

Anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en humanos y perros y presencia del parásito en *Meccus pallidipennis* en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México

Cruz Portugal-García ¹, Zeferino García-Vázquez ², Víctor Monteón-Padilla ³, Verónica Chávez-López ¹, María Olamendi-Portugal ¹, Celso Ramos ¹

¹ Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México. ² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Cuernavaca, Morelos, México. ³ Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Autónoma de Campeche, Campeche, Campeche, México

RESUMEN

Introducción. La enfermedad de Chagas es endémica en países de América Latina, incluyendo México. En el estado de Morelos, se han realizado diversos estudios que confirman la importancia de la enfermedad.

Objetivo. Determinar la prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en humanos y perros y detectar el parásito en triatominos en la localidad de Puente Pantitlán, Morelos, México.

Materiales y Métodos. Estudio piloto transversal en población abierta de octubre de 2003 a octubre de 2004; se aplicó un cuestionario en 74 viviendas, donde se colectaron 233 muestras sanguíneas de personas > 5 años de edad y 33 muestras de sangre de perros; se colectaron triatominos para buscar el parásito y para su identificación taxonómica. En humanos, los anticuerpos se detectaron por ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y en los perros únicamente por ELISA; los parásitos se buscaron en las heces de los triatominos.

Resultados. La seroprevalencia en humanos fue de 1.2% (3/233) y en los perros de 24.2% (8/33); la tasa de infección en los triatominos fue de 44% (8/18) y la especie encontrada fue *Meccus pallidipennis*. De las 74 viviendas analizadas, 13 tuvieron por lo menos un caso positivo en humano, en perro o en el triatomo.

Conclusiones. Los resultados indican la presencia

de anticuerpos contra *T. cruzi* en humanos y perros y del parásito en triatominos en una localidad de clima templado ubicada a 1,630 m snm.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, humanos, perros, triatominos

ABSTRACT

***Trypanosoma cruzi* antibodies in humans and dogs, and the presence of parasite in *Meccus pallidipennis* in Pantitlán Puente, Morelos, Mexico**

Introduction. Chagas disease (CD) is endemic in Latin-American countries, including Mexico. In the state of Morelos, Mexico, past epidemiological studies have confirmed the relevance of CD.

Objective. To detect antibodies against *T. cruzi* in blood of humans and dogs, and to determine parasites in *Triatominae* in the community of Puente Pantitlan, Morelos.

Materials and Methods. This was a pilot transversal study performed during the period of October 2003 to October 2004. Sampling was conducted in 74 households; 233 blood samples were obtained from persons > 5 years old and 33 blood samples from dogs; and triatomines were collected to for taxonomic classification and to detect parasites. Antibodies against *T. cruzi* in humans were deter-

Autor para correspondencia: Dr. Celso Ramos, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Colonia Santa María Ahuacatitlán CP 62100, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: cramos@insp.mx

Recibido: el 8 de agosto de 2011. **Aceptado para publicación:** el 15 de noviembre de 2011

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb112231.pdf>

mined by ELISA and indirect immunofluorescence (IF), and by ELISA in dogs. Parasites in *Triatominae* feces were observed by optic microscopy.

Results. Seroprevalence was 1.2% (3/233) in humans and 24.2% (8/33) in dogs. *Meccus pallidipennis* was the only triatomine captured. They were found to have a 44% (8/18) CD infection rate. Thirteen out of 74 households had positive CD cases in humans, dogs or triatomines.

Conclusions. These findings confirm the relevance of Chagas disease in a temperate rural community of the State of Morelos located 1,630 meters above sea level.

Key words: Antibodies *Trypanosoma cruzi*, human, dogs, triatomines, *Triatominae*

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) es una zoonosis endémica de varios países de América Latina; es causada por el protozoario *T. cruzi* y transmitido a través de las heces de los triatomíneos infectados a una diversidad de animales, incluyendo al hombre (1,2). La enfermedad está distribuida en la mayoría de los países de Centroamérica, Sudamérica y México; se estima que hay alrededor de 11 millones de personas infectadas y más de 60 millones están en riesgo de adquirir la infección (2-5). La EC cursa con una fase aguda, seguida de una fase indeterminada asintomática y una crónica que se manifiesta a largo plazo en aproximadamente el 30% de las personas infectadas; en esta fase, la parasitemia es difícil de demostrar y la presencia de anticuerpos en la sangre es el recurso de diagnóstico más importante (2-6). Se han descrito diversos mecanismos de transmisión, de los cuales destacan el vectorial (transmisión natural), por transfusión sanguínea, congénita, trasplante de órganos, oral y accidental (7-11).

