

Coordinación de las investigaciones conducentes a la eliminación de la enfermedad de Chagas en América Latina

Álvaro Moncayo M.D.

1. Introducción

El Programa de Investigación y Adiestramiento en Enfermedades Tropicales (TDR) fundado en 1976 está co-patrocinado por el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), el Banco Mundial (BM) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y además financiado por contribuciones voluntarias de países desarrollados y también de países en desarrollo.

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas es una de las enfermedades que constituyen el objetivo del TDR, siendo las otras las siguientes: Malaria, Filariasis, Esquistosomiasis, Leishmaniasis, Tripanosomiasis Africana y Lepra.

El programa busca desarrollar nuevos medios de prevención, tratamiento y control de estas Enfermedades Tropicales y fortalecer la capacidad de investigación de las Instituciones dedicadas a la medicina tropical en los países endémicos.

El Comité de Orientación sobre Enfermedad de Chagas encargado de manejar y financiar los proyectos de investigación sobre esta enfermedad se creó en 1978 y desde entonces ha desarrollado una labor de apoyo a la investigación fundamental y aplicada tendiente al cumplimiento del mandato primordial del TD, a saber, mejorar las herramientas de prevención, diagnóstico y tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Una de las actividades más importantes del Comité ha sido la coordinación de las Investigaciones tanto básicas como aplicadas tendientes a la eliminación de esta enfermedad en el continente.

Esta función de coordinación ha demostrado ser muy útil —por ejemplo— en la estandarización de

técnicas serológicas para diagnóstico, en el desarrollo de un código electrocardiográfico y de criterios uniformes para su interpretación, en la evaluación doble ciego de moléculas recombinantes para diagnóstico serológico y pronóstico clínico y en la implementación de un protocolo común de investigación operativa de campo en seis países de América Latina con el fin de evaluar el costo-efectividad de las nuevas estrategias de control de la transmisión vectorial de la enfermedad.

Para llevar a cabo su labor, el Comité ha contado con la colaboración de la comunidad científica especializada de América Latina y también de otros continentes.

Un 75% del total de fondos (1978-1991) adscritos al Comité para financiación de los proyectos de investigación, o sea alrededor de US\$8 millones, ha sido otorgado a instituciones e investigadores de América Latina, tras una estricta selección en la cual los únicos criterios que deciden son la excelencia científica y la relevancia de las propuestas a las prioridades del plan de trabajo.

2. Epidemiología e impacto en salud pública

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas, llamada así en honor del Dr. Carlos Chagas, médico brasileño quien describió la sintomatología, el agente causal y el insecto vector en 1909, existe únicamente en el continente americano y se extiende desde México hasta el sur de la Argentina. (Ver Mapa 1).

Está causada por el parásito flagelado, *Trypanosoma cruzi*, que se trasmite al hombre por las heces del insecto hematófago vector de la familia de los reduvidos y por transfusiones de sangre infectada.

Existen dos fases de la enfermedad: la fase aguda que aparece inmediatamente después de la infección y la fase crónica que se manifiesta entre 15 y 20 años después de una fase intermedia, indeter-

Jefe de Control de Tripanosomiasis y Leishmaniasis
Secretario del Comité de Enfermedad de Chagas
Programa Especial PNUD/BANCO MUNDIAL/OMS de Investigación y Adiestramiento en Enfermedades Tropicales
Organización Mundial de la Salud
Ginebra, Suiza

MAPA1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS



minada y asintomática. La fase crónica se caracteriza por lesiones irreverentes que afectan el sistema nervioso autónomo del corazón con presencia de severos trastornos del ritmo cardíaco y muerte súbita (27% de los infectados) o del sistema digestivo con desarrollo de megaesófago o megacolon (6% de los infectados). Además, en un 3% de los pacientes infectados puede observarse alteraciones neurológicas motoras y sensitivas periféricas.

En el momento actual no hay ninguna terapéutica eficaz para la fase crónica ya que las dos drogas existentes, Nifurtimox y Benznidazole, son parasiticidas que actúan solamente en la fase aguda.

