el mismo lote de antígenos en la prueba de ELISA realizada en el año 2003.

Análisis de los triatominos: Un total de 6 triatominos adultos fueron colectados por los habitantes de la población de Miraflores. Los insectos fueron transportados en envases recolectores de orina cubiertos con una malla tipo tul. En el laboratorio, fueron clasificados utilizando la clave taxonómica de Lent y Wygodzinsky [14]. El material fecal obtenido por compresión abdominal, fue diluido en solución salina fisiológica. Las muestras fueron examinadas bajo el microscopio con objetivo de 40X.

Análisis estadístico: Los resultados fueron analizados utilizando la prueba de t de student para comparar la reactividad y estabilidad de las cepas de *T. cruzi*. Igualmente, se realizó una prueba de correlación (Pearson) para asociar las DO obtenidas en los ensayos, con las edades de los individuos participantes en el estudio [15,16].

Resultados

Características de la población y variables epidemiológicas: En el presente estudio participaron 62 individuos del sexo

masculino (58,5%) y 44 del sexo femenino (41,5%). La media de la edad de los pacientes fue de 33±18 años, con un rango comprendido entre 4 y 79 años. De los 106 individuos evaluados, con los antígenos utilizados del aislado RG1 y la mezcla de cepas Tulahuen-Brasil, sólo 3 resultaron seropositivos para anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi*, representando un 2,8% de seropositividad. De estos individuos, 2 fueron del sexo femenino y 1 del sexo masculino. La media de la edad de los pacientes seropositivos fue 59±12 años.

Las viviendas de esta región constituyen espacios reducidos e insuficientes, con techos de láminas de zinc. Las condiciones socio-sanitarias son inadecuadas, pues carecen de acueductos y cloacas. La situación socio económica de los individuos participantes en este estudio es crítica, pues el 39,4% tiene ingresos económicos mensuales que se ubican entre 0-250 BsF, 42,3% entre 250-500 BsF, 11,5% entre 500-1000 y sólo el 3,9% por encima de 1000 BsF (1US\$=4,60 BsF). Con respecto al grado de instrucción, el 6,9% de la población es analfabeta, el 44,1% completó la educación primaria, el 36,3% completó la educación secundaria, el 10,8% posee título universitario y el 2% ha realizado estudios de cuarto nivel.

El 64,4% de los individuos tenían poco conocimiento sobre la enfermedad de Chagas y sus consecuencias, pero el 94,2% de la población evaluada refirió conocer al vector de *T. cruzi* y el 42,3% (n=44) manifestó haber sido picado por el insecto en algún momento de su vida. En cuanto a la presencia del vector, la mayoría de los individuos manifestaron haberlo visto dentro (85,6%) y alrededor (83,7%) de sus viviendas; éstos últimos atraídos por la luz, principalmente durante la noche. Los triatominos recolectados fueron clasificados como *Panstrongylus geniculatus*. En el examen microscópico no se encontraron formas flageladas en las heces de estos triatominos.

Estabilidad de los epimastigotes fijados (mezcla de cepas Tulahuen-Brasil): Los epimastigotes fijados de la mezcla de cepas Tulahuen-Brasil, utilizados en los años 2003 y 2008, mostraron poca variación en la reactividad del antígeno. Se pudo evidenciar que este antígeno mantuvo su reactividad y estabilidad almacenándose a -80°C por un período de 5 años. Al comparar la media de las DO obtenidas con este antígeno, para los controles positivos y negativos de ambos periodos (2003 y 2008) mediante la prueba de t de Student (n=75), se demostró que no hubo diferencias significativas de la densidad óptica en la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* (p>0,05) (Tabla 1).