En el continente americano, se reconocen 128 especies de triatomíneos hematófagos agrupados en 5 tribus y 14 géneros (11-13). En México, se han descrito alrededor de 33 especies, de las cuales 18 (54.5%) han sido reportadas con infección

natural; los géneros más comunes son *Triatoma*, *Meccus* y *Rhodnius* (14,15). Por otro lado, se han descrito más de cien especies de mamíferos que actúan como reservorios incluyendo al hombre, así como animales domésticos (p.ej. *Cannis familiaris*), sinantrópicos (p.ej. *Didelphis marsupialis*) y silvestres (p.ej. *Dasyopus novemcinctus*) (16).

En México, se desconoce la prevalencia real de la EC y diversos estudios epidemiológicos han demostrado la presencia de la enfermedad en amplias regiones urbanas y rurales del país (17-25). La migración de personas de zonas endémicas ha favorecido la dispersión de la EC a regiones no endémicas como Canadá, EE.UU., Europa, Asia y Oceanía (26).

En el estado de Morelos, diversos estudios confirman la presencia de la EC en casi la totalidad del territorio estatal (12,27-32). La mayoría de los estudios en Morelos se han realizado en zonas conocidas por su endemidad; sin embargo, no se han realizado investigaciones en localidades con clima templado ubicadas por arriba de los 1600 m snm. Estudios realizados en el Estado de Morelos en donadores de sangre han reportado valores variables de anticuerpos contra *T. cruzi* (27-31). Otras investigaciones en animales domésticos (perro) y en vectores confirman la presencia del parásito y el riesgo de adquirir la infección (33,34).

Nuestro grupo de trabajo ha realizado estudios que destacan a la EC como un problema de salud pública en la entidad; así, los estudios serológicos realizados en diversas regiones endémicas indican una alta prevalencia de anticuerpos e individuos con diversas alteraciones electrocardiográficas (27); el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha permitido detectar al parásito en personas que refieren haber sido picadas por los triatomíneos (29). Hemos realizado otros estudios en pacientes con serología positiva y/o con parásitos en sangre, quienes han sido tratados con Nifurtimox (Rangel y cols. Trabajo no publicado).

En el presente estudio piloto, se determinó la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en per-

Enfermedad de Chagas en Morelos, México

sonas y en perros y de parásitos en las chinches (vectores). Este trabajo se realizó atendiendo una solicitud de la autoridad municipal de salud, quien refiere que habitantes de la localidad han detectado la presencia de triatomas y solicitaron conocer la situación de la enfermedad de Chagas en esta comunidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

La localidad de Puente Pantitlán está ubicada al noroeste del estado de Morelos, con una altitud de 1,630 metros sobre el nivel del mar (m snm), tiene un clima semicálido, subhúmedo y una temperatura promedio anual de 19.3°C. De acuerdo con el censo del año 2000, esta localidad tenía aproximadamente 277 habitantes (35). El protocolo de este trabajo fue evaluado y aprobado por la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del estado de Morelos y por las autoridades de Salud Estatal y Municipal. Antes de la intervención, se ofrecieron pláticas sobre la EC en la localidad, utilizando material audiovisual, carteles y ejemplares de triatomos, al mismo tiempo se invitó a la población a participar en el proyecto. Las personas que participaron en este estudio firmaron una carta de consentimiento informado y respondieron a un cuestionario que tiene información demográfica, de la vivienda, sobre la enfermedad y los vectores, entre otras.

En octubre de 2003, se tomaron 233 muestras de sangre de personas > de 5 años y de 33 perros sin distinción de raza ni edad; en los humanos, no se incluyeron niños menores de 5 años de edad debido a que no se autorizó el consentimiento de los padres de familia.

La toma de muestras serológicas de perros se hizo en el período septiembre de 2003-octubre de 2004, aprovechando la campaña de vacunación contra la rabia a cargo de la Secretaría de Salud de Morelos (SSM). Los sueros se obtuvieron por centrifugación de las muestras de sangre a 1,500 rpm durante 10 min a 4°C. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

La captura de los triatomos se realizó de

septiembre a diciembre de 2003 en el domicilio y en el peri-domicilio, con la participación de los habitantes. Sin embargo, no se hizo una búsqueda intencional por parte de los investigadores, debido a la dificultad para que los habitantes permitieran el acceso a las viviendas.

Detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en suero de humanos

Ensayo inmunoenzimático (ELISA). A los 233 sueros se les determinó anticuerpos contra el parásito, utilizando la cepa de *T. cruzi* INC-1 aislada de un caso crónico con cardiopatía chagásica (CCC) de Oaxaca; para verificar los resultados del primer ensayo, se realizó un segundo ensayo utilizando los siguientes aislados de *T. cruzi* de casos humanos: CL-Brener (Brasil), Mor-5 (Morelos), HI (Yucatán), INC-5 (Guanajuato) y NAY (Nayarit), aislado de un triatomino. Los antígenos utilizados fueron extractos crudos solubles de parásitos y su uso en las técnicas de ELISA fueron previamente estandarizados y validados (36).

Se sensibilizaron placas de 96 pozos con 50 µl/pozo de antígeno a una concentración de 2 µg/mL en buffer de carbonatos, pH 9.6 y SDS 0.1% durante 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 2 veces con PBS-Tween 0.05% (PBS-T). El bloqueo se realizó con 200 µl/pozo de PBS-leche descremada al 5% durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS-T. Se agregaron por duplicado 50 µl/pozo del suero problema diluido 1:30 en PBS-T y la placa se incubó 2 horas a 37°C o toda la noche a 4°C. La placa se lavó 4 veces con PBS-T, se agregaron 50 µl/pozo del conjugado anti-IgG humano marcado con peroxidasa [HRP-Goat anti-human IgG (H+L), Invitrogen] diluido 1:3000 en PBS-T y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Se lavaron 4 veces con PBS-T, se añadieron 100 µl/pozo del sustrato (Ortofenilenediamina disuelta en buffer de citratos, pH 5) y se incubó a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. La lectura de la placa se realizó en un espectrofotómetro a 405 nm. El punto de corte (promedio + 5 DS) se estableció con una

muestra de 30 sueros de sujetos sanos (37,38).

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se utilizaron epimastigotes de la cepa INC-1 de *T. cruzi* colocados en portaobjetos horadados. Los sueros se analizaron en diluciones seriadas 1:32, 1:64 y 1:128 en PBS 0.01M, pH 7.2 y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron cuatro veces con PBS, se agregó el conjugado anti-IgG humano, marcado con fluoresceína, diluido 1:80 en PBS y azul de Evans; los portaobjetos se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavarlos 4 veces con PBS, se agregó 1 gota de glicerol a cada pozo y se observaron en el microscopio de epifluorescencia (40X). De acuerdo con el procedimiento estandarizado, las muestras fluorescentes a una dilución >1:32 se consideraron positivas (38).

Los sueros positivos por ELISA fueron confirmados con la técnica de IFI. En ambos ensayos, se utilizaron sueros controles positivos y negativos; se consideró como positivo un suero reactivo a las dos pruebas serológicas (38).

Detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en suero de perros. Debido a la limitada cantidad de suero, sólo se utilizó la técnica de ELISA, como fue descrita en humanos. Los sueros se analizaron a una dilución 1:100 y se usó el conjugado anticuerpo IgG anti-perro producido en cabra y marcado con peroxidasa, diluido 1:1500. El punto de corte se calculó utilizando 30 muestras de suero de animales sanos y negativos para anticuerpos contra el parásito (promedio + 5 desviaciones estándar), de acuerdo con el procedimiento previamente estandarizado (38).

Detección del parásito en triatominos. Los vectores capturados se colocaron en un envase rotulado. La presencia del parásito se hizo mediante la observación de las heces en un microscopio óptico (40X). Los 18 ejemplares capturados se identificaron de acuerdo con las guías descritas por Lent & Wigodzinsky (39) y fue realizada por personal especializado en la Facultad de Ciencias

Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Análisis de datos. La información de los cuestionarios se capturó en el programa SPSS ver. 9.0.

RESULTADOS

En el primer ensayo de ELISA, se utilizó la cepa de *T. cruzi* INC-1, del cual se obtuvieron 5 sueros positivos, los cuales fueron confirmados cuando se usó la mezcla de 5 extractos de los aislados de *T. cruzi* CL-Brener, Mor-5, HI, INC-5 y NAY. De éstos, sólo 3 sueros fueron positivos con la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), con una seroprevalencia de 1.2% (3/233).

