

https://doi.org/10.24245/rev_hematol.v22i3.6936

Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en la zona oriente de la Ciudad de México

Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in the eastern zone of Mexico City.

Óscar A Reboreda-Hernández,¹ Rocío Ortiz-Butron,² Sheyla Hernández-Peña,¹ José Luis Campos,⁴ Julio César Romero,⁴ Elba Reyes-Maldonado,³ Nayeli González-Rodríguez¹

Resumen

OBJETIVO: Conocer la seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en los bancos de sangre de la zona oriente de la Ciudad de México.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio transversal, descriptivo, efectuado de septiembre de 2017 a septiembre de 2018, en el que durante un año se analizó el suero de individuos mediante un ensayo ELISA usando un kit comercial (con antígenos de cepas no endémicas). A los positivos se les realizó un ensayo de ELISA casero y su Western Blot (usando parásitos de una cepa endémica de México). Además, se revisaron los expedientes clínicos de los donadores.

RESULTADOS: Se obtuvieron 512 sueros de donadores de sangre; de los positivos por prueba comercial el 22% eran mujeres. La edad media fue de 35 años; los límites de edad fueron de 18 y 65 años. Las diferentes pruebas mostraron seroprevalencia del 1.4%.

CONCLUSIONES: Existe la enfermedad de Chagas en una zona libre de insecto transmisor.

PALABRAS CLAVE: Estudios serológicos; *Trypanosoma cruzi*; México; bancos de sangre.

Abstract

OBJECTIVE: To know the seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in the blood banks of the Western area of Mexico City.

MATERIALS AND METHODS: A cross-sectional, descriptive study done from September 2017 to September 2018, in which the sera of individuals were analyzed using an ELISA commercial kit (with non-endemic strain antigens). These positive sera were studied with an ELISA homemade essay, and a Western Blot test (with endemic strain parasites). Moreover, the donators medical records were studied.

RESULTS: There were obtained 512 sera from donators to the blood bank; 22% of those positive by commercial test were women. The mean age was 35 years; the age limits were 18 and 65 years. The different tests showed seroprevalence of 1.4%.

CONCLUSIONS: There is Chagas disease in a free vector area.

KEYWORDS: Seroepidemiologic studies; *Trypanosoma cruzi*; Mexico; Blood banks.

¹ Laboratorio de Patología, Departamento de Morfología.

² Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Fisiología.

³ Citología, Departamento de Morfología.

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

⁴ Banco de Sangre, Hospital General Regional Dr. Juan Ramón de la Fuente, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

Recibido: 30 de septiembre 2021

Aceptado: 25 de octubre 2021

Correspondencia

Nayeli González Rodríguez
dipetalogaster@gmail.com

Este artículo debe citarse como:

Reboreda-Hernández OA, Ortiz-Butron R, Hernández-Peña S, Campos JL, Romero JC, Reyes-Maldonado E, González-Rodríguez N. Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en la zona oriente de la Ciudad de México. Hematol Méx 2021; 22 (3): 127-134.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria causada por la infección con el protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que causa en su fase crónica afecciones cardíacas que pueden derivar en la muerte de los pacientes.¹ En la actualidad aproximadamente 7 millones de personas están infectadas y 60 millones más están en riesgo de contraer la infección.²

T. cruzi se clasifica en 7 unidades discretas de tipificación (DTUs), cada una con su propia distribución geográfica, variaciones geográficas, diversas manifestaciones clínicas y diferente sensibilidad en pruebas serológicas.¹

Antiguamente, se consideraba que la enfermedad de Chagas era un padecimiento endémico de América; sin embargo, debido a los movimientos poblacionales ahora se considera una enfermedad emergente en todo el mundo,¹ hecho que puede repercutir en la seroprevalencia de este parásito en los bancos de sangre. Incluso, desde la década de 1990 la Organización Panamericana de la Salud (PAHO) ha coordinado iniciativas para controlar la transmisión de este parásito vía transfusional.¹ Sin embargo, la transmisión de esta enfermedad mediante vía sanguínea continúa siendo la segunda más importante, solo antecedida por la vía vectorial.³