Reactividad antigénica: La prueba t de Student (n=106) mostró diferencias significativas en la media de la DO obtenida en la prueba de ELISA correspondiente a la mezcla de cepas Tulahuen-Brasil, en comparación con el aislado RG1. El complejo de antígeno formado por la mezcla de cepas Tulahuen-Brasil presentó mayor reactividad con los sueros analizados, evidenciada por una mayor DO en la prueba de ELISA, en comparación con el aislado RG1

(Tabla 2). Igualmente, la prueba de Pearson demostró una correlación positiva significativa entre la DO obtenida en la prueba de ELISA con el complejo Tulahuen-Brasil y RG1 y la edad de los pacientes (Tabla 3).

Tabla 1. Estadísticos descriptivos (media, desviación estándar y rango) de la densidad óptica de los sueros de controles positivos y negativos obtenidos en la prueba de ELISA utilizando antígenos fijados de *T. cruzi* (complejo cepas Tulahuen-Brasil). Años 2003 y 2008.

Media de los controles (año)	Media *(DO)	Desviación estándar	Rango *(DO) Min - Máx
Control positivo (2003)	2,344	0,115	2,224 – 2,487
Control positivo (2008)	2,123	0,378	1,826 – 2,377
Control negativo (2003)	0,089	0,007	0,085 – 0,099
Control negativo (2008)	0,074	0,029	0,038 – 0,099

t de Student controles positivos: 1,40 p > 0,05

t de Student controles negativos: 1,00 p > 0,05

*DO: densidad óptica.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos (media, desviación estándar y rango) de las densidades ópticas obtenidas en la determinación de anticuerpos tipo Ig-G anti-*T. cruzi* por un método de ELISA para la mezcla de cepas Tulahuen-Brasil (año 2003) y RG1 (año 2008).

Cepas	Media *(DO)	Desviación estándar	Rango *(DO) Mínimo – Máximo
Tulahuen-Brasil	0,122	0,342	0,015 – 2,498
RG1	0,064	0,103	0,010 – 0,700

Valor de t de Student: 2,43

Significativo (p < 0,05)

*DO: densidad óptica.

Tabla 3. Correlación de la densidad óptica en la prueba de ELISA y la edad de los individuos analizados utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas, año 2008.

Variables	R	Significancia
^DO Cepa Tulahuen-Brasil vs. Edad	0,248	**
^DO Cepa RG1 vs. Edad	0,327	*

* indica correlación significativa (p < 0,05)

** indica correlación muy significativa (p < 0,05)

^DO: densidad óptica.

Discusión

La seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en la población rural de Miraflores, detectada en este estudio mediante la técnica de ELISA con epimastigotes de *T. cruzi* fijados, fue baja (2,8%). Considerando la edad adulta de los pacientes seropositivos, podría suponerse que no ha ocurrido transmisión vectorial activa en los últimos años. No hemos encontrado estudios previos acerca de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en esta población que nos permitan comparar la situación actual con tiempos anteriores; sin embargo, seroprevalencias similares han sido reportadas en otras regiones de Latinoamérica. Así por ejemplo, en una población endémica de Panamá (La Chorrera), se informó

sobre un 2,9% de seropositividad (n=206) [17]. También, en el estado de Veracruz de México, la seroprevalencia estuvo entre 0 y 2,8% y en el estado de Colima alcanzó el 2,4% con transmisión activa [18,19].

Los estudios de seroprevalencia para la enfermedad de Chagas en el oriente venezolano han demostrado una amplia variación en el nivel de las cifras registradas, desde valores bajos, similares a los obtenidos en este estudio, hasta valores considerablemente mayores. Por ejemplo, en el trabajo de Aguilera [20], realizado en comunidades de Cocollar, municipio Montes del estado Sucre, se reporta una seroprevalencia de 5,8% (n=378), y en el estado Anzoátegui, en la población de San Francisco, la seroprevalencia en el año 2006 fue de 6% (n=84) [21]. Por otra parte, resulta interesante denotar que si bien en otras regiones rurales del estado Anzoátegui han sido registrados altos índices de infección por *T. cruzi* tanto en reservorios (*Didelphis marsupialis*) como en vectores (*R. prolixus* y *P. geniculatus*), este no ha sido el caso de las infecciones humanas, cuyos datos reflejan valores de prevalencia bajos (4,5%) [22]. Cifras de prevalencia similares a éstas también han sido reportadas en otras regiones de Venezuela; tal es el caso del estudio realizado por Rojas *et al.* [23] en la parroquia Xaguas del municipio Urdaneta, estado Lara, donde se detectó una seroprevalencia total de 1,6% (n=509).