De los sueros analizados, 96 (41.2%) fueron del sexo masculino y 137 (58.8 %) del sexo femenino. El intervalo de edad fue de 5-79 años y la edad promedio de 27 años (IC95% de 24.9–29.6). Los sueros positivos correspondieron al género masculino, con una edad de 44, 33 y 9 años, originarios de los estados de Oaxaca, Distrito Federal y Morelos, con un tiempo de residencia en la localidad de Puente Pantitlán de 25, 2 y 9 años, respectivamente. Los casos positivos fueron notificados a la Secretaría de Salud de Morelos para su evaluación clínica, tratamiento y seguimiento. Las tres personas conocían a la chinche. Sin embargo, afirmaron no haber sido picados; sus viviendas estaban construidas con techos de lámina de asbesto y cartón, las paredes de tabique, tabicón sin repellar con grietas.

De los datos incluidos en el cuestionario sobre las características de la vivienda, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas con los casos positivos. De las 74 viviendas incluidas en el estudio, 13 tuvieron por lo menos un caso positivo, ya sea humano, perro o chinche.

El 61% (45/74) de las viviendas tuvieron un total de 99 perros y se tomó muestra a 33 animales distribuidos en 22 casas. No se tomó muestra de sangre a todos los animales debido a que los dueños no lo aceptaron; en total, 8 perros fueron positivos para anticuerpos contra *T. cruzi*

(24.2%, 8/33).

Los 18 ejemplares de triatominos (17 adultos y una ninfa del quinto estadio) colectados se identificaron como *Meccus pallidipennis* y la tasa de infección fue de 44.4% (8/18). A pesar de que se colectaron 25 ejemplares más de triatominos, no fueron incluidos en el resultado final debido a que no tenían datos completos del lugar de colecta; de éstos, 13 fueron positivos (52%). Estos ejemplares no fueron clasificados taxonómicamente.

DISCUSIÓN

La prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en las personas incluidas en este estudio de la localidad de Puente Pantitán, Morelos, fue de 1.2%, la cual es baja en comparación con otros estudios serológicos realizados en regiones endémicas del estado de Morelos (28). El resultado del ensayo tamiz con la técnica de ELISA, donde se utilizó como antígeno un extracto de *T. cruzi* (INC-1), fue similar cuando se utilizaron 5 extractos de parásitos de diverso origen y sugiere que los anticuerpos reaccionan con antígenos conservados en diversos aislados (40). En este trabajo, no se incluyeron niños menores de 5 años de edad porque no fue autorizado por los padres de familia. Otros estudios, realizados en niños en zonas endémicas de la entidad, han demostrado bajas prevalencias como fue reportado en un estudio serológico realizado por Chávez y cols., en 450 niños de tres escuelas de nivel primaria de Jiutepec, Morelos (31); en otros estudios realizados en zonas de alta endemidad del país, se han detectado casos positivos en niños menores de edad (41,42). El presente estudio tiene relevancia porque es el único realizado en el estado de Morelos en una zona ubicada a más de 1630 m snm y cuyos resultados indican la necesidad de considerar que otras comunidades de la entidad, con características similares, sean incluidas en el estudio de la enfermedad de Chagas.

Los animales domésticos, como el perro, pueden ser reservorios del parásito y tener un papel importante en el ciclo de transmisión de *T. cruzi* en el ambiente domiciliario y peri-

Enfermedad de Chagas en Morelos, México

domiciliario (43-46), además de que en el medio rural el perro es un animal que puede desplazarse de un lugar a otro dentro de la misma localidad. Los perros están expuestos a la picadura de los triatominos en su lugar de descanso o adquirir la infección mediante la caza o alimentación de animales silvestres infectados (47-49).

En este estudio, los perros analizados tuvieron una seroprevalencia de 24% y, a pesar de que no se buscó al parásito en sangre, sugiere que puede ser reservorio de la infección como ha sido propuesto por otros estudios (33).

Un estudio realizado en perros de dos localidades urbanas de México (Morelos y Puebla) reportó una seroprevalencia de 8.8% en perros de Cuernavaca, Morelos, y 24.2% en animales de Puebla (32); datos similares han sido reportados en perros de áreas urbanas y rurales del estado de Yucatán, donde la seroprevalencia fue de 9.8% en áreas rurales y de 14.4% en zonas urbanas (50, 51). En países endémicos como Argentina, se han reportado en perros prevalencias de anticuerpos elevadas (65%), a pesar de los programas de control de la enfermedad de Chagas establecidos en este país (52-54).