El diagnóstico de la infección depende de la fase clínica en la que se encuentre el paciente. Sin embargo, actualmente ninguna de las pruebas de diagnóstico se considera óptima para la detección de *T. cruzi*. No obstante, las pruebas serológicas son las más usadas en todas las fases clínicas; desafortunadamente, debido a reacciones cruzadas, éstas pueden derivar en reacciones inespecíficas (falsos positivos o falsos negativos). Por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que se realicen tres pruebas serológicas y que, de éstas, dos resulten

positivas para poder emitir la confirmación de la infección.²

En México es obligatoria la realización de pruebas serológicas para detectar a *Trypanosoma cruzi* desde el año 2012 y se estima que hay 2 millones de personas; sin embargo, el hecho de que no exista un buen diagnóstico en más de la mitad de los pacientes puede derivar en un diagnóstico erróneo, lo que repercutiría en un tratamiento inadecuado.²

Al considerar que *T. cruzi* es polimórfico y los parásitos están ampliamente distribuidos, se ha demostrado que la mayor parte de las cepas mexicanas pertenecen al DTU-I,⁴ por lo que es de interés evaluar si las pruebas serológicas realizadas con cepas endémicas del territorio nacional aportan certeza del diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de secciones cruzadas, descriptivo, efectuado de septiembre de 2017 a septiembre de 2018 para detectar falsos positivos y falsos negativos y determinar la prevalencia de la enfermedad de Chagas en una corte de la población que reside en la Ciudad de México, con lo que puede evaluarse la posibilidad de la transmisión transfusional de *T. cruzi*.

Las muestras de suero se obtuvieron a partir de la sangre de donadores de los bancos de sangre del Hospital General de Iztapalapa Dr. Juan Ramón de la Fuente, del Hospital de Especialidades Belisario Domínguez y del Hospital General de Tláhuac Dra. Matilde Petra Montoya Lafragua. Todos los donadores firmaron una carta de consentimiento informado. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Los criterios de inclusión que se aplicaron para la selección de los pacientes fueron: ser adultos sanos de uno y otro sexo, de 18 a 65 años de edad, con peso mayor a 50 kg, sin antecedente de inmunizaciones, trasplante y que no estuvieran embarazadas o lactando, clínicamente seronegativos al virus de la hepatitis B (HBC), virus hepatitis C (HCV), *Brucella abortus* (BrA), antígenos de superficie de la hepatitis B (HBrAg), al Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas (VDRL) y al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), acorde con el protocolo de Normas Técnicas de Bancos de Sangre (TNBB).

Se excluyeron todas las personas que no fueran capaces de dar su consentimiento informado, los que tuvieran comorbilidades, los inmunosuprimidos y que hubieran recibido tratamiento tripanocida previamente.⁵

Todo el protocolo experimental se realizó siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y la participación de los individuos en el protocolo fue completamente voluntaria.⁶

Las muestras de sangre periférica se colectaron usando el sistema Vacutainer (BD, Nueva Jersey, Estados Unidos) y separadas mediante centrifugación (1200 g/10 m), guardadas en tubos Eppendorf, congeladas a -4°C y almacenadas en ultracongelación a -20°C hasta su análisis.

Diagnóstico de enfermedad de Chagas

Se realizaron tres pruebas serológicas independientes: una prueba de ELISA con un kit comercial, una prueba de ELISA casera y una prueba de Western Blot, usando antígenos de NI-NOA, cepa endémica de México y perteneciente al DTU-1, solamente se consideraron verdaderos positivos las muestras que fueron positivas a dos de estas tres pruebas.⁶

Antígenos

Cepa NI-NOA de *Trypanosoma cruzi*

Los parásitos fueron sonicados FR-600N (Ultra-sonics, Pekín, China) y el sobrenadante se usó como extracto antigénico crudo; las concentraciones de las proteínas se cuantificaron mediante el método de Lowry.⁷

ELISA casero

Para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, microplacas RIA/IEA Costar 3590 (Corning, Nueva York, Estados Unidos) fueron sensibilizadas con extracto crudo de antígeno de epimastigotes (10 mg/mL) en amortiguador de carbonatos pH 8.3 y bloqueados con solución de albúmina (Productos Químicos Monterrey SA, México) en PBS/Tween (0.05%). Los sueros se diluyeron 1:500, se incubaron 4 h y se lavaron con PBS/Tween. Se usaron anticuerpos anti-IgG conjugados a peroxidasa de rábano KGaA (Merck, Alemania) y peróxido de hidrógeno; la reacción se leyó a 490 nm en un lector de ELISA HReader1 (Hlab, EUA).⁷

SDS-PAGE

El antígeno crudo fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida de 1.5 mm con un gradiente de 12% en el gel que corre y 5% en el gel de concentración, con un amortiguador de SDS (dodecil-sulfato de sodio). Después, el antígeno fue calentado 5 min a 90°C y sonicado, el antígeno se diluyó en un amortiguador para muestras 1:7 (sacarosa 20%, azul de bromofenol 3%, [EDTA] 0.025% pH 6.5) y aplicado al gel. Se añadió un amortiguador (Tris-glicina 1:20) al gel de corriente y se corrió la electroforesis a 100 volts hasta que alcanzó el gel de corriente, después, el sistema de electroforesis se corrió a 150 volts hasta que la muestra alcanzó el final del gel.

