

Taller internacional sobre epidemiología molecular. Propuestas del grupo interdisciplinario sobre *Trypanosomosis Americana y Leishmaniosis*

Guadalupe Ortega-Pierres* Francisco J. López-Antuñano**

Resumen

La Trypanosomosis americana y las Leishmaniosis han crecido en importancia en México y en otros países de la Región de las Américas. Se conocen áreas altamente endémicas y otras áreas abiertas al desarrollo presentan un nuevo reto para la salud pública. Están especialmente afectados los trabajadores de industrias extractivas, agricultura, ganadería y trabajos públicos. El enfoque de la epidemiología molecular está aportando valiosas capacidades y recursos dentro de las instituciones académicas y operacionales que trabajan actualmente en polimorfismo genético, caracterización de cepas e identificación por PCR de Trypanosomas y Leishmanias. Se han iniciado estudios sobre aspectos clínicos, epidemiológicos y de susceptibilidad genética de la enfermedad de Chagas, y de las leishmaniosis cutánea, mucocutánea, difusa y visceral. Para organizar y coordinar las actividades de epidemiología molecular y apoyar programas efectivos de prevención y control contra estas enfermedades, se requiere la decisión política de autoridades de salud y académicas para adoptar y apoyar las estrategias de investigación para tipificar las especies de Trypanosoma y Leishmania con: marcadores biológicos y de exposición (análisis de ADN cromosomal, genes ribosomales del patrón de restricción, secuencia del ADN y plásmidos de ADN); estudiar proteínas de membrana, isoenzimas y anticuerpos monoclonales; detectar antígenos y ácidos nucleicos; definir la susceptibilidad a la infección con marcadores genéticos y buscar especies, variantes y mutantes responsables de alta virulencia. El apoyo para el establecimiento de un Centro de Referencia para identificación, criopreservación y registro de parásitos, vectores y reservorios es de importancia capital.

Palabras clave: Trypanosomosis, Leishmaniosis, enfermedad de Chagas

Summary

Parasitic diseases such as Leishmaniasis and American Trypanosomiasis have been increasingly important in Mexico and other countries of the American Region. In known areas, these diseases are highly endemic, and in recently opened developing areas became a new threat to public health. Some social groups working in natural resources exploitation, agriculture, animal stock and public labor are particularly affected. The molecular epidemiology approach to these diseases is linking valuable capabilities and resources within the academic and operational institutions actual working in genetic polymorphism, strain characterization and PRC identification of Trypanosoma and Leishmania parasites. Clinical and epidemiological aspects of American trypanosomiasis infections and Chagas's disease and of cutaneous, mucocutaneous, disseminated and visceral leishmaniasis, as well as genetic susceptibility studies have been initiated by Mexican scientists. In order to organize and coordinate the molecular epidemiology activities and support effective prevention and control programs against these diseases, political decision from the health, and academic authorities is urgently needed to adopt and support the research strategy for typing Trypanosoma and Leishmania species through exposition and biological markers (analysis of chromosomal DNA, ribosomal genes restriction patterns, DNA sequence, and DNA plasmids); the study of the membrane proteins and isoenzymes and monoclonal antibodies; detecting antigens and nucleic acids; defining susceptibility to infection with genetic markers, and searching for species, variants and mutant strains responsible for high virulence. The support for the establishment of a Reference Center for identification, cryopreservation and registration of parasites, vectors and reservoirs is of paramount importance.

Key word: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Chaga's disease

* Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN

** Programa Especial Vacunas e Inmunizaciones. Sistema Regional de Vacunas (SiReVa) OPS/OMS

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Guadalupe Ortega Pierres. Departamento de Genética y Biología Molecular CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional Núm. 2508, Col. San Pedro Zacatenco. 07300 México, D.F.

Introducción

La Trypanosomosis americana o enfermedad de Chagas (E ch) es definida por la única reunión del Comité de Expertos de la OMS,¹ como: un flagelopermanente paracasi una cuartaparte de la población de los países de América Latina, aunque admite que las manifestaciones clínicas y las características epidemiológicas varían mucho en cada una de las áreas endémicas y no hace una valoración clara de la diferencia en volumen y extensión de la infección comparada con la enfermedad.

Para la caracterización biológica de *Trypanosoma cruzi* se han descrito las variaciones dependientes de la cepa en la distribución de los amastigotes intracelulares en los tejidos. Se han evaluado los diversos grados de virulencia por los periodos prepatentes, el curso de la parasitemia, tasas de mortalidad, respuesta a los medicamentos (nifurtimox, benzonidazole, allopurinol). Se ha demostrado que además de las glicoproteínas comunes a todas las cepas de *T. cruzi* es posible reconocer antígenos específicos, codificados por genes clonados, por medio de sueros de diferentes pacientes con la enfermedad aguda o crónica. La tipificación de las cepas de *T. cruzi* con base a las características antigénicas aún no se ha hecho. La interpretación genética de los zimogramas de *T. cruzi* procedente de varios huéspedes desde EUA hasta Argentina ha revelado una enorme variedad. Este vasto campo ofrece amplias posibilidades a la epidemiología molecular para definir la correlación entre las características de patogenicidad y virulencia del agente etiológico, la capacidad vectora de los triatomíneos y la respuesta inmune, clínico-patológica y terapéutica de los reservorios y del hombre. Las manifestaciones clínicas de la E ch se reconocen en la etapa aguda de corta duración y la etapa crónica de larga duración, separadas por una fase prolongada asintomática indeterminada. El diagnóstico clínico es difícil en la fase aguda debido a que los síntomas son generalmente benignos y atípicos. Las anomalías observadas por miocarditis aguda en el ECG son taquicardia sinusal, prolongación del intervalo P-R, cambios primarios de la onda T y bajo voltaje del complejo QRS. Los Rayos X pueden revelar cardiomegalias de diferente severidad. Puede presentarse muerte por miocarditis aguda sobre todo en niños menores

de 2 años. La fase indeterminada puede persistir indefinidamente, las infecciones son asintomáticas y el ECG es normal. La parasitemia puede reconocerse por xenodiagnóstico y las pruebas serológicas muestran anticuerpos. En la fase crónica las personas infectadas muestran daños cardíacos (defectos de la conducción A-V, arritmias, complicaciones como embolia sistémica o pulmonar y muerte súbita), digestivos (esófago y colon) y neurológicos (sistema central, periférico y autónomo). De las 117 especies reconocidas de Triatominae, agrupadas en 5 tribus con 14 géneros en la Región de las Américas se encuentran 13 grupos con 105 especies y más de la mitad se han encontrado infectados con *Trypanosoma cruzi*. El control de esos vectores puede ir desde la factibilidad técnica demostrada de erradicar vectores que se han adaptado al ámbito intradomiciliario como es el caso de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*, hasta la imposibilidad de controlar triatomíneos selváticos que en ocasiones invaden el peridomicilio y el domicilio de la vivienda humana como el *Panstrongylus megistus* o el *Triatoma sordida*.

