Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas (Trypanosoma cruzi) en la población escolar e incidencia parasitaria de *Triatoma dimidiata* en la parroquia Juan Gómez Rendón, Provincia del Guayas, Ecuador

Seroprevalence of Chagas disease (Trypanosoma cruzi) in the school population and parasitic incidence of Triatoma dimidiata in the Parish Juan Gómez Rendón, Province of Guayas, Ecuador

Verónica Calderóna* & Jaime Buestánb

^aMinisterio de Salud Pública-Programa Nacional de Chagas-SNEM, Julián Coronel 905, Guayaguil, Ecuador

Docente de la Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaguil, Av. Raúl Gómez Lince s/n y Av. Juan Tanca Marengo, Guayaquil, Ecuador

Recibido 24 de abril 2014; recibido en forma revisada 15 de junio 2014, aceptado 27 de junio 2014 Disponible en línea 31 de julio 2014

Resumen

Se realizaron encuestas serológicas y entomológicas para determinar la prevalencia de la enfermedad de Chagas, la presencia del vector y el índice tripano triatomino, en la población escolar de la parroquia Juan Gómez Rendón, en la provincia del Guayas, Ecuador. Se procesaron muestras sanguíneas de los estudiantes en 12 escuelas, utilizando la técnica de ELISA para detectar reactivos y se realizaron pruebas de confirmación en el Instituto de Salud Pública e Investigación por medio de ELISA (prueba inmuno enzimática para la detección de anticuerpos anti Trypanosoma cruzi) + HAI (hemaglutinación indirecta). Se analizaron 1.967 muestras resultando 23 reactivas y se confirmaron 8 casos. Fueron inspeccionadas 1.831 viviendas en 6 localidades a nivel intra y peridomiciliar, capturándose 8.702 triatominos identificados como Triatoma dimidiata en el área de entomología del Servicio Nacional de Control de la Malaria (SNEM). En cinco de las seis localidades se detectó la presencia del vector, el índice de infestación vectorial varió en un rango de 10,2 a 33,9% y el de colonización de 62 a 91,9%, se examinaron microscópicamente 5.650 Triatominos resultando 2.170 con infección natural con un índice Tripano Triatomino de 38,4%. La enfermedad de Chagas es un problema que afecta a la población menor de 15 años en 4 de las 12 escuelas estudiadas, el vector identificado fue Triatoma dimidiata.

Palabras claves: Epidemiología, Chagas, Ecuador, Triatoma dimidiata, Trypanosoma cruzi.

Abstract

Serological and entomological surveys were conducted to establish the prevalence of Chagas disease, the vector presence, and the trypan triatomine index in the school population of Juan Gómez Rendón Parish, in the Province of Guayas, Ecuador. To detect reactives, blood samples from students of 12 schools were processed using ELISA, confirmatory testing by ELISA (enzyme immunoassay test for the detection of anti Trypanosoma cruzi antibodies) + HAI (indirect hemagglutination) were performed at the Institute of Public Health and Research. Were analized 1.967 samples, 23 of those were reactive and eight cases were confirmed. A total of 1.831 houses were inspected at intra and peridomestic levels in six localities, 8.702 triatomine were captured, those were identified as Triatoma dimidiata in the area of entomology at the National Service of Malaria Control (SNEM). The vector presence has been detected in five of those six localities, the vector infestation index ranged from 10.2 to 33.9%, and the colonization varies from 62 to 91.9%. A total number of 5.650 triatomines were examined microscopically, 2.170 of those were naturally infected having a triatomine tripan index of 38.4%. The Chagas disease affects the population younger than 15 years old in four of the 12 studied schools, Triatoma dimidiata has been identified as the vector.

Keywords: Epidemiology, Chagas, Ecuador, Triatoma dimidiata, Trypanosoma cruzi.

^{*} Correspondencia del autor: E-mail: vero_calderon@hotmail.es



Introducción

La enfermedad de Chagas (EC) es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, constituye una amenaza permanente para casi la cuarta parte de la población de América Latina, se encuentra en casi toda América Central, México y América del Sur, las características epidemiológicas son altamente variables entre una y otra zona endémica (Beltrán *et al.*, 2001).