Western-Blot

Los polipéptidos en el gel se transfirieron a hojas de nitrocelulosa (Life Technologies Inc., Maryland, Estados Unidos) a 50 voltios (150 mA) a 4°C toda la noche EC-600 (EC Apparatus Corporation, Florida, Estados Unidos). Las hojas fueron cortadas verticalmente y tratadas con una solución bloqueadora (albúmina 1%, PBS-Tween 0.05%) a temperatura ambiente una hora con agitación constante, lavados con PBS-Tween 0.05% y tratados una hora en agitación constante con los sueros positivos diluidos 1:500 en albúmina-PBS 1:500 al 1% a temperatura ambiente. Después, las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.05%, tratado con anti-IgG humano acoplado a peroxidasa de rábano (Merck, Alemania), una hora a temperatura ambiente en agitación constante, lavados con PBS-Tween 0.05%, las tiras se trataron con solución reveladora con peróxido de hidrógeno y ortofenilendiamina (Merck, Alemania); la reacción se detuvo con agua destilada.

Análisis de los datos de los pacientes

La características clínicas y demográficas se obtuvieron de los registros clínicos.

Análisis estadístico

Para correlacionar los grupos de datos se usó una prueba de ANOVA de dos vías. Diferencias con valores de p menores de 0.05 se consideraron significativos. Además, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con una correlación de Pearson. Una prueba no paramétrica de Pearson se usó para correlacionar los datos. Todo el análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism v.7 (GraphPad Software, California, Estados Unidos).

RESULTADOS

Se obtuvieron 512 sueros de donadores de banco de sangre que se analizaron siguiendo el logaritmo de aceptación (**Figura 1**), de los positivos por prueba comercial el 22% eran mujeres. La edad media fue de 35 años; los límites de edad fueron de 18 y 65 años. Las diferentes pruebas mostraron seroprevalencia del 1.4%. **Cuadro 1**

DISCUSIÓN

En zonas endémicas de la enfermedad de Chagas, como es el caso de México, se ha propuesto que se hagan campañas referentes a ésta para dar

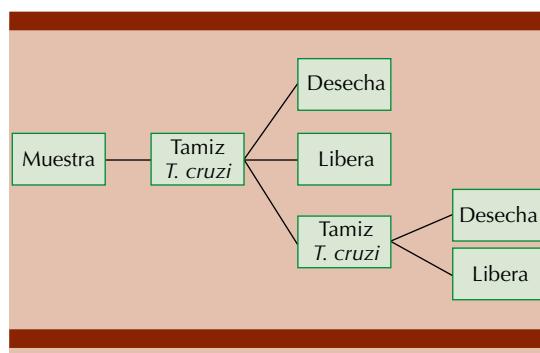


Figura 1. Logaritmo utilizado para la aceptación o rechazo de muestras para transfusión sanguínea sospechosas de *T. cruzi*.

Cuadro 1. Resultados de seroprevalencia de las diferentes pruebas realizadas

Prueba	Positivo	Negativo	Porcentaje total
Chagatest (n = 512)	41	471	8
ELISA casero (n = 41)	14	27	2.7
Western blot (n = 14)	7	7	1.4

Total de muestras: 512.

a conocer los insectos transmisores y educar a la población, con el fin de reducir la probabilidad de contraer la infección y evitar su posterior exportación a otras áreas.⁸ Sin embargo, en México aún falta información epidemiológica acerca de la enfermedad de Chagas, hecho que se refleja en los esquemas usados para el diagnóstico; las medidas de salud pública que deben tomarse son críticas para alcanzar las metas de desarrollo respecto a la salud pública de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para 2030 ("... terminar con las epidemias de SIDA, tuberculosis, malaria y de las enfermedades tropicales desatendidas...").⁶

Asimismo, en los países no endémicos, el principal riesgo de transmisión es mediante la donación sanguínea, lo que hace que la mejoría del control de la transmisión por esta vía sea un área de oportunidad para el sector salud.⁶