Los ejemplos de seroprevalencias elevadas en otras poblaciones rurales del oriente venezolano proceden tanto de diferentes localidades del municipio Montes (12,5%) en Cogollar, Boquete, Medianía y 19 de Abril), como de regiones colindantes al estado Anzoátegui, como es el caso de Los Altos de Sucre, municipio Sucre (15,3%) [24,25]. La magnitud de estos datos es similar a la de regiones occidentales del estado Trujillo, en donde la evaluación de ocho comunidades no endémicas, no colonizadas por el vector conocido (*R. prolixus*), registraron valores de 19,2% de seroprevalencia en los individuos adultos, mientras que en niños menores de 10 años el valor fue de 2,8% [26]. Adicionalmente, en la localidad de Caballito, municipio Simón Planas (estado Lara), la seropositividad de anticuerpos anti-*T. cruzi* fue de 24,2%, donde el mayor número de casos positivos correspondió al grupo de 6 a 10 años de edad [27].

Estas diferencias entre las seroprevalencias en las diferentes regiones geográficas donde la presencia del vector ha sido confirmada, podrían relacionarse con el tipo de vector presente en cada comunidad, ya que se conoce que de acuerdo con las características de cada género, éstos tendrán mayor o menor poder infectante [28].

En el presente estudio se utilizaron antígenos fijados de las formas epimastigotes de *T. cruzi*, los cuales demostraron ser altamente estables, ya que su reactividad no sufrió cambios significativos según la prueba de ELISA a pesar que las preparaciones se mantuvieron refrigeradas por un periodo de 5 años. Las formas epimastigotes son las fuentes de antígeno más utilizadas en las técnicas de diagnóstico, debido a la facilidad para su obtención masiva en el laboratorio. Entre estos antígenos están las fracciones

proteicas y glicoproteicas totales o en fracciones purificadas por cromatografía [29-31]. Para mantener la estabilidad de estos antígenos, deben conservarse a bajas temperaturas e incluir en la preparación inhibidores enzimáticos, para evitar la degradación derivada de la acción de proteasas presentes en el parásito; sin embargo, estas preparaciones resultan de costo elevado [32]. La principal actividad proteolítica en estas preparaciones antigénicas se debe a la acción de la cruzipaina, una endopeptidasa con estructura glicoproteica que posee un extremo carboxiterminal altamente inmunogénico. Esta enzima es activada por el β -mercaptoetanol e inhibida por el inhibidor de proteasa E64 [33]. En el presente estudio, se utilizó un antígeno completo y fijado con formaldehído al 2% (epimastigotes fijados), que tiene la ventaja de ser resistente a la acción de las proteasas; de aquí la alta estabilidad demostrada mediante los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En esta investigación se demostraron diferencias significativas entre la reactividad antigénica de las cepas de *T. cruzi* utilizadas en la prueba de ELISA, pues el ensayo con la cepa autóctona demostró DO menores a aquellas presentadas por el estudio con las cepas de referencia (Tulahuen-Brasil). Aunque aún se afirma que el parásito *T. cruzi* no presenta la variabilidad antigénica característica de los tripanosomas africanos [34], diversos trabajos han arrojado evidencias contrarias, demostrando variabilidad antigénica entre cepas de *T. cruzi* e inclusive, entre formas evolutivas del parásito, lo cual podría ser una causa que explicaría las diferencias en la reactividad de las preparaciones de antígenos utilizadas para el diagnóstico [35]. En este sentido, Bucio *et al.* [36] identificaron antígenos inmunodominantes por "Western blot" en diferentes cepas de *T. cruzi* empleadas para el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas; los antígenos de la cepa Tequesquitengo mostraron la mejor reactividad en los ensayos inmunoenzimáticos. Por otra parte, Berrizbeitia *et al.* [12] encontraron diferentes reactividades de las formas evolutivas del parásito en la prueba de ELISA. El modelo estadístico lineal empleado (ANOVA) en el trabajo referido, mostró diferencias significativas para las reactividades de las formas evolutivas del parásito, siendo las formas amastigotes y epimastigotes las que arrojaron DO más elevadas [12].

