

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA AMAZONÍA BOLIVIANA (PARTE I)

DETERMINATION OF THE PERCENTAGE OF PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE IN THE BOLIVIAN AMAZON (PART I)

Suxo Yajaira¹, Paucara Maria², Cerruto Yashira³, Campos Ana⁴, Matijasevic Mayela⁵, Soletto Mario⁶, Linares, Lizeth⁷, Coaguila German⁸, Robles Marita⁹, Callapa Jorgia¹⁰, Revollo Susana¹¹

¹Tesista de Bioquímica, en el laboratorio de Genética Molecular, instituto SELADIS, Universidad Mayor de San Andrés

²Bioquímica, Consultora del laboratorio de Genética Molecular – Instituto SELADIS

³Bioquímica, MSc. Asistente de Investigación del Laboratorio de Genética Molecular – Instituto SELADIS

⁴Bioquímica, Docente de la Universidad Autónoma del Beni José Ballivian

⁵Directora del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Beni José Ballivian

⁶Docente de la Universidad Autónoma del Beni José Ballivian

⁷Bioquímica, Docente de la Universidad Autónoma del Beni José Ballivian

⁸Médico cirujano, Docente de la Universidad Autónoma del Beni José Ballivian

⁹Bioquímica, Docente de la Universidad Autónoma del Beni José Ballivian

¹⁰Bioquímica, Jefa a.i. Laboratorio de Genética Molecular Instituto SELADIS

¹¹PhD. Directora del instituto SELADIS

Autor para correspondencia: Dra. Jorgia Callapa Rafael, jorgia76@gmail.com

Laboratorio de Genética Molecular, Instituto SELADIS, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Beni José Ballivian

RECIBIDO: 23/06/2017

ACEPTADO: 20/10/17

RESUMEN

OBJETIVO: Determinar la presencia de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana mediante diagnóstico serológico y molecular en muestras de suero y sangre de pacientes de las regiones de Riberalta, Guayaramerín y Cobija.

MATERIAL Y MÉTODOS: La población de estudio consistió en 192 personas mayores de edad habitantes de las regiones de Riberalta, Guayaramerín y Cobija quienes acudieron a los centros hospitalarios para una atención médica. Para el análisis de las muestras se utilizaron técnicas serológicas ELISA, HAI, IFI y la técnica molecular de la PCR en punto final.

RESULTADOS: Los resultados reflejaron un porcentaje de infección del 4,08 % del total de los pacientes de Cobija; 6,67% de los pacientes de Riberalta y 7,23% de los pacientes de Guayaramerín. Del total de los participantes el 74,48% fueron mujeres mayores de 17 años de edad. Los resultados de la PCR en punto final reflejaron un porcentaje de positividad general del 0,5%; los resultados de las pruebas serológicas reflejaron un porcentaje de positividad general del 6,25%.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Chagas, Diagnóstico Serológico, Diagnóstico Molecular

ABSTRACT

OBJETIVE: To determine the presence of Chagas' disease in the Bolivian Amazon by serological and molecular diagnosis in serum and blood samples from patients from Riberalta, Guayaramerin and Cobija regions.

MATERIAL AND METHODS: The study population was established by 192 elderly people living in the regions of Riberalta, Guayaramerin and Cobija who went to hospital for medical care. For the analysis of the samples serological techniques ELISA, HAI, IFI and the molecular technique of the PCR in end point were used.

RESULTS: The results reflected a percentage of infection of 4,08 of the patients of Cobija, 6,67 % of the patients of Riberalta and 7,23% of the patients of Guayaramerin. Of the total number of participants, 74,48% were women older than 17 years of age. The end-point PCR results showed a general positivity percentage of 0,5% the results of the serological tests reflected a general positive percentage of 6,25%.

KEYWORDS: Chagas disease, Serological Diagnosis, Molecular Diagnosis.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, la cual por sus características epidemiológicas está dentro de la lista de las principales “enfermedades desatendidas”¹ a nivel mundial. Esta enfermedad se transmite a los seres humanos principalmente por contacto con las heces de insectos (Triatominos de la familia Reduviidae, orden Hemiptera, Subfamilia Triatominae) infectados, también conocidos con varios nombres comunes según la zona geográfica. Existen otras formas de transmisión de importancia epidemiológica como la transfusión de sangre o de sus componentes; los trasplantes de órganos y otros tejidos; verticalmente de la madre al producto; por ingestión de alimentos contaminados y por accidentes de laboratorio².