Los 18 ejemplares de triatominos colectados se identificaron como *Meccus pallidipennis* y la tasa de infección fue de 44.4% (8/18). La mayoría de las chinches analizadas en este estudio y que resultaron infectadas se capturaron dentro de la vivienda. Sin embargo, hay que mencionar que la búsqueda de las chinches en el hogar no fue intencional y sólo se analizaron aquellas que fueron capturadas por los residentes de los hogares, razón por la cual el número de muestras colectadas fue limitado. Además, muchos ejemplares no fueron incluidos en el estudio debido a falta de información del sitio de captura. De éstos, 13 de 25 (52%) tuvieron parásitos en heces. No se hicieron otros estudios de los parásitos detectados en los triatomas. Sin embargo, es importante tipificar los linajes de los parásitos a fin de aportar información sobre los ciclos de transmisión en la localidad de estudio, que permitirá saber si hay diferencias entre los parásitos encontrados en el domicilio

y el peri-domicilio, así como entre reservorios y vectores. Actualmente, nuestro grupo de trabajo está preparando una propuesta enfocada al aislamiento de parásitos de personas, animales y vectores en zonas endémicas del estado de Morelos, que permitirá conocer los linajes de los parásitos y aportar información sobre los ciclos de transmisión. En un estudio publicado por Rangel-Flores *et al.* (27), que fue realizado en una zona endémica del estado de Morelos, los parásitos aislados de personas seropositivas fueron caracterizados por sus perfiles isoenzimáticos (zimodemo Z1); este dato es similar a lo reportado por López-Olmos *et al.* (55).

En el estado de Morelos, se han realizado diversos estudios entomológicos que reportan altas tasas de infección (23-94%) en la especie *M. pallidipennis* y 70% en *T. barberi* (56). En otros estudios, se reportó infección por *T. cruzi* en 29% de triatomos capturados en el domicilio, 4% en chinches del peri-domicilio y 20% en vectores selváticos (57-59). Los reportes de tasas de infección en triatomos de otras regiones de México son muy variables. Así, en Yucatán hay reportes de 17.3% en *T. dimidiata* (60), en el área urbana de Jalisco de 15.4% y 84.6% en comunidades rurales, con predominio de *M. longipennis* y *T. barberi* (15).

Es indudable que la presencia de triatomos infectados en el domicilio o el peri-domicilio es un factor de riesgo para los residentes, ya que personas y animales domésticos, como el perro, están en riesgo de adquirir la infección. Por lo tanto, es necesario ampliar este estudio con un diseño epidemiológico que permita conocer la dinámica de transmisión del parásito en el ambiente domiciliario o peri-domiciliario, donde conviven humanos con perros y triatomos, particularmente donde las condiciones de la vivienda permiten la proliferación de los vectores.

En Puente Pantitlán hay viviendas que tienen las características propicias para el desarrollo del ciclo biológico de los triatomos (40). En 13 casas de 74 estudiadas se encontraron, por lo menos, un caso positivo de humanos, perros o chinches

infectadas. Sin embargo, en ninguna vivienda se presentaron los 3 casos positivos juntos. A pesar de que algunos factores de la vivienda y el riesgo de adquirir la infección no fue un objetivo principal de este trabajo, el análisis de la información contenida en el cuestionario indica que no hubo asociación estadísticamente significativa entre las condiciones de la vivienda y la presencia de casos seropositivos en humanos, perros y triatomos infectados; sin embargo, es necesario realizar estudios enfocados a este objetivo, a fin de entender la compleja interacción de factores bióticos y abióticos que participan en la transmisión de *T. cruzi* en el ambiente domiciliario y peri-domiciliario (42-44).

Hasta donde tenemos información, éste es el primer estudio que se realiza en una localidad del estado de Morelos ubicada a 1,630 m snm y con una temperatura promedio anual de 19°C. Hay otros estudios similares realizados en Puebla (36) y en el estado de México (33). En el primero, Sosa-Jurado (36) hicieron un estudio serológico en humanos y perros, así como la búsqueda de triatomos infectados en la comunidad de Palmar de Bravo, en el estado de Puebla. La seroprevalencia en humanos (4%) fue parecida a la reportada en este estudio; de los reservorios analizados (equinos, porcinos y caninos), sólo 10% de los perros tuvieron anticuerpos contra *T. cruzi* y 10% de los triatomos infectados fueron de la especie *T. barberi*; este trabajo se realizó en una comunidad rural del estado de Puebla ubicada por arriba de 2,000 m snm. En el trabajo publicado por Estrada-Franco y cols. (33), hicieron un estudio epidemiológico en humanos y perros en comunidades del Municipio de Tejupilco, estado de México, ubicadas entre 1,000 y 2,500 m snm, donde encontraron una seroprevalencia de 7.1% en humanos y 21% en perros; es interesante el hallazgo de anticuerpos contra *T. cruzi* en perros de la ciudad. de Toluca, donde se encontró una seroprevalencia de 17.5%. Adicionalmente, reportaron una correlación entre seropositividad en humanos y perros. Otros estudios realizados en Argentina por Gurtler y cols. han demostrado que la presencia de perros o

gatos infectados en el hogar está asociada con la prevalencia e incidencia de infección por *T. cruzi* en humanos (53).