2.1. Transmisión a través de vectores

En el ciclo doméstico de la enfermedad, el insecto vector —principalmente *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*— está domiciliado y se reproduce y crece en las grietas de las paredes de las casas de adobe de donde sale para atacar a sus víctimas por las noches. De aquí la importancia de las medidas de control de esta enfermedad que incluyen el ataque químico a los insectos vectores a través de insecticidas tradicionales, de potes fumígenos, de pinturas insecticidas o el mejoramiento de la vivienda.

Se estima que el total de casos de infección humana por *T. cruzi* en el continente es de 16 a 18 millones. De este total de infectados, el 27% va a desarrollar lesiones cardíacas irreversibles, un 6% va a presentar megaesófago o megacolon y un 3% lesiones neurológicas motoras o sensitivas periféricas.

Alrededor de 90 millones de personas, es decir un cuarto de los habitantes de América Latina, están expuestas al riesgo de infección por el parásito. (Ver Tabla 1).

2.2. Transmisión por transfusión sanguínea

Los movimientos migratorios de la población rural a las ciudades en los años 1970's y 1980's cambiaron el patrón epidemiológico tradicional de la enfermedad como un problema casi exclusivamente rural y la transformaron en una infección urbana que se puede transmitir por transfusiones de sangre infectada.

Las cifras que aparecen en la Tabla 2 muestran la gravedad del problema en algunas ciudades del continente. Como puede apreciarse, la proporción de sangres infectadas varía entre 1.7% en Venezuela y 63% en Santacruz, Bolivia, lo cual muestra que es mucho más alta que la infección por Hepatitis B o por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

En Santiago de Chile, por ejemplo, la prevalencia de sangre infectada con el virus de la Hepatitis B es de 0.4% —es decir diez veces menor que la proporción de sangre infectada con *T. cruzi*— y la prevalencia de sangre infectada con VIH es de 0,01% —es decir 400 veces menor que la proporción de sangre infectada con *T. cruzi*—.

En Buenos Aires se practican anualmente más de 500.000 transfusiones. La tasa de infección por *T. cruzi* de la sangre a transfundir alcanza al 6%. Esto quiere decir que si no se hiciera tamizaje obligatorio existiría el peligro de unas 30.000 transfusiones infectantes al año.

La transmisión de la Enfermedad de Chagas a través de transfusiones sanguíneas constituye también una amenaza para los países donde no existe la transmisión vectorial como son los Estados Unidos y el Canadá, donde se han reportado recientemente casos de transmisión transfusional. (1)

Tabla 1. Prevalencia de infecciones humanas por *T. cruzi*

	Población a riesgo (x 1000)	% de Población Total (1980-85)	Número de personas infectadas (x 1000) (1980-85)
GRUPO I (Alta prevalencia de infección/Programas Nacionales de Control en funcionamiento)			
ARGENTINA	6 900	33	2 640
BRASIL	41 054	32	6 340
CHILE	1 800	15	1 460
ECUADOR	3 823	41	30
HONDURAS	1 824	42	300
PARAGUAY	1 475	45	397
PERÚ	6 766	34	643
URUGUAY	975	33	37
VENEZUELA	11 392	68	1 200
GRUPO II (Alta prevalencia de infección en algunas áreas/Programas Nacionales de Control inexistentes)			
BOLIVIA	1 800	30	500
COLOMBIA	3 000	10	900
COSTA RICA	1 112	45	130
MÉXICO (*)	ND	ND	ND
GRUPO III (Estudios epidemiológicos de prevalencia necesarios/Programas Nacionales de Control inexistentes)			
SALVADOR	2 146	43(+)	322
GUATEMALA	4 022	52(+)	730
NICARAGUA	ND	ND	ND
PANAMÁ	898	42(+)	220
TOTAL	88 987	25	15 849

ND = No hay datos

(+) = Estimado

(*) = Estudios parciales en algunos Estados del Sur indican una alta prevalencia.