Estado actual de las investigaciones en México sobre trypanosomosis

Polimorfismo genético de *T. cruzi*.² *T. cruzi* contiene aproximadamente 110 copias del gene rRNA por núcleo y se ha descrito que estas copias genéticas se encuentran en un número reducido de cromosomas,²⁻³ separadas unas de otras por espaciadores intergénicos de DNA que presentan heterogeneidad en secuencia y/o longitud. El uso de clones genómicos como sondas moleculares ha permitido identificar polimorfismo de secuencias en el DNA genómico ribosomal de varios aislados mexicanos y suramericanos de *T. cruzi*. Considerando el patrón de bandas de hibridación observado fue posible generar una matriz de distancias genéticas y construir árboles de clasificación. Estos árboles se generan por agrupaciones progresivas de similitud, e indican gráficamente las distancias relativas que separan a los grupos o a los linajes taxonómicos independientes.³

Caracterización de cepas.⁴ Se ha iniciado la observación sistemática del genoma por análisis isoenzimático en geles de acetato de las cepas mexicanas de *T. cruzi*. La migración de enzimas

presenta patrones semejantes de corrimiento en las cepas mexicanas analizadas, excepto la C4 procedente de Jalisco. Basado en esto se construyeron dendrogramas y se concluyó que el patrón de los parásitos estudiados era semejante, sobre todo en Yucatán. La cepa de Jalisco presentó un patrón más parecido a las cepas de Sudamérica. Así resulta necesario investigar las variaciones genéticas en cepas provenientes de esa y otras regiones empleando una estrategia semejante. También se ha iniciado el estudio sistemático del genoma por medio de la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPDS), de los mismos aislados mexicanos de *T. cruzi*. La amplificación aleatoria del DNA polimórfico por medio de la PCR permite hacer la caracterización molecular del parásito. En este estudio se obtuvieron resultados similares al análisis por isoenzimas. El estudio sistemático de patrones isoenzimáticos y análisis del genoma de aislados mexicanos de *T. cruzi* facilitará establecer la correlación con datos clínicos y epidemiológicos para evaluar mejor las características de la infección y la enfermedad en nuestro país.

Infección con trypanosomas vs. enfermedad de Chagas.¹⁹ El Instituto Nacional de Cardiología (INC) ofrece su capacidad para coordinar estudios colaborativos. Existe gran interés por definir las características de las infecciones asintomáticas por *T. cruzi* y los determinantes de la enfermedad de Chagas. Ya se hace el diagnóstico de la enfermedad entre los clínicos, los electrocardiógrafistas y electrofisiólogos, entre los especialistas en cardiología nuclear e incluso entre los cirujanos; hay muchas oportunidades y existe el propósito de aprovecharlas. El acceso a enfermos en el campo y en hospitales, es un factor importante para el desarrollo de investigaciones clínicas y de epidemiología molecular, así como para la formación de recursos humanos.

Aspectos clínicos y epidemiológicos! El diagnóstico sensible y específico serológico y parasitológico de la enfermedad se considera fundamental. El INC ha realizado estudios en diferentes comunidades de los estados de Chiapas y Oaxaca con distintas técnicas serológicas: contra inmuno electroforesis (CE), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, Dot-ELISA, electroinmunotransferencia (EIT), encontrando que la seroprevalencia se sitúa al rededor del 30% y que

el ensayo de ELISA puede ser utilizado con un marco de continua muy aceptable (sensibilidad 100% y especificidad 98%). Recientemente, se usa PCR en muestras experimentales. En un caso de necropsia con sospecha de enfermedad de Chagas se encontró la evidencia del material del parásito por inmunohistoquímica y PCR.

Detección de Trypanosoma cruzi por el Método de PCR.⁷ En México el 40% de las personas con miocardiopatía dilatada tiene anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*. En la fase crónica, la parasitemia es esporádica y escasa, por lo que no es posible detectar el parásito por métodos directos. Con el objeto de determinar la presencia del parásito se empleó un método sensible y específico capaz de detectar *T. cruzi*. Para ello se usan dos oligonucleótidos (KNS1 y KNS2), diseñados a partir de la secuencia del ADN de minicírculos de cinetoplasto de varias cepas y aislados, para amplificar la región hipervariable por el método de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR). Con este método se logró detectar el equivalente de 0.8 a 1.5 moléculas de minicírculo o 1/12000 de parásito. Al aplicar el método a muestras de ADN de tejidos de ratones infectados con el parásito, se amplificó un producto que fue reconocido por una sonda específica para minicírculos. Estos resultados correlacionan con estudios inmunohistoquímicos que muestran la presencia tisular del parásito a varios tiempos estudiados. El método desarrollado puede tener aplicación en estudios clínicos y epidemiológicos de campo en seres humanos y de vigilancia en bancos de sangre.

La epidemiología de una enfermedad regional. La enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, México.⁸ Es innegable la presencia de las infecciones por *T. cruzi* y de la enfermedad de Chagas, documentadas por los resultados de encuestas serológicas y el registro de casos agudos y crónicos y la presencia de 11 especies de triatomos. No obstante, nos seguimos preguntando: ¿Cuál es la prevalencia y distribución de la enfermedad y cuáles son sus determinantes en el hombre? El mayor acercamiento a su distribución hasta este momento es la encuesta realizada en 1988, por la Universidad de Guadalajara para medir la prevalencia de anticuerpos en el suero de una muestra de la población de 13274 habitantes; en 124 municipios del estado. El 17.4% de la

población mostró la presencia de anticuerpos (HAI) con probable infección por *T. cruzi*. Sin embargo, la incidencia y prevalencia de la enfermedad se desconocen, por no contar con la metodología de diagnóstico sensible y específico al alcance del clínico. Los pocos casos que por sus excepcionales manifestaciones se diagnostican, son insuficientes para generar información epidemiológica sólida. Es necesario el desarrollo de hipótesis que permitan la explicación de los patrones locales de la enfermedad, su distribución, la clasificación de los infectados, factores de riesgo y la historia natural de la enfermedad. Debemos organizar un plan de trabajo que salga de lo exótico y excepcional, a la búsqueda de principios generales de la enfermedad de Chagas en México como problema de salud pública.

Conclusiones sobre trypanosomosis

Se han descrito artrópodos invertebrados vectores, roedores y mamíferos reservorios infectados y se han comprobado casos clínicos agudos y crónicos en seres humanos. En estos últimos hospederos, la sintomatología es heterogénea, pero se han detectado tanto los casos de cardiopatía chagásica como los mega síndromes de vísceras huecas. La serología positiva en muestras tomadas aleatoriamente es mayor a 10% en prácticamente todas las localidades rurales estudiadas y en bancos de sangre se ven valores aproximadamente de 0.2-1% y en hospitales de la ciudad la prevalencia es mayor a la encontrada para SIDA o hepatitis B.