Dentro de los signos clínicos variables de la enfermedad; puede presentar infecciones asintomáticas, agudas o más frecuentemente crónica con complicaciones a nivel del corazón, aparato digestivo y sistema nervioso (Monteiro *et al.*, 2013).

En Ecuador ésta enfermedad constituye un problema de salud pública, las estimaciones de prevalencia de infección por *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)* probablemente alcanza el 1.38% de la población general (0.65% en la Sierra; 1.99% en la Costa y, 1.75% en la Amazonia) (Abad-Franch y Aguilar, 2003).

El vector más importante de la EC en Ecuador es el *Triatoma dimidiata*, se ha encontrado en todas las provincias de la Costa y es una especie exclusivamente doméstica-peri doméstica, condición que lo hace susceptible a ser eliminado por medio de la aplicación de insecticidas de acción residual (Abad-Franch y Aguilar, 2003). Coloniza viviendas que por lo general presentan características de construcción mixtas entre las cuales tenemos: Paredes de barro, ramas, adobe, caña o madera; suelos de tierra o tablas; techos de hojas de palma o paja; presencia de animales dentro o alrededor de las casas; hacinamiento y carencia de higiene doméstica (Aguilar *et al.*, 2001).

Posterior a la confirmación de un caso de la enfermedad de Chagas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), en el mes de diciembre del 2011 se decidió visitar la parroquia Juan Gómez Rendón, en la provincia del Guayas, para investigar si existían otras personas infectadas dando prioridad a la población escolar, además de determinar la presencia del vector en las viviendas.

La prioridad en la población escolar se efectuó siguiendo las recomendaciones de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), ya que existen estudios que indican que los niños a diferencia de los adultos pueden ser curados en un 100%, sin presentar complicaciones crónicas (Abad-Franch y Aguilar, 2003).

Materiales y Métodos

Área de estudio

La investigación se realizó en la parroquia Juan Gómez Rendón, perteneciente al cantón Guayaquil, en la provincia del Guayas, ubicada entre las siguientes coordenadas geográficas: 2°30'S/2°20'S y 80°30'W/80°15'W. La parroquia Juan Gómez Rendón

cuenta con 12 unidades educativas distribuidas en nueve escuelas: Juana Tola, Alberto Guerrero Martínez, Juan Escalante, Pedro Crisólogo Coronel, San Lorenzo, José Alfaro, Sergio Loor Alcívar, Víctor Emilio Estrada y Laura Loor de Cedeño; y tres colegios: 3 de Junio, Pablo Weber Cubillo y Elías Severo.

Encuesta serológica

Para este fin, previamente se dictaron charlas de sensibilización a profesores y estudiantes de las comunidades acerca de las manifestaciones clínicas, tratamiento, formas de transmisión, medidas de prevención y control de la enfermedad (técnica propuesta por el Programa Nacional de Chagas), posterior a lo cual conjuntamente con el personal técnico del programa Nacional de Chagas del SNEM-MSP, se realizó la búsqueda de seropositivos, procediéndose de la siguiente manera:

Toma de muestras sanguínea

Se extrajeron 5 ml de sangre en tubos tapa roja de vidrio al vacío de 10 ml (vacutainer) por punción venosa al 100% de los estudiantes. Los datos personales, la procedencia, edad, sexo, nombre de la unidad educativa, nivel de estudio y lugar donde se encuentra la unidad, se registraron en un formulario diseñado para este fin en donde además se escribió un código para cada alumno que coincidía con el código del tubo donde se colectó la muestra.

Manejo y conservación de las muestras en el laboratorio del Programa de Chagas

Las muestras sanguíneas fueron llevadas al laboratorio de parasitología del SNEM donde fueron centrifugadas a 2.400 rpm, se realizó la extracción de las muestras con pipetas Pasteur plásticas de 3 ml y posteriormente la colocación del suero en los viales plásticos tapa rosca de 2 ml que fueron guardados en congelación con su respectiva rotulación a una temperatura de 4°C (técnica propuesta por el Laboratorio del Programa Nacional de Chagas).

Para poder determinar por técnicas serológicas la enfermedad de Chagas, se realizó lo siguiente:

Análisis con la técnica de ELISA en el laboratorio del Programa de Chagas.