Tabla 2. Prevalencia de sangre infectada por *T. cruzi* en algunos países

	Número de Muestras	Porcentaje Positivas	Tamizaje de Bancos de Sangre (*)
GRUPO I			
ARGENTINA: Buenos Aires (1970)	97 308	6.0	SÍ
Santiago de Estero (1966)	1 700	20.5	
Córdoba (1982)	2 441	8.4	
BRASIL: Brasilia (1984)	2 413	14.6	SÍ
Río (1979)	3 501	3.9	
São Paulo (1982)	56 902	2.9	
CHILE: Santiago (1983)	214	3.7	
Vicuna (1983)	62	14.5	
ECUADOR: Guayaquil (1961)	1 054	3.2	
HONDURAS: Tegucigalpa (1973)	50	28.0	SÍ
PARAGUAY: Asunción (1972)	562	11.3	
PERÚ: Tacna (1972)	329	12.9	
URUGUAY: Endemic Area (1972)	329	5.5	SÍ
VENEZUELA: Donantes (1985/89)	192 000	1.7	SÍ
Valencia (1973)	733	10.3	
Caracas (1973)	98 620	5.1	
GRUPO II			
BOLIVIA: Santacruz (1983)	268	63.0	
COLOMBIA	ND	ND	
COSTA RICA: San José (1960)	221	7.6	
MÉXICO: Querétaro (1984)	200	16.5	

ND = No hay datos

(*) = Algunos Bancos de Sangre privados no siempre cumplen con la obligatoriedad del tamizaje de sangre para *T. cruzi*

2. Actividades del Comité entre 1978 y 1991 en el contexto de los objetivos del TDR

2.1. Coordinación de la Investigación Epidemiológica: 1979-1984

– Estudios de Prevalencia:

En julio de 1979 se reunió en Brasilia un Grupo de Expertos con el objetivo de desarrollar un protocolo estándar para adelantar estudios epidemiológicos sobre la prevalencia de infección humana por *T. cruzi* y de infestación domiciliar rural por

triatominos en una muestra representativa de la población de los países (2).

Los estudios de prevalencia mencionados se llevaron a cabo en Chile, Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, Panamá, Paraguay, Perú y Uruguay y permitieron conocer el número de personas infectadas y la proporción de viviendas rurales infestadas en aquellos países que carecían de datos epidemiológicos.

Gracias a estos estudios, en la actualidad se conoce con más precisión la situación epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en el continente y se cuenta con una base de comparación para evaluar el impacto de los programas de control en los distintos países. Esta base de comparación deberá, como es lógico, actualizarse periódicamente.

– Estudios de estandarización serológica:

Uno de los grandes problemas que el Comité detectó al comienzo de sus actividades fue la falta de estandarización para el diagnóstico serológico de la infección Chagásica en el continente tanto en lo que se refiere a las técnicas de laboratorio como a los criterios para la determinación de los puntos límites de positividad o negatividad serológica con todas las serias implicaciones clínicas y laborales que esto conlleva.

En un primer estudio comparativo de resultados serológicos efectuado entre laboratorios especializados de Argentina, Brasil y Estados Unidos en 1980/81(*) se encontraron valores muy bajos del Índice Kappa, la medida estadística para valorar la concordancia/discordancia inter-observadores. En efecto, este índice tuvo valores entre 0.56 y 0.67, lo que indica un bajo nivel de concordancia, demostrándose así la urgencia de la normatización de técnicas y de criterios serológicos.

Después de acordar la normatización de estas técnicas y criterios, y de aceptar probar una batería de sueros patrones, se efectuó un segundo estudio comparativo en 1981/82 entre los mismos laboratorios mencionados. Esta vez el Índice Kappa presentó valores entre 0.70 y 0.94 lo que indicó un mejoramiento en la concordancia de los resultados como

(*) Laboratorio de Serología de Enfermedad de Chagas, Instituto "Fátala Chaben", Buenos Aires, Argentina; Laboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, Brasil y Laboratorio de Serología, Centros para el Control de Enfermedades, Atlanta, Ga. Estados Unidos.

consecuencia de la normatización de procedimientos y de paneles de suero para comparación (3), (4).