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, las técnicas serológicas son las herramientas más eficientes.⁵ En México no se conoce la seroprevalencia real de *T. cruzi*; sin embargo, hay reportes en algunos estados: Campeche (15%),⁹ Coahuila (21.1%),¹⁰ Guanajuato (0%),¹¹ Nuevo León (1.93%),¹² Veracruz (33.7%),^{13,14} y Yucatán (0.42%).¹⁵

En cuanto a la Ciudad de México, diversos autores han reportado diferentes cifras que van del 0.17%¹⁶ a la reportada oficialmente del 0.25%.¹⁷ De manera interesante, en este estudio se determinó una seroprevalencia del 1.3%, cifra más alta que la reportada de otras infecciones, como el virus de la inmunodeficiencia humana (0.24%),¹⁸ lo que confirma que la enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida, tal como la clasifica la Organización Mundial de la Salud.¹⁹

En los centros de salud hay pruebas de diagnóstico rápido de la infección por *T. cruzi*, como el

Chagas Stat Pack Chembio Diagnostic Systems Inc. (Medford, Nueva York, Estados Unidos) [detección de IgG contra antígenos de *T. cruzi* B13, 1F8, H49/JL7] y el Chagas Detect Plus InBios International Inc. (Washington, Estados Unidos) [basado en el antígeno de epítopo múltiple ITC8.2]. Al comparar la sensibilidad y la especificidad de éstas contra pruebas de hemaglutinación indirecta (IHA), ELISA con antígeno lisado y ELISA con antígeno recombinante, se han reportado valores de sensibilidad del 26.6 al 93.4% y especificidad del 55.2 al 97.3%.²⁰

La variabilidad en la sensibilidad y la especificidad que muestran tales pruebas se ha atribuido a múltiples factores: al analista, al área geográfica de la cepa de *T. cruzi*, a la vía de infección del hospedero, a la especie del transmisor y a la reactividad cruzada que tenga con otros antígenos.^{20,21} En este caso, la discordancia entre los resultados puede deberse a que el kit comercial es menos sensible ya que es menos específico contra las cepas endémicas en México puesto que se fabrica en Argentina usando antígenos de cepas sudamericanas (DTU-II) y en México el DTU predominante es el I.¹

Asimismo, ya se ha reportado que los algoritmos utilizados oficialmente para el tamizaje de la enfermedad de Chagas en los bancos de sangre no corresponden con los estándares sugeridos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS),³ esto puede ser la razón de las bajas seroprevalencias reportadas. Al analizar las muestras acordes con el logaritmo utilizado en el banco de sangre (**Figura 1**),²² la seroprevalencia es del 0.47%; sin embargo, esta cifra es significativamente diferente si las muestras se analizan usando pruebas confirmatorias hechas con antígenos de cepas endémicas, lo que arroja una seroprevalencia del 1.53%.

La importancia de realizar pruebas confirmatorias acorde con los estándares sugeridos

por la OPS, que lleven al diagnóstico oportuno, es que el diagnóstico deficiente de esta enfermedad, probablemente a consecuencia de métodos de detección laxos, como los establecidos en México,³ se ha asociado con pacientes con enfermedades cardíacas; un dato interesante es que el 21% de los pacientes con cardiomiopatía dilatada son seropositivos a *T. cruzi*.¹⁰

Por otra parte, con base en el análisis de los expedientes clínicos, se observó que en este ensayo los donadores provenían de diferentes partes de México: Ciudad de México (59%), Veracruz (11%), Estado de México (9%), Puebla (9%), Guerrero (2%), Chiapas (3%), Oaxaca (3%), Guanajuato (1%), San Luis Potosí (1%) e Hidalgo (2%); estados en los que se ha reportado la presencia del insecto transmisor.²³ Así, la mayoría de los donadores provenían de la Ciudad de México, lugar en el que recientemente se ha reportado la existencia de *Triatoma barberi* y *Meccus pallidipennis*;²⁴ esto puede explicar a la gran cantidad de seropositivos provenientes de esta región, a pesar de que históricamente se ha considerado una zona libre de transmisor,²⁵ con lo que este reporte podría cambiar la manera de ver la seroprevalencia de esta enfermedad en zonas urbanizadas.