Estos hallazgos resaltan la importancia de la enfermedad de Chagas en Morelos y sugieren que se realicen estudios epidemiológicos no sólo en zonas tropicales, reconocidas por su endemidad, sino también en zonas templadas.

REFERENCIAS

1. **World Health Organization Expert Committee.** Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 2002; 905:1-109.
2. **Guzman-Bracho C.** Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends in Parasitol 2001; 17:372-76.
3. **Velasco-Castrejón O, Guzmán BC, Ibáñez-Bernal S.** Enfermedad de Chagas en: Enfermedades Tropicales en México. Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica 1994. p. 279-92.
4. **Duffy T, Bisio M, Althech J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al** Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. PLOS Negl Trop Dis 2009; 3:419.
5. **Barbu C, Dumonteil E, Gourbiere S.** Optimization of Control Strategies for Non-Domiciliated *Triatoma dimidiata*, Chagas Disease Vector in the Yucatán Peninsula, Mexico. PLOS Negl Trop Dis 2009; 3:416.
6. **López-Antuñano FJ.** Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. Salud Púb Méx 1997; 42:463-71.
7. **World Health Organization.** Control of Chagas' disease – Report of a WHO Expert Committee. Technical report series 1991; 811:9-10 Geneva.
8. **Wendel S, Brener Z, Camargo ME.** Chagas' disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusión and clinical medicine. Sao Paulo 1992. Ed ISBT 92:1-3.
9. **Signori PK, Schmidt FL, Guaraldo AMA, Franco RMB, Dias VL, Passos LAC.** Chagas' disease as a Foodborne Illness. J Food Protec 2009; 72: 441–46
10. **Schmunis GA.** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102:75-85.
11. **Sandoval-Ruiz C, Zumaquero-Rios J, Linalres G, Alejandro Aguilar R, Cedillo Ramírez ML y López Olguin JF.** Infección natural con *Trypanosoma cruzi* en triatominos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectores de la enfermedad de Chagas en San Antonio Rayón, Jonotla, Puebla, México. Ver Tec Panama 2004; 6:39-47.
12. **Bautista N, Rojas G, De Haro I, Bucio M y Salazar Schettino PM.** Biological behavior of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) in the State of Morelos, México. Bol Chil Parasitol 2001; 57:3-4.
13. **Schoeld JC, Diotaiut L, Dujardin JP.** The process of domestication in triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94:375-79.
14. **Magallon-Gastelun E, Magdaleno-Peñaloza NC, Katthain-Duchateau G, Trujillo-Contreras F, Lozano-Kasten FJ, Hernández-Gutiérrez RJ.** Distribution of Chagas' disease vectors (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in the state of Jalisco, Mexico. Rev Biomed 1998; 9:151-57.
15. **Gómez-Hernández C, Rezende-Oliveira K, Cortéz-Zárate A, Cortéz-Zárate E, Trujillo-Contreras F, Ramirez LE.** Prevalência de triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) infectados por *Trypanosoma cruzi*: sazonalidade e distribuicao na regioao Ciénege do Estado de Jalisco, México. Ver Soc Bras Med Trop 2008; 41:257-62.
16. **Ruiz-Piña H, Cruz-Reyes A.** The *Opossum didelphys virginiana* as a Synanthropic Reservoir of *Trypanosoma cruzi* in Dzidzilché, Yucatán, México. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 95:613-20.
17. **Velasco O, Valdespino L, Tapia C.** Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. Salud Pública Méx 1992; 34:186–96.
18. **Biagi F, Tay J, Guzmán C, Fong F, Tetitlán Guerrero:** foco endémico de la enfermedad de Chagas. Rev Fac Med UNAM (México) 1964; 6:625–31.
19. **Quintal R, Zavala J, Rodríguez M.** La enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. Rev Invest Clin 1975; 27:255–8.
20. **Tay J, Salazar-Schettino PM, Velasco CM, De Haro I, García YY, Gutierrez QM.** Estudio epidemiológico de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, República Mexicana. Salud Pública Méx 1979; 20:145–9.
21. **Goldsmith RS, Kagan IG, Zárate R, Reyes G, Cedeño-Ferreira J.** Estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Oaxaca, México. Bol Oficina Sanit Panam 1979; 87:1–19.
22. **Goldsmith RS, Ortega M, Zárate R, Zárate L, Beltrán F.** Seroepidemiologic surveys for Chagasdisease in Chiapas, México. Arch Invest Med 1983; 14:43–50.
23. **Salazar Schettino PM, Tay J, Ruiz A, Haro I de, Bucio M, Jiménez J, et al.** Seropositividad a *Trypanosoma cruzi* en cuatro grupos de población del estado de Oaxaca. Rev Salud Pública Mex 1984; 26:589–95.
24. **Cortés JM, Velasco O, Labastida M, Melchor A, Duarte N, De Torre R.** La enfermedad de Chagas en Santiago Yosotiche, Oaxaca, México. Salud Pública Méx 1985; 2:60–5.