En el momento existe una Red Latinoamericana de Laboratorios que siguen procedimientos y criterios uniformes de diagnóstico serológico y de selección de sangres infectadas en los Bancos de Sangre en 11 países del continente.

2.2. Coordinación de la Investigación en Parasitología y Biología Molecular:

- Clasificación de las cepas del parásito (1985-1991)

La clasificación de poblaciones de *Trypanosoma cruzi* y su asociación con la extrema variedad que se observa en el grado de compromiso orgánico de las distintas formas clínicas y las diversas situaciones epidemiológicas ha sido una permanente inquietud de los investigadores.

Varios métodos de análisis han sido propuestos desde los trabajos iniciales en los años 60s cuando se describían las diferencias utilizando fundamentalmente el criterio morfológico.

Posteriormente se han utilizado métodos experimentales y criterios más precisos tales como el comportamiento en animales de laboratorio (5), la resistencia a drogas (6), la infectividad a las células del huésped, la susceptibilidad frente a sueros inmunes, etc., hasta la determinación de características inmunológicas tales como la estructura antigénica (7), (8) o bioquímicas como los patrones de isoenzimas (9). Finalmente se ha utilizado también la técnica del análisis de los patrones de restricción del ADN del kinetoplasto y de hibridación con sondas de ADN para intentar una clasificación genética del parásito (10), (11).

Una reinterpretación de los datos sobre patrones isoenzimáticos y restricción de ADN ha conducido al planteamiento de la teoría de la reproducción clonal de las poblaciones de *T. cruzi* y en consecuencia a la explicación de la gran heterogeneidad de los parásitos individuales (12).

En 1985 se acordó la adopción de un sistema común de denominación de las distintas cepas del parásito y se estandarizaron los procedimientos técnicos para su análisis por medios biológicos y bioquímicos, en particular los análisis de isoenzimas, los estudios de restricción del ADN del kinetoplasto y la hibridación de sondas de ADN (13).

- Desarrollo de Modelos Animales (1980-1986)

Con el objeto de obtener un modelo reproducible de las distintas fases de la enfermedad, se evaluaron los diferentes modelos animales utilizados y se logró uniformar los criterios diagnósticos y en particular la interpretación de las lesiones cardíacas detectadas por el electrocardiograma. Se reconoció igualmente la necesidad de normalizar los criterios anatomopatológicos para el diagnóstico post-mortem ya que la discordancia en la clasificación de las lesiones anatomopatológicas cardíacas crónicas se hizo evidente después de un estudio doble ciego adelantado por la Secretaría del Comité en el cual las mismas preparaciones microscópicas fueron enviadas a diferentes patólogos expertos en lesiones cardíacas causadas por infecciones crónicas por *T. cruzi*. Los Índices Kappa obtenidos fueron desesperadamente bajos, entre 0.32 y 0.40, indicando una muy pobre concordancia en las respuestas (14).

En seguimiento a estas recomendaciones, la investigación de modelos animales se pudo encauzar utilizando especies de bajo costo, fácil mantenimiento y buena reproducción de las lesiones tanto de la fase aguda como de la fase crónica.

- Caracterización y producción de Antígenos definidos a nivel molecular (1985-1991)

Como consecuencia de la investigación básica financiada por el TDR en la década de 1980, varios laboratorios en Argentina y Brasil han desarrollado antígenos parasitarios codificados por genes clonados que están siendo producidos por técnicas de recombinación de DNA o de síntesis química (15), (16), (17), (18), (19).

Estas moléculas definidas se han probado como reactivos para mejorar la sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas en un estudio doble ciego multicéntrico en el cual tomaron parte diez laboratorios que procesaron una batería de sueros clínicamente caracterizados y codificados, enviados por un laboratorio de referencia en Goias, Brasil.