También se ha informado que distintas cepas de parásitos obtenidas en Sudamérica son igualmente útiles como fuente de antígeno, presentando un patrón antigénico similar [37]. En estudios previos se ha corroborado que no existe una variación apreciable entre las fuentes de antígeno, cuando éste se prepara a partir de *T. cruzi* [38]. Sin embargo, algunos autores afirman que el uso de cepas autóctonas aumenta la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA [36]. En la presente investigación, el aislado autóctono (RG1) empleado como antígeno demostró una menor reactividad. En otro estudio realizado en Colombia, comparando resultados entre una prueba de ELISA con cepas colombianas y la prueba comercial Chagatek® (con cepa Argentina), se concluyó que es probable que existan diferencias importantes en la composición antigénica de las cepas provenientes de

diferentes países; una opinión sustentada en la notoriedad de falsos positivos y negativos obtenidos con la prueba comercial Chagatek® [39]. La respuesta humoral contra *T. cruzi* es compleja, pues responde a la presencia de una mezcla de antígenos, no pudiéndose determinar las variaciones en las especificidades de los anticuerpos relacionadas con los diferentes estadios de la enfermedad: aguda, crónica e infección congénita. La producción de anticuerpos contra los diferentes determinantes antigénicos depende del estado de la infección en que se encuentre el hospedero [40]. En el presente estudio se encontró una correlación positiva entre la DO de la prueba de ELISA para el complejo de cepas Tulahuen-Brasil y RG1 y la edad de los pacientes. Una respuesta inmune específica mantenida por años, se explica mediante la persistencia del estímulo antigénico; es decir, por la persistencia del parásito, sugiriendo la existencia de una población de hospedadores que han albergado al parásito por períodos de tiempo prolongados [41].

La observación anterior puede ser asociada con la información arrojada por las encuestas epidemiológicas que indicaron que el 94,2% de la población evaluada conocía al vector y que el 42,3% manifestó haber sido picado por el insecto. El 64,4% de los individuos tenían poco conocimiento sobre la enfermedad de Chagas y sus consecuencias.

El número de individuos seropositivos en este estudio fue bajo; sin embargo, ello no significa que en esta región exista bajo riesgo de adquirir la infección por *T. cruzi*, ya que de acuerdo con la información suministrada por las encuestas se trata de una población con escaso conocimiento acerca de la enfermedad de Chagas, cohabitando con los vectores, lo que evidencia, tal como ha sido indicado por algunos autores, que en esta región existen las condiciones para la activación de la transmisión vectorial de *T. cruzi* [42]. En Venezuela, en los últimos 10 años, se ha sugerido la condición de re-emergencia de la infección por *T. cruzi* [4-6,26,27,43]; en esta situación, proponemos la utilización de los epimastigotes obtenidos de cultivos, y fijados como alternativa para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi*, dada su demostrada estabilidad y facilidad de producción, mantenimiento y bajo costo. La prueba de ELISA utilizando este tipo de antígeno resulta una técnica confiable por su alta sensibilidad, especificidad y estabilidad, pudiendo constituir un ensayo de características autóctonas para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi*.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Comisión de Investigación, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente (Proyecto No. CI-2-040102-1281/06). Al Dr. Alberto Aché por la guía brindada en la realización de la investigación y la Licda. Mehudy Medina por la donación de los sueros confirmados para infección por *T. cruzi* en el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico para la Enfermedad de Chagas, (Maracay, estado Aragua).