Las muestras fueron diluidas en el soporte en el que se encuentran inmovilizados antígenos recombinantes, obteniéndose un método de 3^{re} generación. Estos antígenos se obtienen por técnica de ADN recombinante a partir de proteínas específicas de los estadios epimastigote y tripomastigote del *T. cruzi*, correspondientes a zonas altamente conservadas entre distintas cepas.

Procedimiento con la técnica de ELISA

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Una vez iniciado el procedimiento debe completarse sin interrupción. Procesar simultáneamente dos controles positivos (CP), tres negativos (CN) y los desconocidos (D). Al depositar la muestra y/o controles sobre el diluyente

de muestras, debe asegurarse de colocar los mismos en el seno del líquido y no sobre las paredes o el fondo del pocillo. Enjuagar la pipeta con el diluyente dispensado en el pocillo para asegurar la correcta homogenización. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos, una vez cargadas las muestras en cada tira. Para evitar la evaporación, cubrir la placa e incubar en la estufa 30 minutos a 37°C. Luego aspirar cuidadosamente el líquido de cada pocillo recibiéndolo en un recipiente para desechos biológicos que contenga 5% de hipoclorito sódico. A continuación, lavar cinco veces con Buffer de lavado empleando aproximadamente 300ul/vez/pocillo. Después de cada lavado, el líquido se descartara también en el recipiente con hipoclorito. Opcionalmente, emplear lavador automático.

Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre el papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de la tiras de pocillos. Luego agregar en cada pocillo una gota de conjugado. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Para evitar la evaporación, cubrir la placa e incubar durante 30 minutos en estufa a 37°C. Luego aspirar el líquido de los pocillos, recibiéndolo en el recipiente con hipoclorito y lavar según se indicó anteriormente. Al finalizar el último lavado, eliminar por completo el líquido residual, invirtiendo la policubeta y golpeándola varias veces sobre el papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de la tiras de pocillos.

Luego agregar en cada pocillo una gota de revelador A y B. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Agregar una gota de Stopper. Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta durante 10 segundos. Leer en espectrofotómetro de densidad óptica a 450 nm o bicromática a 450/620-650 nm o evaluar el resultado a simple vista por comparación con los controles positivos y negativos (protocolo de Chagatest ELISA recombinante v. 3.0).

Las muestras reactivas fueron enviadas al Laboratorio de Parasitología del INSPI, el mismo que realizó las pruebas confirmatorias: ELISA (Prueba inmuno enzimática para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* + HAI (Hemaglutinación indirecta). Para considerar un caso como confirmado, se requiere que por lo menos dos de tres métodos de diagnóstico de laboratorio resulten reactivos (Segura y Escobar, 2005).

Para identificar el vector de la enfermedad de Chagas en la parroquia Juan Gómez Rendón y determinar los índices de infestación vectorial y analizar las heces de los vectores capturados para establecer infección natural, se realizó lo siguiente:

Encuesta de vivienda, búsqueda y captura del vector

La búsqueda del vector se realizó con los trabajadores del programa de control de la enfermedad de Chagas del Servicio Nacional de Control de enfermedades transmitidas por vectores (SNEM/MSP), la inspección de las viviendas se efectuó en el sentido de las manecillas del reloj. Se inspeccionaron detenidamente paredes internas, muebles, cajas, utensilios, adornos en las paredes, etc. y luego las paredes externas de la casa.

En el peri domicilio la búsqueda se efectuó en cercas o muros, acumulaciones de piedras, ladrillos, nidos de aves (gallinas, palomas, pavos), así como en lugares de almacenamiento de leña, maderos y otros materiales de construcción (Abad-Franch y Aguilar, 2003).

Luego de inspeccionar las viviendas los datos fueron anotados en una hoja de encuesta y fichas de visitas entomológicas que fueron tabulados en una hoja electrónica de Excel.