El *T. cruzi*, es un parásito perteneciente a la familia Trypanosomatidae (Euglenozoa: Kinetoplastea), presenta dos fases de desarrollo en el hospedero infectado: tripomastigotes en sangre y amastigotes intracelulares. Debido a su diversidad genética, ha sido clasificado en grandes grupos: *T. cruzi* I y *T. cruzi* no-I (II-VI). El *T. cruzi* I se considera predominante en América Central, en tanto que no-I es dominante en Sudamérica³.

Se estima que en la región de las Américas, la enfermedad de Chagas se presenta en 21 países, afectando de unos 8 a 10 millones de personas; encontrándose en riesgo de adquirir la infección aproximadamente 25 millones de personas, con

56.000 nuevos casos anuales y 12000 muertes por año¹. Para el año 2020, se estima alcanzar el objetivo de controlar la enfermedad de Chagas; pero en la actualidad, menos del 1% de los 8 a 10 millones de personas infectadas son tratadas y las nuevas infecciones todavía ocurren⁴.

En Bolivia, la prevalencia de la enfermedad de Chagas a nivel nacional oscila alrededor del 20%, siendo más baja en los departamentos de La Paz y Potosí y más alta en los departamentos de Chuquisaca y Tarija⁵.

Por motivos de crecimiento demográfico, ocupación territorial y otros, en los últimos años la región amazónica en América ha sido considerada como endémica para la enfermedad de Chagas⁶. Asimismo, en Bolivia se reportan importantes migraciones humanas recientes a las regiones amazónicas con antropización del medio ambiente y aparición de zonas secas ocasionadas por efectos del cambio climático, lo cual acrecienta el riesgo de establecer la transmisión de la enfermedad de Chagas en las regiones que antes se consideraban libres de la transmisión. En el año 2010 se han reportado casos de contaminación oral humana en el municipio de Guayaramerín del departamento del Beni⁷ y en el año 2016, en regiones del norte amazónico tropical boliviano correspondientes a la provincia Abel Iturralde del departamento de La Paz, se ha confirmado la presencia y la identificación de insectos Triatominos del Género *Rhodnius* como vectores de la enfermedad de Chagas: *R. stali* y *R. robustus*⁸, motivando

intensificar las investigaciones en estas regiones.

El objetivo del presente estudio fue determinar el porcentaje de infección con *T. cruzi* realizando el diagnóstico serológico y molecular de la enfermedad de Chagas en muestras de suero y sangre de pobladores de Cobija, Riberalta y Guayaramerín, como parte del proyecto “Búsqueda de nuevas zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana como efecto del Cambio Climático”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de Estudio

Las áreas de estudio corresponden a poblaciones de Cobija, cuya temperatura promedio es de 27°C con una precipitación pluvial anual de 1.800 mm, altura de 235 m.s.n.m., su clima es tropical y lluvioso y su terreno está cubierto en gran parte por selva; Riberalta, que tiene una temperatura promedio de 26°C, con una precipitación pluvial anual de 1.750 mm, altura de 172 m.s.n.m.; y la población de Guayaramerín, con una temperatura promedio de 28°C, una precipitación pluvial anual de 1.754 mm y una altura de 172 m.s.n.m. Como estas poblaciones se hallan dispersas en la Amazonía Boliviana, la mayoría de las personas participantes fueron adultas y nativas de la región. Una parte de las viviendas en estas regiones están construidas con material propio del lugar y algunas están abiertas a la naturaleza exuberante que las rodea; entre otras actividades, existe un alto consumo de jugos de frutos de palmeras como el asaí, majo, chonta, entre otros.

Instrumentos de Recolección de Datos y Muestras

El estudio utilizó una encuesta participativa en las visitas realizadas entre julio y agosto de 2016. Se colectaron muestras de sangre de los participantes, habitantes, en Cobija, Riberalta y Guayaramerín. Dada la naturaleza y peculiaridad de la población, el número de muestras obtenido estuvo basado en la aportación voluntaria de las personas que acudieron a los centros comunales para una asistencia primaria en salud. El muestreo incluyó a personas mayores de 17 años entre varones y mujeres; las muestras obtenidas se han mantenido refrigeradas hasta su procesamiento, siguiendo protocolos estándar.