Referencias

1. World Health Organization. Chagas' disease: control and elimination. Executive board 124th session. EB124/17. 2008.
2. Días L, Silveira A, Schofield C. The impact of Chagas' disease. Control in Latin America. A review. Mem Inst Osw Cruz. 2004; 97: 603-12.
3. Moncayo A. Chagas' disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern cone countries. Mem Inst Osw Cruz. 2003; 98:577-91.
4. Feliciangeli M, Campbell C, Martínez D, González P, Coleman A, Davies C. Chagas' disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. Trends Parasitol. 2003; 19:44-9.
5. Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas' disease in Venezuela: a review. Mem Inst Osw Cruz. 2004; 99:781-7.
6. Carrasco H, Torrellas A, García C, Segovia M, Feliciangeli M. Risk of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera, Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring states, Venezuela. Int J Parasitol. 2005;35:1379-84.
7. Aché A, Matos J. Interrupting Chagas' disease transmission in Venezuela. Rev Inst Med Trop. 2001; 43:37-43.
8. Red de Sociedades Científicas Médicas de Venezuela. En http://www.rscmv.org/pdf/noticias_epidemiologicas2pdf. Acceso 06 de febrero de 2010.
9. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). Pautas éticas internacionales para la investigación y experimentación biomédica en seres humanos. ISBN 92 9036 056 9. Ginebra. 1993. pp.53-6.
10. Ávila G, Martínez M, Ponce C, Soto R. La enfermedad de Chagas en la zona central de Honduras: conocimientos, creencias y prácticas. Rev Panam Salud Pub. 1998; 3:158-63.
11. Jorquera A, González R, Puerta M, Guevara P, Gerardino O. Molecular characterization of *Trypanosome* parasites naturally infecting triatomine vectors and wild reservoirs in an endemic region of american trypanosomiasis in eastern Venezuela. 11th International Congress of Parasitology Glasgow, Scotland. 2006.
12. Berrizbeitia M, Ndao M, Gottschalk M, Aché A, Vásquez F, Lacouture S, et al. Development and comparison of an enzyme immunoassays for diagnoses of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. J Clin Microbiol. 2004; 42:1766-9.
13. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, et al. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: Comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote secreted-excreted antigens (TESA) from two *T. cruzi* strains. Transf Med. 2006;16:419-31.
14. Lent H, Wygodzinsky P. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vector of Chagas disease. Bull Am Mus Nat Hist. 1979; 163:123-520.
15. Gordis, L. Epidemiology. Third edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004.
16. Wayne D. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. Seventh edition. Toronto: John Wiley and Sons;