Además se realizó el cálculo de los indicadores entomológicos estandarizados utilizando las siguientes formulas (Abad-Franch *et al.*, 2001):

Los Triatominos capturados, fueron colocados en vasos colectores de plástico y de boca ancha de 13 cm de largo x 12 cm de diámetro con una tapa a presión a los que se les hace una abertura de 8 cm de diámetro que es cubierta con una malla. En el interior de los mismos se coloca una cartulina con dobleces para brindarle frescura oscuridad y una mayor área de reposo a los triatominos. Se colocaron 10 a 12 triatominos adultos y entre 15 a 20 ninfas o estadios inmaduros de manera separada en cada vaso colector. Cada vaso fue rotulado con los siguientes datos: provincia, parroquia, localidad, sitio de captura (intra y peridomicilio), lugar de captura, fecha de captura y nombre de la persona que realizó la captura (Cáceres, 2005).

Todos los especímenes fueron enviados al laboratorio de entomología para ser identificados por medio de claves taxonómicas utilizando el microscopio estereoscópico.

Diagnóstico parasitológico en el *T. dimidiata* Para el examen de los triatominos se utilizó la técnica establecida por Reyes (2010): Los triatominos fueron colocados en una bandeja plástica para separarlos por estadíos. Se presionó el abdomen del *T. dimidiata* con las pinzas entomológicas para que expulsen las heces. Las heces fueron colocadas en una placa porta objeto a la que se agregó 10 ul de solución salina al 2% homogenizándola con un palillo dental y luego de colocarle una lámina cubreobjeto se examinó al microscópico binocular con objetivo de 100x.

Una vez analizados todos los chinchorros capturados, se ingresó la información en una hoja electrónica de Excel. Se calculó el índice tripano triatomino utilizando la siguiente fórmula (Abad-Franch *et al.*, 2001).

Resultados y Discusión

Análisis socioeconómico

La mayoría de las viviendas de esta parroquia son de construcción mixta: Paredes de caña guadúa (Guadua angustifolia), pisos de tierra y entablado, techos de zinc y tejas, además en el peridomicilio es muy frecuente observar la presencia de animales domésticos y nidos de aves lo que las convierte en casas propicias para la reproducción del vector. Esta parroquia tiene una población de 11.897 habitantes (INEC, 2010), las fuentes principales de trabajo son el cultivo de maíz, cacao, mango y en algunas localidades aprovechan la presencia del manglar para la captura de cangrejos. Otras fuentes de ingreso en los hogares de esta parroquia son la cría de cerdos (40%), gallinas (50%) y chivos (10%). La falta de lluvias la han convertido en una región árida, en donde tan sólo crecen representantes de Hylocereus y Prosopis.

Resultados de encuestas serológicas

De un total de 1.967 muestras analizadas, 23 (1,16%) resultaron reactivas detectados por la técnica ELISA, de estas fueron confirmados ocho casos por HAI y ELISA en el INSPI lo que corresponde al 34,7%. La prevalencia de la enfermedad de Chagas fue de 0,41% (tabla 1), lo que difiere de los datos obtenidos en trabajos realizados en la provincia de Orellana en el mes de mayo del año 2013 por el personal técnico del Programa de Chagas del SNEM-MSP, con una prevalencia mayor de 0,88% de una muestra de 1.554 pacientes, esto probablemente se debe a que las viviendas no tienen paredes y los vectores de hábitos silvestres entran y salen libremente de las mismas. Difiere también de la estimación de la prevalencia Nacional de 1,38% registrada en los trabajos de Abad-Franch y Aguilar (2003), probablemente porque los trabajos se efectuaron en distintas regiones y poblaciones con vectores y tipos de construcción diferentes.

La distribución de los casos según sexo fue de 50% para el sexo masculino y 50% para el femenino y según los grupos etarios el 12,5% corresponde al grupo de

edad comprendido entre cinco a ocho años, 25% al grupo de nueve a once años y el 62,5% entre los doce a catorce años a diferencia de los estudios realizados en la provincia de Orellana donde la distribución de casos según sexo fue del 67% masculino y el 33% femenino, según trabajos realizados por personal técnico del Programa de Chagas en el mes de mayo del año 2013.