Pruebas de Laboratorio

Las pruebas serológicas: HAI (Hemoaglutinación indirecta), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), IFI (Inmunofluorescencia indirecta) y la prueba molecular de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en punto final, fueron realizadas en el laboratorio de Genética Molecular del Instituto SELADIS de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Mayor de San Andrés, en la ciudad de La Paz del Estado Plurinacional de Bolivia.

Pruebas Serológicas

Se realizaron dos pruebas serológicas para cada muestra: una de hemoaglutinación indirecta HAI (POLYCHACO) y una de enzimoimmunoensayo ELISA - Chagatest (NOVATEC); para la confirmación, se hizo una tercera IFI (inmunofluorescencia indirecta). Se consideraron positivas aquellas muestras con las que se obtuvo un resultado positivo en dos de las tres técnicas.

En la prueba de ELISA, se consideró como muestra reactiva aquella superior al punto de corte (Cut-off), se utilizó el kit de Chagatest NovaTec inmunodiagnóstica GmbH y se siguieron sus instrucciones. La lectura se hizo en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 450 nm.

La técnica HAI se realizó con el kit HAI CHAGAS POLYCHACO, siguiendo sus instrucciones. Se trata de un ensayo de hemoaglutinación indirecta mediante el cual los eritrocitos son sedimentados de acuerdo a la unión del antígeno de *T. cruzi* a la superficie del eritrocito. Cuando se añade el suero y si hay anticuerpos específicos, se crea una redícula típica; si no se presentan anticuerpos específicos, entonces los eritrocitos precipitan formando un botón en el fondo del pozo de la placa de ensayo.

La técnica de IFI, inmunofluorescencia indirecta, se realizó empleando como antígeno cepas de *T. cruzi* proporcionadas por el Instituto Boliviano de Biología de Altura. Al final del test, los resultados fueron elaborados tomándose en cuenta aquellas muestras de sueros con títulos mayores o iguales que la dilución 1/32.

Prueba Molecular

La prueba molecular estuvo basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR en punto final), donde a partir de 1 mililitro de la muestra de sangre, se realizó la extracción de ADN con proteinasa K en una concentración de 20 mg/ml, extracción orgánica fenol-cloroformo y posterior precipitación del material genético obtenido con etanol absoluto y acetato de sodio 3 Molar. Posteriormente se realizó la amplificación del ADN obtenido basado en el protocolo de Eva Harris, 1998⁹ utilizando los primers S35: 5'-AAA TAA TGT ACG GKG GAG ATG CAT GA (K = G/T) y S36 5'-GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT, utilizando un protocolo de amplificación de 30 ciclos: 1 minuto a 94 °C de desnaturalización, 1

minuto a 60 °C de hibridación y 1 minuto a 72 °C de polimerización, en un termociclador Veriti de Applied Biosystems con un producto de amplificación de 330 pares de bases que fue visualizado por electroforesis vertical en geles de agarosa al 1.5%.

RESULTADOS

Se colectaron muestras de sangre de 192 pacientes que acudieron a los centros de salud de Cobija, Riberalta y Guayaramerin para una atención médica (Cuadro N° 1), donde se puede apreciar que todos fueron atendidos, tratándose 49 pacientes en Cobija, 60 pacientes en Riberalta y 83 pacientes en Guayaramerín, entre varones y mujeres cuya edad oscila entre los 18 y 85 años de edad.

CUADRO N° 1
NÚMERO DE PACIENTES ATENDIDOS EN LOS CENTROS DE SALUD DE LA AMAZONIA BOLIVIANA

LUGAR	NUMERO DE PACIENTES		
	VARONES	MUJERES	TOTAL
COBIJA	5	44	49
RIBERALTA	18	42	60
GUAYARAMERIN	26	57	83
TOTAL	49	143	192

Las muestras de sangre fueron colectadas en los diferentes centros de salud de Guayaramerin, Cobija y Riberalta. En las figuras 1, 2, 3, y 4 se muestran los trabajos realizados en los mencionados lugares con la participación del personal de la Universidad Mayor de San Andrés,

junto al personal de la Universidad Autónoma del Beni y el personal del SEDES regional. Los participantes acudieron de manera voluntaria a los centros para una atención médica y accedieron a la toma de muestra de sangre y suero necesarios para este estudio.