Por alguna razón, el número de pacientes reportado a las autoridades sanitarias es bajo. Esto podría explicarse por dos razones: a) la variedad de Chagas en México es particularmente benigna, b) los médicos de zonas rurales no hacen el diagnóstico correctamente.

Existen en México grupos de investigación básica, clínica y epidemiológica interesados y capacitados para desarrollar proyectos de investigación encaminados a responder a las siguientes preguntas que se presentaron en el taller como fundamentales, a fin de entender la dinámica de la transmisión de la trypanosomosis mexicana y la relación entre el agente causal, sus vectores y sus reservorios:

1. ¿Las formas clínicas de la enfermedad de Chagas observadas en México son las mismas en todas las zonas del país. O existen formas regionales?
2. ¿Cuál es la evolución clínica y de la respuesta inmune de los pacientes infectados con *T. cruzi*?
3. ¿Las diferentes formas clínicas están asociadas a diferentes cepas de *T. cruzi*?
4. ¿Cuáles son las características de las diferentes cepas de *T. cruzi* en México?
5. ¿Cuál es la frecuencia real de las cardiopatías y megasíndromes producidos por *T. cruzi* en México?
6. ¿Qué pruebas serológicas están bien caracterizadas para utilizarlas en encuestas epidemiológicas, y cuales son los antígenos específicos a emplear?
7. ¿Qué protocolo de diagnóstico molecular (PCR) debe emplearse en el diagnóstico?
8. ¿Cómo puede vincularse la investigación básica con la epidemiológica y clínica sobre la enfermedad?
9. ¿Cuál es el protocolo apropiado que deben emplear los grupos de estudio sobre distribución de vectores y los de reservorios?

Se propuso la creación de grupos interdisciplinarios que estudien la enfermedad de Chagas focalmente en diferentes regiones del país. Para lograr que los resultados sean comparativos, deben estandarizarse las pruebas y debe establecerse el control de calidad de los reactivos biológicos empleados.

Se requiere la creación de una red de estudios colaborativos que coordine las investigaciones y tenga acceso expedito a autoridades sanitarias nacionales del nivel de decisión.

La Secretaría de Salud debe reconocer la existencia de la enfermedad de Chagas en México, y alertar al personal médico de las zonas endémicas.

Las *Leishmaniasis* tienen un espectro sumamente complejo y diverso: desde una infección que se manifiesta por una mácula insignificante, pasajera y de curación espontánea, hasta la invasión sistémica visceral que puede resultar en óbito, sobre todo en niños de corta edad y desnutridos; manifestándose desde por úlceras benignas hasta lesiones difusas, mutilantes y estigmatizantes. Las

leishmaniosis deberían ser enfermedades de notificación obligatoria en todos los países de la Región de las Américas. El número en ascenso de casos registrados en la actualidad en seres humanos y en reservorios animales presenta apenas una parte de la realidad y sólo si se hicieran esfuerzos por conocer una verdadera magnitud, se podría confirmar la hipótesis de que es un importante y creciente problema de salud pública que merece atención urgente y prioritaria debido al daño a la salud que está generando.⁹

Diagnóstico sensible y específico de LC, LMC y LV. En el campo de la caracterización de los diferentes complejos y especies de *Leishmania*, un aporte de gran valor que ha brindado la biotecnología, es la caracterización fenotípica mediante anticuerpos monoclonales. Esta metodología permite caracterizar rápidamente a las leishmanias, utilizando las técnicas de ELISA y de Insumo Fluorescencia Indirecta.¹⁰ Los estudios epidemiológicos relacionados con la virulencia y la respuesta terapéutica de la Leishmanias, en particular las que producen lesiones cutáneas y mucocutáneas, requiere técnicas para la identificación genotípica como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR),¹¹ para amplificar el DNA del cinetoplasto con oligonucleótidos iniciadores específicos de diferentes cepas de *Leishmania*, o por medio de la PCR que utiliza la amplificación polimórfica aleatoria¹² (RAPD DNA), del DNA con oligonucleótidos arbitrarios no específicos para *Leishmania*. Las aplicaciones de la biotecnología disponible en el campo de las *Leishmaniosis*, por su trascendencia deberá tener prioridad para la Leishmaniosis Visceral (LV). Las necesidades de información en las áreas de biología molecular para fortalecer el diagnóstico son principalmente para el diagnóstico de la LV mediante pruebas rápidas, factibles de realizar en el campo y de alta sensibilidad y especificidad. Las pruebas pueden ser para detección de anticuerpos específicos y capaces de detectar niveles bajos, utilizando antígenos relacionados con la kinesina de *Leishmania chagasi* como el "Dip Stick", desarrollado en Brasil actualmente en fase de evaluación, que se puede usar en humanos y animales, para el diagnóstico de la LV o pruebas que detecten antígenos del parásito.¹³

Tratamiento oportuno y eficaz. Los esquemas usados con medicamentos esenciales en el tercer mundo presentan varios problemas, incluyendo la dependencia a la importación de los medicamentos frente al déficit crónico del intercambio internacional, los insuficientes recursos humanos y la deficiente capacidad para seleccionar y adquirir las drogas, la competencia entre los medicamentos genéricos y los de patente, sistemas locales débiles para el abastecimiento y distribución de las drogas y la incapacidad de comenzar la manufactura local incluso en donde pudiera parecer que existen situaciones ventajosas. Muchos de estos problemas se relacionan entre sí y tienen su origen en el dominio de la industria farmacéutica internacional (IFI).¹⁴

Biología y control de los vectores. Respecto a la biología y el control de los dípteros del género *Lutzomyia* vectores de las leishmaniosis, sabemos que son flebotómidos voladores muy activos y sus estadios inmaduros se desarrollan en varios hábitat de difícil localización y acceso. Esta situación, además de que hace al hombre una víctima circunstancial al exponerse *accidentalmente* a los nichos naturales y es probablemente la causa de que no se disponga de la información suficiente sobre parasitoides, predadores y competidores de las *mosquitas de la arena o papalomoyos* (del náhuatl *papalotl, mariposa; moiotl, mosquito*), como para conocer los métodos y desarrollar la tecnología eficaz orientada hacia el uso efectivo de agentes para el control biológico en programas integrados de control y de manejo ambiental.¹⁴