Resultados de encuestas entomológicas

De las seis localidades analizadas se determinó que en cinco hubo la presencia del *Triatoma dimidiata*, en total se inspeccionaron 1.831 casas, resultando 333 con presencia vectorial (18,1%), en 50 de las mismas se encontraron triatominos dentro de las casas (15%) y en 283 en el peridomicilio (85%); en 224 (67,3%) casas se recolectaron ninfas, lo que indica que el vector se encuentra domiciliado o colonizando las viviendas (tabla 2).

Los índices de infestación más altos se encontraron en las localidades de Progreso con 32,37%, San Lorenzo con 33,87% y Caimito con 24,5%. En todas las poblaciones estudiadas, se evidencia que el vector está colonizando las viviendas lo que representa mayor riesgo para la transmisión de la enfermedad y además indica que el vector puede ser eliminado a través de la utilización de plaguicidas de efecto residual (Abad-Franch *et al.*, 2001).

Los índices vectoriales de densidad, infestación, hacinamiento y colonización, fueron más elevados en las localidades con mayor número de casos confirmados, siete de los ocho casos se detectaron en las localidades Progreso y San Lorenzo. Los índices de colonización más elevados se presentaron en San Lorenzo 85,71%, Caimito 91,9 % y Progreso 62%.

La especie identificada fue *T. dimidiata*; de un total de 8.702 Triatominos capturados, se examinaron 5.650 ejemplares, de éstos 2.170 resultaron con infección natural por *Tripanosoma cruzi*, con un índice Tripano triatomino de 38,4%. A diferencia de los estudios realizados en el año 2012 por el Programa Nacional de Chagas en el cantón de Playas, el índice tripano triatomino fue de 80,1%, los cuales son altos en relación a los índices encontrados en la parroquia Juan Gómez Rendón.

Conclusiones

La enfermedad de Chagas provocada por el Trypanosoma cruzi es un problema que afecta a la población escolar menor de 15 años de edad en las escuelas estudiadas de la parroquia Juan Gómez Rendón del cantón Guayaquil en la provincia del Guayas.

La confirmación de ocho casos en menores de quince años, incluso un caso en un niño de cinco años de edad, indica que la enfermedad continúa transmitiéndose por vía vectorial de manera activa. Esto es confirmado por los índices vectoriales más

Tabla 1. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en la población escolar de la parroquia Juan Gómez Rendón, provincia del Guayas, Ecuador.

PROVINCIA /CANTÓN/ PARROQUIA	LOCALIDAD	NOMBRE DE UNIDAD EDUCATIVA	TOTAL	# DE ALUMNOS MUESTREADOS	MUESTRAS REACTIVAS	MUESTRAS CONFIRMADAS *INSPI	% DE SEROPREVALENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA POBLACIÓN ESCOLAR DE PROGRESO
		Escuela Fiscal Juana Tola	327	295	4	1	0,34%
		Escuela Alberto Guerrero Martínez	342	312	4	2	0,64%
	Progreso	Escuela Laura Loor de Cedeño	200	193	2	0	0,00%
		Colegio 3 de Junio	75	74	_	_	1,35%
		Colegio Pablo Weber Cubillo	200	496	9	4	0,81%
Guayas/	C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	Colegio Elías Severo	100	93	0	0	0,00%
Progreso		Escuela Juana Escalante	113	110	2	0	0,00%
)	Rcto. Sabana Grande	Escuela Fiscal Pedro Crisólogo Coronel	198	184	0	0	0,00%
	San Lorenzo	Escuela Fiscal San Lorenzo	96	91	0	0	0,00%
	Mamey	Escuela Fiscal José Alfaro	16	15	0	0	0,00%
	Olmedo	Escuela Fiscal Sergio Loor Alcívar	14	8	0	0	0,00%
	Caimito	Escuela Fiscal Víctor Emilio Estrada	120	96	_	0	0,00%
	TC	TOTAL	2.301	1.967	23	8	0,41%

Fuente: Estadística Proyecto Chagas SNEM-MSP * Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública

Tabla 2. Resultados de las encuestas entomológicas efectuadas en las localidades de Progreso, San Lorenzo, Sabana Grande, Puerto Sabana Grande, Caimito y Mamey de la parroquia Juan Gómez Rendón, provincia del Guayas, Ecuador.