Se identificaron los reactivos moleculares con mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica y que tuvieron índices Kappa entre 0.98 y 0.00 en el estudio (20). Actualmente se están utilizando en la producción de kits serológicos para tamizaje de sangre. Un prototipo de kit está siendo probado antes de su comercialización.

2.3. Coordinación de la Investigación clínica

– Estudios Epidemiológicos Analíticos (1986-1991)

Se han diseñado los protocolos a seguir en los dos tipos de estudios epidemiológicos analíticos propuestos: casos y controles y cohortes no concurrentes, indicando las ventajas y desventajas de cada uno. Para uniformar criterios de evaluación clínica, electrocardiográfica y de laboratorio en los pacientes y en los controles se convocó a una reunión en Belo Horizonte en 1986 en cuyo informe se detallan los anteriores aspectos y se sugieren los lugares del continente en donde se cuenta con la infraestructura necesaria y los registros médicos para llevarlos a cabo (21).

– Normatización de criterios electrocardiográficos (1988-1991)

La adaptación de un código de lectura electrocardiográfica que permita, por una parte, una interpretación objetiva de los trazados y, por otra, que asegure un lenguaje común entre diferentes cardiólogos en distintas partes del continente, se pudo lograr en Buenos Aires en abril de 1988.

A principios de noviembre de 1991 se completó el estudio doble ciego de trazados electrocardiográficos enviados a los participantes de la reunión de Buenos Aires para que se interpretaran siguiendo el código adoptado. Los resultados mostraron un alto grado de concordancia en todas las lesiones cardíacas características de la Enfermedad de Chagas crónica. El "Código de Buenos Aires" ha sido pues validado en este estudio multicéntrico y servirá en el futuro como referencia para el diagnóstico electrocardiográfico de la Enfermedad de Chagas. Próximamente se publicará y difundirá para conocimiento de los interesados.

– Ensayos clínicos (1990-1991)

En 1989, se reportó el efecto parasiticida del Alopurinol en la fase crónica de la enfermedad y el Comité recomendó la iniciación de un ensayo multicéntrico con el fin de observar si los resultados obtenidos en una institución se confirmaban en otras localizadas en distintos lugares geográficos donde las poblaciones de parásitos podrían ser distintas. Estos ensayos clínicos se están realizando siguiendo un protocolo común, acordado por los investigadores responsables de los ensayos, en Goiania, Brasil; Córdoba, Argentina y Santacruz de la Sierra, Bolivia. Los primeros datos deberán estar listos para fines de 1992 (22).

3. Estudios de terreno sobre nuevos métodos de control de vectores (1987-1991)

Los primeros ensayos de la eficacia de las pinturas insecticidas se efectuaron en Posse, Goias, Brasil en 1987 con resultados muy alentadores en cuanto a la duración de la acción insecticida y el costo: 80% de eficacia a los 24 meses, comparada con el mismo efecto obtenido con los piretroides sin la matriz plástica de las pinturas hasta los 10-12 meses solamente y 27,00 dólares por casa utilizando las pinturas comparado con 69,00 dólares por casa del programa vertical de SUCAM utilizando piretroides (23).

Los potes fumígenos se ensayaron en Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina, en 1988 como coadyuvantes para el mantenimiento de la desinsectización, junto con las cajas sensoras "María", en un programa de control de un contexto de atención primaria de la salud y participación comunitaria. Los resultados demostraron que era factible interrumpir la transmisión vectorial: después de dos años de actividades, no hubo un solo caso de seroconversión en el grupo de menores de un año. El costo por casa/año fue de 4,00 dólares comparado con 26,00 dólares por casa/año del programa vertical de control tradicional (24).