Agentes inmunizantes. La superficie de la membrana de las Leishmanias está muy protegida contra el ambiente encontrado en el vector invertebrado, en los reservorios y en el hombre. También provee especificidad de interacción con el macrófago humano. Aunque parcialmente identificadas, las más importantes moléculas, tanto en los promastigotes como en los amastigotes, son los glicoconjugados lipofosfoligano y una glicoproteína de aproximadamente 63 kDa. Estas moléculas varían estructuralmente entre las especies de *Leishmania* ya través del ciclo de vida del parásito. Además produce gran cantidad de moléculas de superficie, inclusive de la familia de los fosfolípidos del glicosyl-inositol, el complejo del Antígeno-2 de

la Superficie del Promastigote, de glicoproteínas y una glicoproteína de M(r) 46,000. Estas moléculas comparten un dispositivo común de enlace con la membrana protoplásmica por vía lipídica glicosilfosfatidilinositol. Las leishmanias también liberan moléculas de su propia superficie, las cuales son específicas de especie de tal importancia biológica, que podrían ser la base de investigaciones sobre la factibilidad potencial de ser utilizadas como elementos para el desarrollo de quimioterapia o como candidatos a emplear como agentes inmunizantes.¹⁵ Actualmente se desarrollan otros estudios de epidemiología molecular y se inician algunos ensayos de inmunogenicidad y antigenicidad en Venezuela y en Irán, usando parásitos muertos y BCG. Estos estudios inmunoprofilácticos se basan en parte en el éxito obtenido mediante la inmunoterapia en pacientes con leishmaniosis cutánea, usando *L. mexicana* muerta con BCG.¹⁶

Estado actual de las investigaciones en México sobre Leishmanosis

Variaciones genéticas de **leishmanias**.¹⁷ Se han aislado *Leishmania mexicana mexicana* y *Leishmania braziliensis* de pacientes con leishmaniosis cutánea. Como la caracterización se ha basado en expresiones fenotípicas del parásito, existe la posibilidad de pequeñas variaciones genéticas que pudieran ser responsables de la variación de la virulencia en el hombre. Hoy en día se utilizan dos métodos para el análisis genotípico de parásitos aislados de pacientes con distintos cuadros clínicos: a) el análisis de la digestión de ADN de kinetoplasto (KADN) del parásito mediante endonucleasas de restricción y b) la reacción en cadena de polimerasa utilizando (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA), con oligonucleótidos arbitrarios, no específicos para *Leishmania*. Los resultados obtenidos hasta la fecha del análisis del KADN indican que tanto *Leishmania mexicana mexicana* como *Leishmania braziliensis* pueden producir los cuadros de LCL como de LCD. *Leishmania braziliensis* fue aislada en Campeche. *Leishmania mexicana mexicana* se encontró en pacientes con LCD de Veracruz, Michoacán y Tabasco, además de haberse encontrado en gran número de pacientes con LCL prove-

nientes de toda la República. Un dato muy interesante fue el hallazgo de un parásito aislado de una paciente con LCL de Comalcalco, Tabasco, quien presentó un patrón diferente al de *L. mexicana mexicana* y *L. braziliensis*, pero idéntico al de *Leishmania major*, originaria del Medio Oriente. Para detectar variaciones genéticas intraespecie que pudieran explicar la virulencia en seres humanos se introdujo el RAPD. Las variaciones genéticas intraespecie se relacionan con el cuadro clínico y tienen importancia para el tratamiento y seguimiento del enfermo, así como relevancia epidemiológica ya que permitiría establecer el riesgo de la transmisión del parásito con mayor precisión.

Caracterización de **cepa**.¹⁸ Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para amplificar el DNA del cinetoplasto (kDNA), de varias cepas de *Leishmania* con oligonucleótidos iniciadores ("primers"), específicos para los complejos de *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. donovani*. El DNA de la mayoría de los cultivos amplificó con los iniciadores de *L. mexicana* y sólo dos de ellos lo hicieron con los de *L. braziliensis*. Con los productos del PCR se hicieron cortes con las enzimas de restricción y se observaron diferencias en el número de sitios de corte de estas enzimas entre las secuencias de los minicírculos del kDNA de los aislados y de secuencias de las cepas tipo de *L. mexicana* y *L. braziliensis*. Siete de 12 biopsias amplificaron con los iniciadores de *L. mexicana* y una biopsia amplificó con los dos juegos de iniciadores. Estos resultados sugieren que las cepas pertenecen al complejo *L. mexicana*, pero presentan analogía con el grupo *L. amazonensis* de este complejo y 4 cepas presentan características del complejo *Leishmania braziliensis*. Por los resultados obtenidos pensamos que es muy importante identificar las cepas de *Leishmania*, conocer cuantas tenemos en México, su distribución geográfica y su frecuencia y medir la susceptibilidad a los medicamentos. Estas metas las podemos alcanzar con las técnicas de biología molecular que mencionamos antes.

Susceptibilidad **genética**.¹⁹ Extensos estudios en el modelo murino muestran que la leishmaniosis está regulada genéticamente. Se analizó la participación de los genes principales de histocompatibilidad (MHC), en la LCL en pacientes con LCL y en 100 controles sanos. La tipificación con los anti-

genos HLA clase I y clase II mostró una asociación significativa con DRw11 y con DQw3. También se encontró un descenso significativo de DPw4, sugiriendo la existencia de un gen de resistencia asociado a DP. El complejo principal de histocompatibilidad (MHC), juega un importante papel entre la especie del parásito y la estructuragenética del paciente. Los genes del complejo HLA están asociados a la expresión de la LCL. Los estudios realizados sugieren que el gen DQ3 es un marcador de susceptibilidad. El verdadero gen de la susceptibilidad posiblemente recae en el loci DQA1. Un hallazgo interesante es la presencia de un gen de resistencia encontrado en la región DPSI. El DPS1*0201 está muy disminuido en los pacientes, lo cual sugiere que cuando una persona carece de este alelo y esta expuesta al parásito, el riesgo de desarrollar LCL es muy alto. Alternativamente, ambas cadenas contribuyen a mostrar péptidos al receptor de linfocitos T (TCR), que estimulan la respuesta inmune. La adhesión de C33 a los macrófagos permite que las leishmanias evadan la cascada de complemento y contribuyan a la internalización del parásito. El estudio comprendió pacientes con LCL, LCD y LMC y mostró que la *Leishmania* se cubre con moléculas de clase I y II independientemente de la forma clínica de la enfermedad. También parece ser independiente de la especie, ya que *Leishmania mexicana* era el agente infeccioso del LCL y LCD, mientras que *Leishmania panamensis* fue el agente de la LMC. Las moléculas del MHC en seres humanos están involucradas en los mecanismos de protección que probablemente involucren linfocitos T cooperadores y mecanismos citotóxicos. Se diseñó un modelo *in vitro* con el objeto de evaluar la habilidad del macrófago (MO), para destruir y eliminar los parásitos y para definir cuál clase de genes II están involucrados. Los resultados confirmaron que DQ3 es un elemento de restricción, ya que el 86% de DQ3 + MO eliminaron los parásitos, contra 40% del DQ3-.