FIGURA N° 1
REUNIÓN DE COORDINACIÓN CON DIRIGENTES VECINALES EN EL CENTRO DE SALUD 31 DE ENERO EN GUAYARAMERIN



**FIGURAS N° 2, 3 Y 4:
ATENCIÓN PRIMARIA EN SALUD, TOMA DE MUESTRA**



En la Cuadro N° 2, se muestran los resultados del diagnóstico serológico y molecular de las muestras de suero y sangre de los pacientes de las localidades de Cobija, Riberalta y Guayaramerin y en la figura 7, se muestra el resultado de la prueba HAI.

Como se puede ver en la Cuadro N° 2, los datos presentados nos muestran que se obtuvo un porcentaje de seropositividad general del 6,25% en personas mayores de diferentes edades (entre 18 y 85 años) en las regiones estudiadas de la Amazonía Boliviana (Riberalta, Cobija y Guayaramerin). Un dato importante obtenido en las encuestas realizadas, más del 70% de la gente consume habitualmente jugos del fruto de palmeras y tienen presencia de palmeras en su domicilio.

De las 49 muestras de los pacientes de Cobija, 2 muestras dieron resultado seropositivo para las pruebas ELISA y HAI, siendo por lo tanto el porcentaje de infección equivalente al 4,08%. Las 2 muestras corresponden a personas de ambos sexos, una (1) mujer de 42 años de edad y un (1) varón de 41 años de edad. Todas las muestras

de sangre de los pacientes de Cobija fueron analizadas por la técnica PCR en punto final y resultaron negativas.

Los resultados de Riberalta han demostrado que de las 60 muestras, 4 dieron resultado seropositivo para las pruebas ELISA y HAI; de estas 4 muestras, 1 muestra resultó positiva para IFI, siendo el porcentaje de infección del 6,67%. Las 4 muestras corresponden a tres (3) mujeres menores de 40 años de edad y una (1) mujer de 63 años de edad. Todas las muestras de sangre de los pacientes de Riberalta fueron analizadas por la PCR en punto final y solo una muestra resultó positiva.

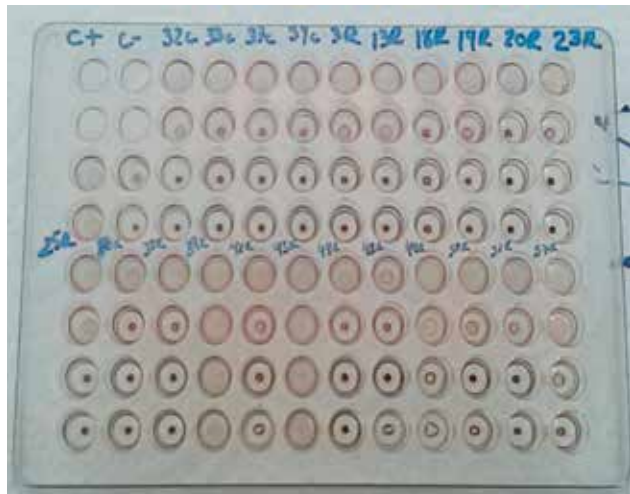
Los resultados de las muestras de Guayaramerin han mostrado que de 83 muestras analizadas, 6 muestras dieron resultado seropositivo para las pruebas de ELISA y HAI, además de estas 6 muestras 1 muestra resultó positiva para IFI, siendo el porcentaje de infección del 7,23%. Las 6 muestras corresponden a 4 mujeres con edades entre 28 a 60 años de edad y a 2 varones de 42 y 19 años de edad, respectivamente.