Los jefes de los programas de control de Argentina, Bolivia, Chile, Honduras, Paraguay y Uruguay se reunieron en Montevideo en octubre de 1989 con epidemiólogos, sociólogos y economistas y produjeron un protocolo común para adelantar estudios de terreno con el objetivo de probar la eficacia de las pinturas y de los potes fumígenos en otras situaciones epidemiológicas y entomológicas. Simultáneamente se evaluará la aceptabilidad de los nuevos métodos por parte de la comunidad y los costos utilizando una metodología común (25).

Estos estudios de terreno se están ejecutando en los países mencionados desde comienzos de 1991 y los datos iniciales de Chile, Honduras y Paraguay indican que las pinturas insecticidas solas o en combinación con los insecticidas tradicionales son las intervenciones más eficaces de las tres ensayadas.

4. De la investigación al control

La experiencia del Comité de Orientación sobre la Enfermedad de Chagas en la coordinación y financiación de la investigación básica y aplicada duran-

te el período 1978-1991, tal como se ha descrito en los párrafos anteriores, las actividades de apoyo directo a los países por parte de la Unidad de Enfermedades Tropicales (HPT) de la Oficina Sanitaria Panamericana (OPS) y los decisivos avances en el control de la transmisión vectorial alcanzados por algunos países como Argentina, Brasil, Uruguay y Venezuela se han conjugado para intentar un paso decisivo: la eliminación de la infección por *T. cruzi* transmitida por vectores y por transfusión sanguínea en el continente en la próxima década.

En septiembre de 1990, la Conferencia Sanitaria Panamericana —el máximo cuerpo directivo de la Oficina Sanitaria Panamericana— aprobó la Resolución XVI en la cual se identifica a la Enfermedad de Chagas, entre otras, como susceptible de ser eliminada del continente en la década de los años 1990-2000.

En la reunión del Comité Ejecutivo de la OPS en junio de 1991, la Resolución anterior fue refrendada y se pidió al Director que adelantara las consultas pertinentes con los gobiernos para elaborar los planes conducentes a lograr el objetivo de la eliminación.

En julio de 1991, los Ministros de Salud de los Países del Cono Sur se reunieron en Brasilia para lanzar la "Iniciativa de los Países del Cono Sur" en la que expresan su voluntad política de adelantar los planes de eliminación. Se aprobó igualmente una agenda de trabajo que se perfeccionó en noviembre de 1991 en Montevideo donde se concluyeron los programas de eliminación de la enfermedad para Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay.

Se eliminará, así, más de un 70% de la actual prevalencia de infección por *T. cruzi* en toda América Latina. La Oficina Sanitaria Panamericana actúa como Secretaría de esta Iniciativa y coordina las conversaciones bilaterales para la obtención de fondos de los diferentes países con las agencias financieras bilaterales y multilaterales del Continente.

Nos parece que este proceso técnico-político que conducirá a la eliminación de la Enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur en una primera fase ha desarrollado ya su propia dinámica y es imparable. La experiencia que se obtenga servirá de base para intentar enseguida un trabajo similar en otras áreas del continente como Centroamérica o los países del norte de Suramérica.

Una evaluación periódica cuidadosa de la eficacia y eficiencia de las acciones de eliminación, que naturalmente incluya análisis de costos y de aceptabilidad social de las actividades emprendidas, tiene que formar parte integral de cualquier programa de eliminación que se pretenda adelantar.

Referencias

1. KIRCHHOFF L.V. Is *Trypanosoma cruzi* a new threat to our blood supply?, *Annals of Internal Medicine*, 111:10, 773-775, 1989.
2. UNDP/WORLD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES: Workshop on Guidelines for Multidisciplinary Research on the Epidemiology of Chagas Disease, Brasilia, 16-19 July 1979, Document TDR/EPICHA/79.1/Rev. 1, Geneva, 1979.
3. UNDP/WORLD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES: Report of Meeting on Longitudinal Epidemiological Studies on Chagas Disease, Rio de Janeiro, 28 February - 3 March 1983, Document TDR/EPICHALES/83.3, Geneva, 1983, pages 20-24.
4. CAMARGO et al. Three years of collaboration on the standardization of Chagas disease serodiagnosis in the Americas: an appraisal, *Bulletin of the Pan American Health Organization*, 20:3, 233-244 (1986).
5. ANDRADE S.G. Morphological and Behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 18: Supl. 39-46, (1985).
6. ANDRADE S.G. Patología da Doença de Chagas Experimental, *Revista Medica da Bahia*, 25:1, 256-261, (1979).
7. ARAUJO F. and REMINGTON J. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components, *The Journal of Immunology*, 127:3, 854-859 (1981).
8. AFCHAIN D. et al. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: Identification of a specific component, *Journal of Parasitology*, 65:4, 507-514, (1979).
9. MILES M.A. et al. Further enzymatic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74:2, 221-237 (1980).
10. MOREL et al. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 67:11, 6810-6814, (1980).