Aspectos clínicos y epidemiológicos en **Tabasco**.²⁰ Este estado cuenta con zonas diferenciadas: Los ríos, cerros, zonacentro, La Chontalpa, la cacaotera de Comalcalco y la periurbana. En 1994, en 14 de los 17 municipios se registraron casos de leishmaniosis y las localidades positivas con mayor número de casos en 1994 fueron Culhuacán, Chontalpa, Cárdenas, Huimalpa. De

los reportes menos favorecidos, el número de casos podría ser mucho mayor. Con una brigada especial se encontraron tantos casos que hubo que "enviar un detector de mentiras", durante los meses de junio, julio y agosto. En el diagnóstico que se hace por improntas varía la sensibilidad. En 1994 hubo 396 casos en Culhuacán, Cárdenas y Comalcalco. La tendencia es que al haber mayor pesquisa se registran más casos. En 1989 se registraron 77 casos; en 1993, 451 en 1994, 493. Hasta la semana 18 de 1995, 44 casos. En estos estudios se cuenta con el apoyo de los microscopistas del programa de control del paludismo después del adiestramiento sube el número de casos de LCL a 1739 casos, LCD 7 y LMC 2. La edad de los pacientes es desde menos de 1 año hasta más de 65 años. En los adultos se considera como enfermedad ocupacional. La mayoría de los casos tiene una lesión, la cual se sitúa preferentemente en el brazo (95), oreja (33) cara (29), pero se encuentra en todas las partes del cuerpo.

Deben normarse las relaciones, ya que la provincia cuenta con buen personal y espacios bien organizados, lo que hace posible mejorar la organización de programas de prevención, vigilancia y control de las enfermedades endémicas transmitidas por vectores.

Epidemiología de la LC, BVR en **Campeche**.²¹ El conocimiento generado que se da en el estado de Campeche por un equipo de trabajo multi e interdisciplinario, recibió por parte de la Secretaría de Salud, la adjudicación de Centro de Referencia para el estudio de las leishmaniosis desde 1988. El área de trabajo en el estado de Campeche, fue seleccionado por reportes de casos, porque el 59.73% de su superficie es un bosque húmedo tropical en donde vive el 45% de la población económicamente activa. El Índice Alérgico (IDRM-positiva), de 9.4% en grupos abiertos y de 43% en el grupo de alto riesgo. Los factores de riesgo identificados son personas del sexo masculino, de 10-44 años de edad y que realizan labores en del área selvático. La tasa anual de incidencia de enfermedad ha variado de 1990 a 1993 de 2.75 a 6.65 por 1 000 habitantes. El cuadro clínico se caracteriza por úlcera única subcutánea modular, con evolución de menos 12 meses ("agudos"), en el 75% de los casos; con localización predominantemente en oreja en los casos con 12 meses

("crónicos"); y respuesta de 100% al tratamiento con antimonio de meglumina a la dosis de una ampolla/diaria intramuscular hasta la cicatrización. Para la identificación de los parásitos de pacientes, se utilizan técnicas de hibridación con sondas biotinadas de kDNA; la caracterización isoenzimática por electroforesis en acetato de celulosa y recientemente la de anticuerpos monoclonales por epifluorescencia indirecta. El parásito más frecuente es *Leishmania (L) mexicana* sólo han sido identificado 5 aislados de pacientes con *Leishmania (V) braziliensis*, utilizando los tres métodos. La identificación mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, fue confirmada en una muestra de 1500 aislados de pacientes, reservorios y vectores. Se realizaron estudios de captura-recaptura en 4 diferentes hábitats en un área selvática localizada a 8 km., al sur del Ejido La Libertad. De acuerdo a la recomendación del TDR/WHO para identificar reservorios, solamente *Ototylomys phyllotis* y *Peromyscus yucatanicus*, pueden ser considerados como tales. El parásito aislado fue identificado como *Leishmania (L) mexicana*. El periodo durante el cual se encontraron infectados fue de noviembre a marzo. Al evaluar la posibilidad de transmisión en el peridomicilio, sólo se capturaron 59 *Lutzomyias* spp, hembras antropofílicas y ninguna infectada en un periodo de un año. En el área selvática se capturaron 905 *Lutzomyias* spp, hembras antropofílicas en un periodo de un año, observándose que el 7% de *Lutzomyia olmeca* y el 4,5% de *Lutzomyia cruciata* estaban infectadas con *Leishmania*. El periodo en el cual se encontraron las especies infectadas es entre los meses de noviembre a marzo; cuando es menor la temperatura promedio y es mayor la humedad relativa

Con base en todo lo anteriormente expuesto, podemos afirmar que el foco de LCL estudiado del estado de Campeche es una zoonosis de transmisión selvática. Considerando que en México, 14 estados han notificado la presencia de LCL, es necesario realizar la caracterización epidemiológica de cada foco, mediante estudios centinelas, para identificar el patrón epidemiológico predominante. Una vez logrado será posible diseñar/evaluar las estrategias de prevención/control adecuadas, con el fin de disminuir las tasas de incidencia de infección/enfermedad.

Conclusiones sobre Leishmaniosis

Se han logrado avances extraordinarios en el conocimiento de los diferentes tipos de protozoarios parásitos del género *Leishmania* y sus relaciones, tanto con los artrópodos vectores del género *Lutzomyia*, como con los mamíferos hospederos de diversos géneros. El avance es menor en el entendimiento de los mecanismos de transmisión, el proceso patológico, la respuesta inmune del vertebrado afectado y su relación con las manifestaciones clínicas, el tratamiento y los métodos de prevención y control.

La creciente preocupación por conocer mejor a estos protozoarios de importancia en Salud Pública ha atraído la atención de investigadores de otras disciplinas hacia la Leishmaniología, como inmunoquímicos, biólogos moleculares, inmunólogos y epidemiólogos. El reclutamiento de estos científicos ha ayudado a generar las bases del conocimiento actual de los ciclos de vida y del comportamiento de los parásitos dentro de los vectores invertebrados y en el interior de los macrófagos del huésped vertebrado. También han colaborado mucho para aclarar la relación inmunológica entre los parásitos y sus huéspedes, particularmente los seres humanos, contribuyendo a la tipificación de las lesiones patológicas observadas en la práctica clínica y de salud pública. La introducción de animales de laboratorio, en especial líneas de ratones con características fijas ("*inbred mice*"), ha sido el principal sostén de los estudios inmunológicos y, junto con los estudios clínicos en seres humanos, hemos podido comprobar que las leishmaniosis existen en un amplio espectro de formas de la enfermedad, relacionadas entre sí. Esas líneas de ratones han ayudado también a comprender las bases genéticas de las distintas formas que puede asumir la enfermedad.

Con la secuencia polifórmica que el parásito asume en el artrópodo vector, hoy se admite que el ciclo de vida es mucho más complicado que como originalmente se pensó. Todavía tenemos lagunas en el conocimiento del ciclo de vida del parásito y la función de algunas formas de promastigotes. Para diseñar métodos de control eficaz es indispensable conocer mejor el proceso de transmisión. Se ha estudiado de manera parcial el desarrollo de los estadios infectantes y las bases bioquímicas de

la infectividad de los promastigotes a los macrófagos; pero es preciso entender la sobrevivencia de los parásitos en el tracto digestivo de sus vectores y de los fagolisosomas dentro de los macrófagos de sus huéspedes mamíferos.