La población de estudio analizada estuvo conformada por 78% de hombres y 22% de mujeres de entre 18 y 65 años, por lo que la población más afectada son los hombres de alrededor de 32 años. Estos resultados plantean que actualmente existe transmisión activa de la enfermedad de Chagas y, considerando que los donantes captados por estas instituciones cumplen criterios de selección estandarizados y que los bancos de sangre de los centros de salud que participaron en este estudio son de concentración, la cifra de seroprevalencia real (realizando las pruebas serológicas con antígenos de cepas endémicas) podría ser similar en otros bancos de sangre de

la ciudad, ya que, actualmente, todos realizan solo una prueba para la detección de *T. cruzi* y emplean kits con antígenos de cepas no endémicas del territorio nacional.¹⁷

De manera complementaria, en este estudio se realizó la revisión histórica de los libros de registro de los centros de salud desde 2014, y se observó que en ese año la detección de la enfermedad de Chagas por prueba comercial fue muy baja detectando solamente a tres donadores positivos, y en los años subsecuentes esta cifra aumentó notablemente, lo que puede sugerir una mejoría en el tamizaje y prueba para la detección. Sin embargo, en los centros de salud de concentración con una tasa menor a cinco mil unidades de sangre, se ha reportado que en las pruebas de detección de agentes infecciosos transmisibles por transfusión hay una gran cantidad de resultados falsos positivos y negativos.²⁴

Respecto a la prueba estadística utilizada en el tamizaje de la enfermedad de Chagas, ésta no utiliza la tendencia para la detección de enfermedades urbanas, como la hepatitis y el VIH,²⁶ puesto que en la Ciudad de México actualmente se considera una enfermedad importada,²⁷ con lo que suele haber mayor número de falsos positivos en la detección serológica de la enfermedad de Chagas.

Hay que tomar en cuenta que, a pesar de que México muestra un índice muy bajo de donación altruista (5.2%),²⁸ es obligatorio por la seguridad social la donación sanguínea por parte de familiares y amigos de pacientes que han tenido algún tipo de intervención quirúrgica;²⁹ esto representa un panorama de alto riesgo en relación con la infección por *T. cruzi*, porque la urgencia de sangre y hemoderivados promueve la liberación rápida de éstos, lo que conlleva a sobrepasar las deficiencias de la prueba rápida para la enfermedad de Chagas.

Aunque en este estudio no se cubrió toda la Ciudad de México, con lo que la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas está siendo probablemente subestimada, proporciona suficiente información para dar pauta a establecer la seropositividad de los sueros, mediante al menos dos técnicas (como lo indica la OMS), usando antígenos de cepas endémicas de la zona geográfica de la que provengan los donadores, debido a que esto aporta mayor especificidad a la prueba.

Por último, surge la necesidad *a posteriori* de realizar un estudio que abarque todos los centros de salud de la Ciudad de México.

CONCLUSIONES

Se encontró una seroprevalencia mayor de la enfermedad de Chagas en la zona oriente de la Ciudad de México que la reportada oficialmente, que muestra la importancia de un mejor manejo de esta enfermedad, complementando los protocolos establecidos con pruebas confirmatorias.

Agradecimientos

Al Dr. Benjamín Nogueda-Torres (ENCB, IPN) por mantener y donar la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi*.