11. FRASCH A.C.C. et al. Constant and variable regions in DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: application to species and stock differentiation, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4: 163-170 (1981).
12. TIBAYRENC M. & AYALA F. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas Disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance, *EVOLUTION* 42: 2 277-292 (1988).
113. UNDP/WORLD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES: Report of a Meeting on the Standardization of Methods for *Trypanosoma cruzi* Classification, Panama City, 28-31 January 1985, Document TDR/EPICHA-TCC/85.3, Geneva, 1985.
14. UNDP/WORLD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES: Report of the Scientific Working Group on the Development and Evaluation of Animal Models for Chagas Disease, Geneva, 23-24 July 1984, Document TDR/IMMCHA-AMOD/84.3, Geneva, 1984.
15. PETERSON, D.S. et al. Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat, *Nature*, 322:566-568 (1986).
16. FRASCH, A.C.C. and REYES, M.B., Diagnosis of Chagas Disease Using Recombinant DNA Technology, *Parasitology Today*, 6:4, 137-139 (1990).
17. LAFAILLE, J.J. et al. Cloning of *Trypanosoma cruzi* stage-specific genes, *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 82 (Supl): 252-259 (1987).
18. IBÁÑEZ, C.F. et al. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 25: 175-184 (1987).
19. BUA J. et al. (1991) *Trypanosoma cruzi*: Cellular and Antibody response against the parasite in mice immunized with a 19-Amino Acid synthetic peptide, *Experimental Parasitology* 72: 54-62.
20. MONCAYO, A. and LUQUETTI, A.O.: Multicentre Double Blind study for Evaluation of *Trypanosoma cruzi* Defined Antigens as Diagnostic Reagents, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 85(4): 489-495, Rio de Janeiro, October/December 1990.
21. UNDP/WORLD BANK/WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES: Report of a Meeting on the Feasibility of Analytical Epidemiological Studies on Chagas Disease: Guidelines for a Standard Protocol, Belo Horizonte, 28 February - 2 March 1986, Document TDR/CHA/EPD/PROTO/86.3, Geneva, 1986.
22. Protocol to test Allopurinol in chronic Chagas disease, Report of a TDR Technical Meeting, Caxambu, 10 November 1990, Geneva, 1991.
23. OLIVEIRA-FILHO, A.M.: Cost-Effectiveness Analysis in Chagas Disease Vector's Control Interventions, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 84, Supl. Iv. 409-417. Rio de Janeiro, 1989.
24. WISNIVESKY, C. et al. A new method for the detection of reinfested households during surveillance activities of control programmes of Chagas disease, *Revista Argentina de Microbiología* 20 (Supl): 96-102, ISSN 0325-7541, Buenos Aires, 1988.
25. PNUD/BANCO MUNDIAL/OMS/PROGRAMA ESPECIAL DE LA OMS DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZAS SOBRE ENFERMEDADES TROPICALES: Protocolo Estándar para el Ensayo de Nuevas Estrategias de Control de Vectores de la Enfermedad de Chagas, Montevideo, 23-26 octubre de 1989, Document TDR/CHA/URU/89.3, Ginebra, 1989.



ITALMEX

**PRODUCTOS
CIENTIFICOS**