Los copiosos datos de estudios sobre las características bioquímicas, moleculares y serológicas de los parásitos han sustentado la definición clásica de las especies de *Leishmania* y han probado la existencia de varios tipos nuevos del parásito. Estos nuevos tipos, parecen agruparse en complejos o separarse en nuevas especies. Los estudios de clonación indican que hay un cierto grado de variación dentro de las especies y poblaciones de *Leishmania*. Esos estudios, realizados con nuevos procedimientos, han previsto de bases firmes para la identificación de vectores y reservorios y han generado información que ayudará a establecer los grupos taxonómicos del género *Leishmania*. No se ha comprobado la existencia de recombinación sexual. Esta posibilidad podría afectar la posición taxonómica del género.

Se han introducido tecnologías inmunológicas y moleculares modernas para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico. Estos métodos no reemplazan al diagnóstico parasitológico clásico ni a las pruebas cutáneas con *leishmania*, pero se utilizan para confirmar el diagnóstico clínico y para discernir los casos en los que ha sido difícil demostrar la presencia de parásitos y en encuestas epidemiológicas. Las encuestas realizadas con esta nueva metodología indican que las infecciones por *Leishmania* están diseminadas más ampliamente que lo que sugieren las encuestas realizadas por medio de la observación de casos clínicos y que probablemente el número de infecciones asintomáticas rebasa el número de casos clínicos.

En años recientes, ha habido avances significativos en el tratamiento. Estos se han dado principalmente en la quimioterapia y no es que se hayan incluido nuevos fármacos, sino que se han introducido nuevos modos de administración de los medicamentos existentes. Estos métodos de tratamiento usan nuevos regímenes, dosis, vías de administración y combinación de fármacos. Por ejemplo, para tratar una simple LC, los compuestos activos se han administrado en ungüentos y pomadas. También se han introducido tratamientos inmunomanipuladores. No obstante haberse con-

seguido una quimioterapia más eficiente, aún se requiere el tratamiento eficaz contra las leishmaniasis más severas LV, LCD y LMC. El desafío que enfrentamos a la resistencia naturalmente adquirida por algunos tipos de *Leishmania* es un problema persistente en el horizonte.

La prevención de las leishmaniasis por medio de la inmunización es aún una esperanza. Abundan las vacunas experimentales y algunas de ellas muestran cierto grado de eficacia para la prevención de la leishmaniasis en modelos animales. Los agentes inmunizantes contra la mayoría de las formas de leishmaniasis en el hombre permanecen sin definición y aún se usa la leishmanización como forma de control de las LC simples. Esta práctica puede ser un argumento a favor de la protección por medio de la premunición como el principal método de control, pero ha mostrado resultados muy pobres en salud pública.

La naturaleza de los invertebrados vectores de las leishmaniasis y la existencia de reservorios domésticos y salvajes complican el control de la transmisión. Las que son zoonosis podrían considerarse como no eliminables debido a la imposibilidad de controlar la infección en los animales salvajes. Se podría argumentar que aunque el riesgo absoluto de las leishmaniasis en el hombre puede reducirse vastamente, las leishmaniasis estarán circulando siempre en sus nichos naturales, listas a infectar y causar enfermedades en los seres humanos que penetren en desiertos o en selvas donde existan reservorios y vectores, incluyendo regiones más densamente pobladas, donde se producen epidemias cuando se relajan las medidas de control.

Los investigadores, personal de salud pública y epidemiólogos están describiendo continuamente más variantes en las especies de *Leishmania* y que los parásitos existen en más áreas de lo que se ha pensado. Desde la aparición del SIDA, la observación de casos subclínicos se puede convertir en infecciones explosivas en portadores de VIH. Como el SIDA bloquea la inducción de inmunidad celular, la solución del problema no es la quimioterapia.

Se espera un brillante futuro a largo plazo futuro para el desarrollo de la leishmaniología. El futuro de la atención médica y de las acciones de los programas efectivos de prevención y control es mucho menos brillante y no obstante los avances

obtenidos en las últimas tres décadas, parece que no hemos ni siquiera comenzado la batalla para la prevención y el control contra la leishmaniosis.

En México, ha habido un aumento considerable en el número de casos de LCL y LCD. En 1994, en el Estado de Tabasco se detectaron por medio de improntas 739 casos de LCL, 7 casos de LCD y 2 casos de LMC con edades de menos de un año hasta 65 años. No se efectúa una búsqueda activa a nivel nacional por falta de recursos para el diagnóstico y tratamiento oportunos. Las leishmanias aisladas y estudiadas son de pacientes con LCL y LCD provenientes del sureste del país. Cuando se utilizan anticuerpos monoclonales para la tipificación de los parásitos, todas las cepas corresponden a Leishmania mexicana. Mediante la aplicación de las técnicas de biología molecular, como PCR y Southern Blot, es posible identificar Leishmania mexicana mexicana, Leishmania mexicana amazonensis y Leishmania braziliensis. Existen datos de mutaciones intraespecie, probablemente responsables por la virulencia de las leishmanias en pacientes con LCD. En la Península de Yucatán, entre los meses de noviembre y agosto se han encontrado infectadas con leishmanias hasta el 7% de Lutzomyia olmeca y 4.5% de Lutzomyia cruciata. Los principales reservorios silvestres en el área son Otodylomys phyllotis y Peromyscus yucatanicus.

Los problemas que requieren solución apremiante son: a) la ausencia de un servicio de diagnóstico oportuno y efectivo; b) el desconocimiento de la tasa de infección en el país; c) la falta de caracterización de las leishmanias y del desconocimiento de la distribución geográfica de los vectores y reservorios y d) el incremento de pacientes inadecuadamente tratados con antimonio de meglumina

Epidemiología y Control de las IETV¹⁴

Controles, factores de riesgo y sensibilidad diferencial. Las Normas Oficiales para la Prevención y el Control de las Infecciones y Enfermedades Transmitidas por Vectores (IETV), abarcan medidas generales de prevención y control; no obstante, nos parece necesario que hagan énfasis en el papel tan importante que las investigaciones

epidemiológicas tienen en el reconocimiento y análisis de los factores de riesgo en los cambios ambientales y las migraciones que alteran el grado de exposición de las poblaciones humanas a la transmisión de las IETV. Habrá que enfrentar las dificultades metodológicas que implican los estudios epidemiológicos tales como:

- a) ausencia de controles, los cambios que se observan en el estado de salud podrían deberse a factores desconocidos que no se han valorado apropiadamente; la correlación entre el estado de salud observado y un factor ambiental particular no implica necesariamente causalidad;
- b) factores de riesgo múltiples: puede ser muy difícil metodológicamente separar los efectos de exposición a un simple factor de los efectos de exposición espontánea a varios otros factores los cuales además varían estacionalmente;
- c) sensibilidad diferencial; la información raramente está disponible con relación a la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los instrumentos de diagnóstico para medir con precisión la población que está expuesta, las condiciones y situaciones de exposición, como la presencia de diferentes grupos en riesgo de contraer la infección y la enfermedad de morir por esa causa, condiciones generales de nutrición y salud, exposición actual a otras situaciones ambientales, infecciones y parasitosis prevalentes, respuesta inmune a las mismas, exposición a diversos factores meteorológicos en el momento del estudio y otros factores.