**CUADRO N° 2
RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO Y MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN
PACIENTES DE LA AMAZONÍA BOLIVIANA**

LUGAR	N° DE PACIENTES	POSITIVOS ELISA	POSITIVOS HAI	POSITIVOS ELISA-HAI	POSITIVOS PCR
COBIJA	49	6 (12,24%)	3 (6,12%)	2 (4,08%)	0
RIBERALTA	60	7 (11,67%)	7 (11,67%)	4 (6,67%)	1 (1,67%)
GUAYARAMERIN	83	13 (15,66%)	10 (12,05%)	6 (7,23%)	0
TOTAL	192	26 (13,54%)	20 (10,42%)	12 (6,25%)	1 (0,5%)

FIGURA N° 7

PLACA DE HAI CON LAS MUESTRAS DE RIBERALTA Y SUS RESPECTIVOS CONTROLES



DISCUSIÓN

Los exámenes de laboratorio para el diagnóstico adecuado de la enfermedad de Chagas dependen de la etapa clínica del paciente. En nuestro estudio, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se ha basado en la determinación de anticuerpos contra el parásito en muestras de suero de pacientes mediante pruebas de laboratorio (ELISA, HAI, IFI) y la reacción en cadena de la polimerasa PCR en punto final para la detección del ADN del parásito en las muestras de sangre. Para las pruebas serológicas, debemos tomar en cuenta que luego de la infección con *T. cruzi*, éste resulta extraño al cuerpo humano y el sistema inmunológico forma anticuerpos específicos contra el parásito, los cuales se encuentran sobretodo en el suero de la persona demorando aproximadamente dos semanas para ser detectables, por lo que un examen puede salir negativo aunque aconteciera una infección reciente. Asimismo, se debe considerar que los anticuerpos pueden permanecer más tiempo en la sangre que el parásito y un examen puede salir positivo aunque el parásito haya sido eliminado por terapia o si la infección fue eliminada por reacción propia del organismo humano.

La prueba de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es una forma sensible para detectar la presencia directa del parásito en la sangre; este método de biología molecular, multiplica el genoma (ADN) del parásito y lo hace visible a través

de un colorante fluorescente. Detecta menos de 1 parásito/ml de sangre; sin embargo, en una infección crónica ello no se puede descartar con seguridad (por la posible ausencia de parásitos en la sangre periférica). Un resultado positivo por otro lado, comprueba la detección de *T. cruzi* en una etapa aguda de la enfermedad de Chagas^{10, 11}. Un estudio realizado por Bettina y colaboradores en Argentina, con 17 pacientes diagnosticados con Chagas por técnicas serológicas, 13 en estado agudo y 4 en estado crónico, mostró que la PCR detectó la presencia de *T. cruzi* en el 50% de los pacientes con infección crónica y en el 80% de los pacientes en estado agudo que no recibieron ningún tipo de tratamiento¹², resultados que no concuerdan con los del presente estudio, donde se ha identificado la presencia de *T. cruzi* en una muestra de sangre, representando el 1.92% de la población total a través de la prueba de la PCR. Este mismo paciente fue positivo también a las pruebas serológicas, pudiendo significar que en el momento de realización de la prueba, el paciente estuviera en una fase de latencia, pasando de una fase aguda a crónica; sin embargo, se requiere trabajar con un mayor número de pacientes que presenten estas características para consolidar lo referido.

Los resultados presentados, muestran que los valores de porcentaje de infección con *T. cruzi* en personas que viven en las regiones amazónicas de Bolivia llaman la atención: 4,08% en Cobija; 6,67% en Riberalta y 7,23% en Guayaramerin, ya que si bien la parte amazónica de Bolivia correspondiente a los departamentos de Beni y Pando, no está considerada como endémica de la enfermedad de Chagas⁵, en este primer estudio se ha confirmado la presencia de la enfermedad en las regiones de Riberalta, Guayaramerin y Cobija, quedando por explorar otras regiones las cuales serán estudiadas posteriormente.

Es importante mencionar que el 74% de los participantes en este estudio corresponden a mujeres y del total de las personas infectadas con el *T. cruzi*, el 75% son mujeres y de este total, el 77% son mujeres menores de 50 años, siendo el riesgo de la transmisión de la enfermedad preocupante por tratarse de mujeres en edad fértil. Estos resultados deben ser tomados en cuenta por las entidades responsables del Ministerio de

Salud para sacar conclusiones en la prevención de la transmisión de la enfermedad de Chagas a los hijos de madres infectadas en las regiones estudiadas.