REFERENCIAS

1. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* 2018; 184: 38-52. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.017.
2. Moure Z, Angheben A, Molina I, Gobbi F, Espasa M, Ansaldi M, et al. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22 (9): 788-92. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.001.
3. Sanchez-Gonzalez G, Figueroa-Lara A, Elizondo-Cano M, Wilson L, Novelo-Garza B, Valiente-Banuet L, et al. Cost-effectiveness of blood donation screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10 (3): e0004528. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004528>.
4. Sanchez-Guillen MC, Barnabe C, Guegan JF, Tibayrenc M, Velasquez-Rojas M, Martinez-Munguia J, et al. High prevalence anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies, among blood donors in the State of Puebla, a non-endemic area of Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (7): 947-52. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700004>.
5. Navarro M, Monge-Maillo B, Flores-Chavez MD, Lopez-Velez R. Hunting hidden parasites: *Trypanosoma cruzi*. *Lancet* 2017; 390 (10096): 724-6. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31536-2.
6. Moure Z. Serodiscordancia en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en área no endémica. Barcelona España: Universidad Autónoma de Barcelona; 2018.
7. Reiche EM, Cavazzana M Jr, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59 (5): 750-6. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.750.
8. Coll-Cardenas R, Espinoza-Gomez F, Maldonado-Rodriguez A, Reyes-Lopez PA, Huerta-Viera M, Rojas-Larios F. Active transmission of human chagas disease in Colima Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (4): 363-8. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000400004>.
9. Alducin-Téllez ER-V, Medina-Yerbes I, Hernández O, López R, Peña-Hernández V, Monteón V. Prevalencia de serología positiva para *Trypanosoma cruzi* en pacientes con diagnóstico clínico de miocardiopatía dilatada en el Estado de Campeche, México. *Arch Cardiol Mex* 2011; 3: 204-7.
10. Martinez-Tovar JG, Rebollar-Tellez EA, Fernandez Salas I. Seroprevalence of *T. cruzi* infection in blood donors and Chagas cardiomyopathy in patients from the coal mining region of Coahuila, Mexico. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014; 56 (2): 169-74. doi: 10.1590/S0036-46652014000200014.
11. Padilla-Raygoza N, Gamboa-Leon R, Ramirez-Sierra MJ, Dumonteil E, Buekens P, Ruiz-Paloalto ML, et al. Negative studies are helpful to compute the specificity of diagnostic tests: measuring *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in Guanajuato, Mexico. *BMC Res Notes* 2015; 8: 614. doi: 10.1186/s13104-015-1612-z.
12. Molina-Garza ZJ, Bazaldua-Rodriguez AF, Quintanilla-Licea R, Galaviz-Silva L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Trop* 2014; 136: 14-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.04.006.
13. Guzman-Gomez D, Lopez-Monteon A, de la Soledad Lagunes-Castro M, Alvarez-Martinez C, Hernandez-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors* 2015; 8: 466. doi: 10.1186/s13071-015-1072-2.
14. Hernandez-Romano P, Camara-Contreras M, Bravo-Sarmiento E, Lopez-Balderas N. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors from Veracruz State, Mexico. *Transfusion* 2015; 55 (3): 647-56. doi: 10.1111/trf.12860.

15. Monteon V, Solis-Oviedo R, Lopez R, Hernandez O, Tellez CA. Low seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection and chronic chagasic cardiomyopathy in a region with abundance of triatomine vectors in Yucatan Peninsula of Mexico. Ann Parasitol 2015; 61 (4): 263-7. doi: 10.17420/ap6104.17.
16. Escamilla-Guerrero G, Martinez-Gordillo MN, Riveron-Negrete L, Aguilar-Escobar DV, Bravo-Lindoro A, Cob-Sosa C, et al. *Trypanosoma cruzi*: seroprevalence detected in the blood bank of the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, in the period 2004 through 2009. Transfusion 2012; 52 (3): 595-600. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03322.x.
17. Secretaría de Salud Gobierno de Mexico Manual de Procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México, 2019.
18. CENSIDA. CENSIDA 2019 [cited 2019 15-08-19]. Available from: <https://www.gob.mx/censida>.
19. OMS. Enfermedad de Chagas 2019 [updated 01-08-2019]. Available from: https://www.who.int/topics/chagas_disease/es/.
20. Eguez KE, Alonso-Padilla J, Teran C, Chipana Z, Garcia W, Torrico F, et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. PLoS Negl Trop Dis 2017; 11 (4): e0005501. doi: 10.1371/journal.pntd.0005501.
21. Ramos-Ligonio A, Ramírez-Sánchez ME, González-Hernández JC, Rosales-Encina JL, López-Monteón A. Prevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood bank donors from the IMSS General Hospital in Orizaba, Veracruz, México. Salud Publica Mex 2006; 48 (1): 13-21.
22. NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, (2016).
23. Guzman-Gomez D, Lopez-Monteon A, de la Soledad Lagunes-Castro M, Alvarez-Martinez C, Hernandez-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. Parasit Vectors 2015; 8: 466. doi: 10.1186/s13071-015-1072-2.
24. Secretaría de Salud Gobierno de México Centro Nacional de Transfusión Sanguínea. Informes mensuales de ingresos y egresos de sangre y sus componentes y enfermedades transmisibles por transfusión, 2012.
25. Galvao LM, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Andrade AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. J Clin Microbiol. 2003; 41 (11): 5066-70. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5066-5070.2003>.
26. Velasco-Castrejon O, Valdespino JL, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Guzman-Bracho C, Magos C, et al. [Seroepidemiology of Chagas disease in Mexico]. Salud Publica Mex 1992; 34 (2): 186-96.
27. PAHO. Enfermedad de Chagas 2019 [updated 15-08-19]. Available from: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es.
28. CNTS. Donacion Altruista 2015 [updated 2015]. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/47749/Donaci_n_de_sangre.pdf.
29. CNTS. Centro Nacional de la Transfusion Sanguinea 2019 [Available from: <https://www.gob.mx/cnts>]