LOCALIDAD	PRESENCIA DE TRIATOMINOS	ICIA DE MINOS	RESENCIA DE RASAS INVESTIGADAS # CASAS INVESTIGADAS	# CASAS	CASAS POSITIVAS CASAS POSITIVAS # DE CASAS CON	CASAS POSITIVAS	# DE CASAS CON	ESPECIE
	IS	ON		rUSILIVAS	IINI KADOMICILIAN		MINLAS	ENCONTRADA
Progreso	×		1.037	258	38	220	160	T. dimidiata
San Lorenzo	×		81	21	2	19	18	T. dimidiata
Sabana Grande	×		350	7	_	9	2	T. dimidiata
Puerto Sabana Grande		×	64	0	0	0	0	
Матеу	×		86	10	_	6	7	T. dimidiata
Caimito	×		201	37	œ	29	34	T. dimidiata
TOTAL	5	1	1.831	333	50	283	224	

elevados en las localidades donde hubieron mayor número de casos.

La prevalencia de la enfermedad de Chagas en la población estudiantil analizada indica que 4 de cada 1.000 estudiantes investigados tienen la enfermedad.

Se confirma que *Triatoma dimidiata* es el principal vector de la enfermedad de Chagas en Ecuador.

Los triatominos examinados presentaron infección natural por *T. cruzi*, con un porcentaje estimado como altamente infectados, por lo que es considerado un problema que afecta a la población estudiantil.

Los índices de colonización fueron muy altos en tres localidades de la parroquia Juan Gómez Rendón, lo que indica que el ciclo biológico del vector se está realizando dentro de las viviendas.

Referencias

- Abad-Franch, F. & H. M. Aguilar. 2003. Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. S.e. 20 p.
- Abad-Franch, F., F. S. Palomeque & H. M. Aguilar. 2001. Control de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en el Ecuador. S.e. 63 p.
- Aguilar, H. M., F. Abad-Franch, A. G. Guevara, J. Racines, A. Briones & V. Reyes. 2001. *Guía operacional para el control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador*. S.e. 40 p.

- Beltrán, M., S. Duque, F. Guhl, C. P. Herrera, M. C. López, A. L. Moreno, S. Nicholls & M. M. Santacruz. 2001. Prueba de ELISA y prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En: Guhl y Nicholls (eds.), Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, 98 p.
- Cáceres, A. 2005. Manual de procedimientos de identificación de Triatominos (Hemíptera: Reduviidae) del Perú. Ministerio de Salud. Ser. Normas Téc. 41:60.
- Chagatest ELISA recombinate v. 3.0: método de 3ª generación para la detección de anticuerpos contra el *Trypanosoma cruzi*. s.f. (en línea). Consultado 12 jul. 2013. Disponible en http://www.wienerlab.com.ar/wiener/catalogo/archivos/6376 chagatest elisa recombinante v. 3 0 sp.pdf
- INEC. 2010. Población parroquia Juan Gómez Rendón (en línea). Consultado 12 jul. 2013. Disponible en http://redatam.inec.gob.ec/cgibin/RpWebEngine.exe/PortalAction?&MODE=MAIN&BASE=CPV2010&MAIN=WebServerMain.inl
- Monteiro, W. M., A. P. Margioto, A. P. Gruendling, D. Dos Reis, M. L. Gómes, S. M. Márquez de Araújo, M. T. Bahia, L. K. Magalhaes, J. A. De Oliveira, H. Silveira, M. J. Toledo & Md. Vale. 2013. *Trypanosoma cruzi* I and IV stocks from Brazilian Amazon are divergent in terms of biological and medical properties in mice. Plos. Negl. Trop. Dis. 7(2):e2069. Consultado jul. 2014. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23437410
- Segura, E. L. & A. Escobar. 2005. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el estado de Veracruz (en línea). 47(3):201-208. Consultado 8 de Oct. 2013. Disponible en http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342005000300003.
- SNEM. 2011. Manual de normas y procedimientos para el control y vigilancia de la enfermedad de Chagas. 80 p.
- Reyes *et al.* 2010. Técnica de diagnóstico parasitológico en heces del vector. *Taller de la conferencia*. Portoviejo, Manabí, EC. 20 p.