El resultado general de este primer estudio refiere que el 6,25% de las personas que viven en la Amazonía Boliviana (Guayaramerin, Cobija y Riberalta) presentan infección por *T. cruzi*, lo cual indica que de 100 personas que viven en estas regiones, aproximadamente 6 personas portan al parásito, lo que amerita tomar medidas preventivas para detener su propagación, sugiriendo al mismo tiempo un llamado de atención a las autoridades de salud.

Asimismo, se debe mencionar que son muy pocos los estudios realizados sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana. En el año 2010, se hicieron estudios de seroprevalencia en personas con sintoma febril en la población de Guayaramerin; de 14 casos estudiados, en 6 casos se ha observado la presencia de anticuerpos tipo IgG mediante las técnicas de HAI y ELISA, se tomaron 2 muestras seguidas a los pacientes y se constató un aumento de los títulos de igG, lo cual es típico de infección aguda reciente⁷.

CONCLUSIONES

Se confirma la presencia de la enfermedad de

Chagas en 3 regiones de la Amazonía Boliviana: Riberalta, Guayaramerin y Cobija mediante la determinación del porcentaje de pacientes con la enfermedad en estas 3 regiones, se describe los métodos utilizados para el propósito y sus limitaciones, sugiriendo al mismo tiempo nuevos escenarios epidemiológicos para la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana, como son las regiones estudiadas.

Los resultados son un aporte científico cuyo objetivo es el de contribuir y alertar al país demostrando la presencia de la enfermedad de Chagas en pacientes de las 3 regiones de la Amazonía Boliviana (Riberalta, Guayaramerin y Cobija); resta aún completar estos resultados con estudios posteriores donde se abarquen más regiones de la parte Amazónica de Bolivia.

AGRADECIMIENTOS

El estudio es parte del proyecto: "Búsqueda de nuevas zonas endémicas de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana como efecto del Cambio Climático" UMSA 01 financiado por la Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación COSUDE - PIA ACC.

Expresamos nuestro agradecimiento a la Dra. Elfride Balanza del Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA) de la Facultad de Medicina de la UMSA, por la colaboración en la prueba de IFI.

REFERENCIAS

1. WHO, *First WHO report on neglected tropical diseases WHO; Geneva, Switzerland 2010*
2. Moya, M., Palacio, L., Erazo, K., Palacio, C. *Manifestaciones bucales de la enfermedad de Chagas, Medicas UIS 2014 27: 3 99-107.*
3. Buekens, P., Cafferata, M., Alger, J., Althabe, F., Belizán, J., Carlier, Y., Ciganda, A., Zuniga, C. *Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Argentina, Honduras, and Mexico: study protocol. Reprod Health 2013 11 10-55.*
4. Picado, A., Angheben, A., Marchiol, A., Alarcón de Noya, B., Flevaud, L., Pinazo, M., *Development of Diagnostics for Chagas Disease: Where Should We Put Our Limited Resources?, PLoS Negl Trop Dis 2017 11-1.*
5. *Ministerio de Salud, Estado Plurinacional de Bolivia: Revista Epidemiológica, La Paz Bolivia 2015 100.*

6. *Briceño-Leon, R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud, Cad. Saúde Pública Rio de Janeiro 2009 25 71-82.*
7. *Santalla, J., Oporto, P., Espinoza E., Ríos, T., Brutus, L. Primer brote de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de Trypanosoma cruzi en Guayaramerin, Beni-Bolivia, Biofarbo, 2011 19 - 1*
8. *Buitrago, R., Breniere, S., Taborga, X., Quispe, R., Revollo, S. Identificación genética del agente causal y el insecto vector de la enfermedad de Chagas circulante en la Amazonía Boliviana: Provincia Iturrealde, Con-Ciencia, 2016 24-31*
9. *Harris Eva A low – Cost Approach to PCR Appropriate transfer of Biomolecular Techniques, New York, Oxford University Press, Edited by, Nazreen Kadir, 1998 299 p.*
10. *<http://www.chagas.info.es> (revisado el 21-01-2017)*
11. *Chipman, T., Polymerase chain reaction (PCR) evaluation of three primer pairs for detection of trypanosomiasis cruzi (chagas disease) in clinical samples, Saint Martin's University Biology Journal, 2006 1 185-200*
12. *Bettina B., Horacio L., Gorodner J. Utilidad de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Instituto de Biología Molecular, Revistas Médicas, 3 Buenos Aires, Argentina 2001 1-4.*