La predicción de cómo podrían afectar los ciclos de vida de los vectores los cambios en el ambiente debido a los proyectos agropecuarios, constituye un procedimiento complejo que requiere el conocimiento profundo tanto de la biología y la ecología de los vectores específicos como de los cambios en el estilo de vida de la población afectada. El grado del conocimiento de la ecología de las enfermedades que comprende la norma es aún inadecuado e impreciso en lo que se refiere a los métodos para la predicción de los efectos de los cambios ambientales sobre una especie en particular o en las subespecies o cepas de un determinado agente infeccioso o sus vectores. Es indispensable hacer un juicio que tenga bases en infor-

mación sobre el ambiente particular de las especies incriminadas como vectoras.

Medición de variables y determinación de los cambios. La medición de las variables cualitativas y cuantitativas que describan el impacto de los proyectos agrícolas y pecuarios en la incidencia de IETV como las plasmodiosis, las leishmaniosis, las trypanosomiosis o las filariosis (inclusive la oncocercosis), en el hombre o la descripción de los cambios intermediarios en los factores de riesgo en el ambiente y de las condiciones de vida de la población humana que tienen efecto en el proceso de desarrollo, es sumamente difícil, a menos que se organice y active un sistema de información geográfica y biológica apropiado. Además de considerar los problemas relacionados con la investigación de la estructura genética y de los determinantes de los cambios en el estado de salud de la población humana, es importante hacer sentir la necesidad de crear un sistema de registro, vigilancia y monitoreo de la salud y los cambios en la situación del ambiente. La pericia para realizar esta tarea no es atributo común dentro del grupo de los trabajadores de la salud, pero esta información junto con el aporte de la promoción de la salud es indispensable para crear el conocimiento de los efectos de los factores de riesgo del ambiente en la salud del hombre y para proveer la información que contribuya a la activación de un sistema de detección/alarma oportuno para la prevención y el control de las IETV.

Planteamiento del problema. Se han formulado acuerdos interinstitucionales entre los países de la región y se cuenta con el Plan Multinacional que incluye los objetivos, estrategias, actividades y resultados esperados. Sin embargo, existen serias limitaciones para el desarrollo de programas efectivos en los países de la Región de las Américas; como son:

- a) la población expuesta al riesgo de infectarse, enfermar o morir por trypanosomosis americana o por leishmaniosis, desconoce los mecanismos de transmisión, la evolución y efectos de estas enfermedades y los métodos para prevenirlas y combatirlas;
- b) los trabajadores de Salud desconocen los métodos de diagnóstico que permitan medir con precisión los factores de riesgo absoluto (inci-

dencia), atribuible y relativo que afectan la transmisión y la evolución de la infección/enfermedad y carecen de elementos, métodos y tecnologías eficaces para desarrollar programas efectivos y permanentes de prevención y control de estas enfermedades;

- c) el subregistro en el número de casos podría ser una de las causas de la falta de interés y definición de la comunidad científica para dar prioridad a las investigaciones epidemiológicas, inmunológicas, bioecológicas y biomoleculares del hombre expuesto, de los *Trypanosomas* y las *leishmanias*, de los triatominos y flebotómicos, de los reservorios y de la ausencia de decisión política para apoyar la generación y la administración del conocimiento científico, el desarrollo tecnológico y los métodos y programas eficaces de prevención, control y vigilancia;
- d) los medicamentos para el tratamiento eficaz contra estas enfermedades (nifurtimox, benznidazole, alopurinol y antimoniales pentavalentes), se adquieren por medio de procesos complicados o están ausentes en las farmacias y dispensarios de las áreas endémicas.

Recomendaciones a las autoridades de salud

Una vez que se cuente con la decisión política del Poder Ejecutivo para definir la prioridad de estos problemas de salud pública en el país, con el apoyo de las inversiones en recursos humanos y financieros del sector público y privado y de las agencias internacionales de cooperación técnica y para el desarrollo, se hace necesario que el Grupo IMETAF coordine el cumplimiento de las siguientes acciones:

1. Establecer un Centro de Referencia para el Diagnóstico, tipificación y registro de *Trypanosomas* y *Leishmanias* y de sus vectores y reservorios, dotado de un Banco para Criopreservación de especímenes.
2. Promover y facilitar aportaciones de material de referencia internacional a los diversos laboratorios participantes para facilitar la identificación de cepas.
3. Fomentar la generación de tecnologías de fácil transferencia para el diagnóstico oportuno (con

la mayor sensibilidad y especificidad) y para el tratamiento eficaz y adecuado.

4. Elaborar protocolos para el estudio epidemiológico molecular colaborativo de las trypanosomosis y de las leishmaniasis cuyos resultados sirvan de sustento al desarrollo de programas efectivos de prevención, control y vigilancia de las IETV.

Esas acciones podrán apoyarse sólo con la decisión de obtener el financiamiento adecuado para:

- el fortalecimiento institucional de grupos académicos interesados en las IETV, con el objeto de promover y organizar programas de investigación esencial y desarrollo tecnológico,
- el desarrollo de recursos humanos académicos calificados para la investigación de la biología y ecología del hombre expuesto, agentes infecciosos, vectores y reservorios,
- el desarrollo de recursos humanos calificados a nivel de Sistemas Locales de Salud para el estudio epidemiológico de las IETV y para diseñar, ejecutar y evaluar programas efectivos para su prevención, control y vigilancia,
- organización y desarrollo de programas de prevención, control y vigilancia con la adecuada asignación de recursos humanos, financieros e institucionales.

Para incorporarse al compromiso del IMETAF y colaborar en el cumplimiento de las acciones decidieron reunirse espontánea y voluntariamente, varios de los participantes de este taller: doctores Fernando J. Andrade Narváez, Ingeborg Becker, Amalia Monroy y Sergio León-Ramírez para Leishmaniasis y doctores Bertha Espinosa y Roberto Hernández para Tripanosomosis

Apoyo a grupos de investigación. Los métodos utilizados para la identificación y medición de los marcadores biológicos deben simplificarse, lo cual permitirá su disponibilidad en los laboratorios clínicos. Por otro lado, se requieren métodos que permitan definir marcadores y factores de virulencia, lo que facilitaría la realización de estudios epidemiológicos colaborativos y ayudaría a comprender mejor la patogénesis de estas enfermedades infecciosas y parasitarias. Es necesario hacer

investigaciones para definir marcadores inmunológicos, para el desarrollo de agentes inmunizantes contra estas infecciones parasitarias.

Apoyo institucional

Fortalecimiento institucional.

Desarrollo de recursos humanos académicos.