Enfermedad de Chagas en Morelos, México

25. **Sánchez B.** Miocardiopatía crónica e infección por *Trypanosoma cruzi* en una localidad de Morelos y Tabasco [tesis de maestría]. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México; 1988.
26. **Rodrigues Coura J, Albajar P.** Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010; 465: S6-7.
27. **Rangel-Flores H, Sanchez B, Mendoza-Duarte J, Barnabe C, Breniere SF, Ramos C, et al.** Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in urban of central Mexico: Correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65:887-95.
28. **Rangel H, Gatica R, Ramos C.** Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in donors from a blood bank in Cuernavaca Morelos, Mexico. *Arch Med Res* 1998; 29:79-82.
29. **Gaona-Bernal J.** Diagnostico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos del Estado de Morelos con riesgo de desarrollar la enfermedad de Chagas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2003.
30. **Zepeda-Mendoza K.** Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en individuos que radican en el Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2000.
31. **Chávez-López V.** Tesis de Maestría: Estudio de la Enfermedad de Chagas en niños de Progreso, Jiutepec, Morelos, México. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma del Estado de Morelos; 2005.
32. **García-Vazquez Z, Rosario-Cruz R, Miranda-Miranda E, Dominguez-Marquez A.** A Serological survey of *Trypanosoma cruzi*: infection in dogs of two urban areas of México. *Pre Vet Med* 1995; 25:1-6
33. **Estrada-Franco JG, Bhatia V, Diaz-Albiter H, Ochoa-García L, Barbabosa A, Vazquez-Chagoyan JC, et al.** Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerging Infect Dis* 2006; 12:624- 630.
34. **Ortega-Pacheco A, Rodriguez-Buenfil JC, Bolio-Gonzalez ME, Sauri-Arceo CH, Jiménez-Coello M, Linde Forsberg C.** A Survey of Dog Populations in Urban and Rural Areas of Yucatan, Mexico. *Anthrozoos* 2007b; 20:261-274.
35. **INEGI 2000.** XII Censo General de Población y Vivienda.
36. **Sosa-Jurado F, Zumaquero-Ríos JL, Reyes PA, Cruz-García A, Guzmán-Bracho C, Monteón VM.** Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. *Salud Pública Méx* 2004; 46:39-48.
37. **Camargo ME, Segura E, Kagan IG, Pacheco-Souza JM, Carvalheiro JR, Yanovsky JF.** Normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en las Américas; evaluación de tres años de colaboración. *Bol Oficina Sanit Panam* 1987; 102:449-63.
38. **Monteón-Padilla VM, Sosa T, Reyes-López PA.** Serological test for American tripanosomiasis: A comparative study. *Rev Lat Microbiol Mex* 1989; 31:35-38.
39. **Lent H y Wigodzensky P.** Revision of triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979; 163:124-520.
40. **Monteón V, Godínez S, Cruz-Zetina G, Balmes J, López R, Hernández O.** Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: Metacicloogénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol. *Rev Biomed* 2009; 20:206-21.
41. **Ramos-Ligonio A, López-Monteón A, Guzmán-Gómez D, Rosales-Encina JL, Limón-Flores Y, Dumonteil E.** Identification of a Hyperendemic Area for *Trypanosoma cruzi* Infection in Central Veracruz, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83:164-170
42. **Salazar PM, Rojas G, Bucio M, Cabrera M, García G, Ruíz A, et al** Seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y su asociación con factores de riesgo en menores de 18 años de Veracruz, México. *Rev Panam Salud Pública* 2007; 22:75-82.
43. **Turriago GBC, Vallejo GA y Guhl F.** Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* en perros de dos áreas endémicas de Colombia. *Rev Fac Med* 2008; 16:11-18.
44. **Gurtler RE, Céceres MC, Rubel DN, Petersen RM, Schweigman NI, Lauricella Ma et al.** Chagas disease in north-west Argentina: Infected dogs as a risk factor for the domestic transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85:741-45.
45. **Gurtler RE, Petersen RM, Lauricella MA, Wisnivesky-Colli C.** Infectivity to the vector *Triatoma infestans* of dogs infected with *Trypanosoma cruzi* in north-west Argentina. *Amp Trop Med Parasitol* 1992; 86:111-19.
46. **Mott KE, Mota EA, Sherlock I, Hoff R, Muñiz TM, Oliveira TS, et al.** *Trypanosoma cruzi* Infection in dogs and cats and household seroreactivity to *T. cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Amp J Trop Med Hyg* 1978; 27:1123-27.
47. **Rojas ME, Vázquez P, Villareal MF, Velandia C, Vergara L, Morán-Borges, et al.** Estudio seroepidemiológico y entomológico sobre la enfermedad de Chagas en una área infestada por *Triatoma maculata* (Erichson 1848) en el centro-occidental de Venezuela. *Cau Saúde Pública.* Rio de Janeiro 2008; 24:2323-33.
48. **Reyes L, Silesky E, Cerdas C, Chinchilla M, Guerrero O.** Presencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*