- 1999.
17. Saldana A, Samudio F, Miranda A, Herrera L, Saavedra S, Cáceres L, *et al.* Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. Mem Inst.Osw. Cruz. 2005; 100: 729-31.
 18. Coll R, Espinoza F, Maldonado A, Reyes P, Huerta M, Rojas F. Active transmisión of human Chagas' disease in Colima, México. Mem. Inst Osw Cruz. 2004;99:363-8.
 19. Segura EM, Escobar M. Epidemiology of Chagas' disease in the state of Veracruz. Salud Pública Mex. 2005; 47:201-8.
 20. Aguilera, K. Evaluación serológica de *Trypanosoma cruzi* en las comunidades rurales de Cocollar y las Piedras de Cocollar, municipio Montes, estado Sucre. [Trabajo de Pregrado]. Cumaná. Univ. de Oriente, 2003.
 21. Millán D, Kiriakos D, Sánchez, E, Santana, H. Seropositividad para la enfermedad de Chagas en una población rural del estado Anzoátegui. Inf Med 2006; 8:119-28.
 22. Morocoima, A. Epidemiología de *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* en reservorios mamíferos, vectores y humanos de caseríos rurales del estado Anzoátegui; caracterización biológica de tres aislados de este protozoario. [Trabajo de Ascenso]. Barcelona. Univ de Oriente, 2002.
 23. Rojas ME, Várquez P, Villareal MF, Velandia C, Vergara L, Moran-Borges Y, *et al.* An entomological and seroepidemiological study of Chagas' disease in an area in central-western Venezuela infested with *Triatoma maculata* (Erichson 1848). Cad Saud Pub. 2008; 24:2323-33.
 24. Abreu, L. Evaluación seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en la población de los Altos de Sucre del municipio Sucre, estado Sucre. [Trabajo de Pregrado]. Cumaná Universidad de Oriente, 2003.
 25. Flores, V. Evaluación seroepidemiológica de la enfermedad de Chagas en diferentes localidades del municipio Montes, estado Sucre. [Trabajo de Pregrado]. Cumaná. Universidad de Oriente, 2003.
 26. Sandoval I, Añez N, Villegas E, Scorza J. Persistencia de la transmisión de la enfermedad de Chagas sin colonización por el vector conocido, en localidades controladas de Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2003; 23:166-8.
 27. Traviezo L, Bofante R. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, Municipio Simón Planas, Estado Lara, Venezuela. Parasitol Latinoam. 2004; 59:46-50.
 28. Paz M, Salazar S, Arteaga I, Cabrera M. Tres especies de triatóminos y su importancia como vectores de *Trypanosoma cruzi* en México. Medicina. 2005; 65:63-9.
 29. Schechter M, Voller A, Marinkelle CJ, Flint JE, Guhl F, Miles MA. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoproteins for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). Lancet. 1990; 322:939-41.
 30. Lissaldo A, Hoshino S, Umezawa E, Stolf A. Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to dot-Elisa. Rev Inst Med Trop. Sao Paulo. 1994; 36:163-6.
 31. Pinho R, Pedrosa R, Costa P, Castelo L. Saliva ELISA: a method for the diagnosis of chronic Chagas' disease in endemic areas. Acta Trop. 1999;72:31-8.
 32. Campetella O, Martínez J, Cazzulo J. (1990.). A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 1990; 67:145-50.
 33. Aslund L, Henriksson J, Campetella O, Frasch A, Petterson U, Cazzulo J. The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1991; 45:345-8.
 34. Cazzulo J, Frasch A. SAPA/trans-sialidase and cruzipain antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. FASEB J.1992; 6: 3259-64.
 35. Montiel G, Díaz G. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Rev Med Hosp Nac. 2002; :57-63.
 36. Bucio M, Cabrera M, Segura E, Zenteno E, Salazar M. Identification of immunodominant antigens in mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. Immunol Invest. 1999; 28:257-68.
 37. Rangel R, Comach G, Allende O, Cayama E, Delgado V, Piras R. *Trypanosoma cruzi* polypeptide markers of epimastigotes and trypomastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1986; 20:25-32.
 38. Monteón V, Ramos E, Reyes P. Reactividad de sueros de pacientes chagásicos crónicos con extractos de aislamientos mexicanos de *Trypanosoma cruzi*. Rev Biol Trop. 1993; 41: 861-5.
 39. Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls R, Rodríguez A, Mercado M, y col. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek® para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Biomédica. 2004; 24:104-8.
 40. Reyes M, Lorca M, Muñoz P. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Proc Natl Acad Sci.1990; 87:2846-53.
 41. Higuchi M, Britto T, Reiss M. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardium, inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. Cardio Pathol.1993; 2:101.
 42. Sanmartino M, Crocco L. Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina. Rev Panam Salud Pública. 2000; 7:173-8.
 43. Bonfante C, Amaro A, García M, Mejías L, Guillen P, García R, y col. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. Cad Saúde Pùb. 2007; 23:1133- 40.