Desarrollo de recursos humanos en los sistemas locales de salud

Descripción de políticas, estrategias y metas

Recomendaciones a los miembros del IMETAF

1. Intercambiar los trabajos, resúmenes, informes de discusión técnica y publicaciones a todos los integrantes del grupo para tener el panorama completo.
2. Colaborar en los Talleres de Epidemiología Molecular de las IETV futuros y promover la inclusión de otros científicos interesados en el problema.
3. Formular sugerencias al IMETAF para mejorar su mandato. Se aceptan críticas, sugerencias, recomendaciones y donaciones de otros grupos.
4. Hacer compromisos para participar en la elaboración de un protocolo conjunto para concretar un proyecto.
5. Empezar a trabajar en estudios colaborativos reunir otros grupos académicos de interés común.
6. Abrir líneas de acción e identificar actividades específicas para incluirlas en el presupuesto/programa de cooperación técnica de la OPSI OMS, con especial énfasis en la promoción del financiamiento con agencias especializadas del Sistema de las Naciones Unidas y hacer las propuestas al Programa Especial de Enfermedades Tropicales (TDWOMS) con la ayuda de la OPS y de los Centros Panamericanos. Presentar propuestas al Programa de Subvenciones de la OPS/OMS.
7. Solicitar el apoyo continuo y orientación a la Directora de IMETAF, doctora Janice Dorman de la Universidad de Pittsburgh. Además, es

indispensable buscar apoyo financiero localmente y en otras instituciones de ayuda externa para el desarrollo.

8. Incluir la Epidemiología Molecular de las IETV en las actividades académicas, la formación de recursos humanos y desarrollo de capacidades de investigación.
9. Conseguir la transferencia de tecnología hacia los países e instituciones en vías de desarrollo por medio de convenios, consorcios y contratos con el sector público y privado.
10. Formular el Plan Maestro sobre Epidemiología Molecular de las IETV con apoyo del IMETAF.

El plan maestro **EMIETV** incluirá los siguientes capítulos:

- Tipificación de las especies de *Trypanosoma* y de *Leishmania* aisladas en personas infectadas en México mediante: a) marcadores de exposición a los agentes parasitarios: pruebas de anticuerpos y pruebas de inmunidad celular, b) marcadores biológicos de los agentes parasitarios: métodos de cultivo, tipificación de aislados (análisis de DNA cromosomal, patrón de restricción de genes ribosomales, secuencia de DNA, análisis de DNA de plásmidos), análisis de proteínas (proteínas membranales e isoenzimas, anticuerpos monoclonales, detección de antígenos, detección de ácidos nucleicos; c) marcadores de susceptibilidad a la infección: susceptibilidad generalizada, susceptibilidad específica,
 - Caracterización de especies y variantes para la búsqueda de mutaciones intraespecie responsables de alta virulencia
 - Establecimiento del Centro de Referencia para el Diagnóstico, tipificación y registro de parásitos, vectores y reservorios dotado de un Banco para Criopreservación de especímenes.
 - Organizar el Programa de Epidemiología Molecular de las Infecciones y Enfermedades Transmitidas por Vectores (IETV), dentro de las estructuras formales del Poder Ejecutivo Federal y Estatal.
 - Promoción del desarrollo de Programas de Prevención y Control de las IETV.
- Definición de los compromisos entre los participantes.
 - Identificación de agencias para el financiamiento y la cooperación técnica.

Referencias

1. WHO Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee. WHO Tech Rep Ser N° 81.1. Geneva 1991.
2. Hernández R. Polimorfismos Genéticos en la Clasificación de *Trypanosoma cruzi*. Departamento de Biología Molecular. Instituto de Investigaciones Biomédicas UMAN.
3. Zavala-Castro JE, Velasco-Castrejón Q, Hernández R. Molecular characterization of Mexican stocks of *Trypanosoma cruzi* using total DNA. Am J Trop Med Hyg 1992;47:201-209.
4. Espinosa Gutiérrez B. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. Importancia de la Caracterización Biológica y Molecular de Aislados Mexicanos de *Trypanosoma cruzi*.
5. Reyes López P. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Enfermedad de Chagas. Experiencia en el Instituto Nacional de Cardiología.
6. Monteón Padilla VM. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Enfermedad de Chagas en el Instituto Nacional de Cardiología.
7. Rosales Encina JL. Departamento de Patología Experimental. CINVESTAV-IPN. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en una comunidad del Estado de Puebla y detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras experimentales por el método de la PCR.
8. Lozano-Kasten F. Hospital General Regional N° 46, IMSS, Guadalajara Jalisco. La epidemiología de una enfermedad regional. La Enfermedad de Chagas en el Estado de Jalisco, México.
9. OPS/OMS- Secretaría de Salud. Informe Técnico de la I Conferencia Interamericana para el Control de la *Leishmaniasis*. Hotel Camino Real, Septiembre de 1994. México, D.F.
10. Gutiérrez J, Maroto MC, Piedrola G, Higuera A. Prevalencia de anticuerpos contra *Leishmania* en drogadictos. Valor de los resultados con 2 técnicas de estudio. Med Clin Barcelona 1993;100(5):168-170.
11. López M, Inga R, Cangalaya M, Echavarría J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arévalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. Am J Trop Med Hyg 1993;49(3):348-356.
12. Bhattacharyya R, Singh R, Hazara TK, Mujumder HK. Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. FEMS Microbiol Lett 1993; 114(1):99-104.
13. Burns JM Jr, Shreffler WG; Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinasin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sa USA. 1993;90(2):775-9.

14. **López Antuñaño F.J.** Sistema Regional de Vacunas (SIReVa/OPS/SSa). Miembro del Comité Científico del IMETAF. La importancia de las enfermedades transmitidas por vectores: *Trypanosomiasis Americana* y Leishmaniosis. En: Vacunas, Ciencia y Salud. Capítulo 43, pág 548. Secretaría de Salud, México 1992
15. **Correa Beltrán MD.** Vacunas contra parásitos humanos. En: Vacunas, Ciencia y Salud. Capítulo 43, pág 548. Secretaría de Salud, México 1992
16. Connell ND, Medina-Acosta E, **McMaster WR**, Bloom BR, **Russell DG.** Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant Bacille Calmette-Guérin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(24):11473-7
17. **Becker I.** Facultad de Medicina UNAM. Detección de variaciones genéticas intraespecie de *Leishmania mexicana* con correlación de cuadros clínicos.
18. Monroy **Ostria A.** Departamento de Inmunología Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN Caracterización de cepas de *Leishmania* aisladas en México por técnicas de biología molecular.
19. **Gorodezky C.** Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos y Coordinadora del Comité Científico del IMETAF. Mecanismos Moleculares de la Susceptibilidad Genética de la Leishmaniosis Cutánea
20. **Ramírez SL.** Secretaría de Salud del Estado de Tabasco. Aspectos epidemiológicos de la Leishmaniosis en el Estado de Tabasco
21. **Andrade Narváez F.J.** Departamento de Inmunología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" (CIR) de la Universidad Autónoma de Yucatán. Epidemiología de la Leishmaniosis Cutánea Localizada (LCL) en el Estado de Campeche.