Enfermedad de Chagas en Morelos, México

- en perros de Costa Rica. *Parasitol Latinoam* 2002; 57:1-2.
49. **Montenegro VM, Jiménez M, Pinto JC, Zeledón R.** Chagas Disease in Dogs from Endemic Areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:491-94.
 50. **Jiménez-Coello M, Poot-Cob M, Ortega-Pacheco A, Guzman-Marin E, Ramos-Ligonio A, Sauri-Arceo CH, et al.** American Tripanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatan, Mexico. *Vet Borne Zoo Dis* 2008; 8:755-62.
 51. **Cruz-chan JV, Bolio-González M, Colín-Flores R, Ramírez-Sierra MJ, Quijano-Hernández I, Dumonteil E.** Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Vet Parasitol* 2009; 162:151-55.
 52. **Lauricella MA, Castañeda MB, Gurtler RE, Segura EL.** Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' Disease) Infection in naturally infected dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:501-07.
 53. **Gurtler RE, Cecere MC, Lauricella MA, Cardinal MV, Kitron U, Cohen JE.** Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology* 2007; 134:69–82.
 54. **Gurtler RE, Cohen JE, Cecere MC, Lauricella MA, Chuit R, Segura EL.** Influence of human and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:748-758.
 55. **Lopez-Olmos V, Pérez-Naser N, Piñero D, Ortega E, Hernández R, Espinoza B.** Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 1998; 69:239-254.
 56. **Cortez-Jiménez M, Noguera-Torres B, Alejandro-Aguilar, Isita-Torneli L, Ramírez-Moreno.** Frequency of Triatomines Infected with *Trypanosoma cruzi* Collected in Cuernavaca City, Morelos, México. *Rev Latinoam Microbiol* 1996; 38: 115-19.
 57. **Bautista NL, García de la Torre GS, De Haro I, Salazar PM.** Importance of *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) as a vector of *T. cruzi* (Kinetoplasta: Trypanosomatidae) in the state of Morelos, Mexico, possible ecotopes. *J Med Entomol* 1999; 36:233-35.
 58. **Enger KS, Ordoñez R, Wilson ML, Ramsey JM.** Evaluation of Risk Factors Rural Infection by *Triatoma pallidipennis* (Hemiptera: Triatominae), a Mexican Vector of Chagas Disease. *J Med Entomol* 2004; 41:760-67.
 59. **Villegas-García JC, Santillán-Alarcón S.** Role of *Meccus pallidipennis* Stal (1872) in the transmission of *Trypanosoma cruzi* to man in the state of Morelos, central Mexico. *Entomol Vect* 2004; 11:349-62.
 60. **Zavala-Velázquez JE.** La enfermedad de Chagas en el Estado de Yucatán, México (1940-2002). *Rev Biomed* 2003; 14:35-43.