

## Artículos Originales

### Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela

Néstor Añez<sup>1\*</sup>, Maximiliano Romero<sup>1</sup>, Gladys Crisante<sup>1</sup>, Guillermo Bianchi<sup>2</sup> & Henry Parada<sup>3</sup>

Se presenta la valoración comparativa de 8 técnicas de uso común en el despistaje serológico de la enfermedad de Chagas utilizando muestras de pacientes de diversas procedencias del occidente de Venezuela. En el estudio fueron utilizados métodos serológicos convencionales (TAD, IFI, ELISA) y pruebas de diagnóstico comercialmente expendidas en el país (Pharmatest<sup>®</sup>, Chagatest ELISA<sup>®</sup>, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*<sup>®</sup>, Test ELISA para Chagas III<sup>®</sup> y Chagas Stat Pak<sup>™</sup> Assay<sup>®</sup>). La comparación de los resultados no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de sensibilidad y especificidad de las técnicas evaluadas ( $P > 0.05$ ). Se sugiere, para la obtención de un diagnóstico preciso, la implementación de pruebas de rutina y pruebas confirmatorias. El análisis de la relación costo-beneficio reflejó diferencias entre las técnicas evaluadas, sugiriendo su uso de acuerdo a las condiciones de servicio presentes en cada centro diagnóstico, para lo cual se proponen pruebas candidatas para la rutina y la confirmación diagnóstica. Se demuestra la disminución progresiva de reactividad, con el consecuente incremento de resultados erróneos, en una prueba comercial sometida a sucesivos cambios de temperatura en el tiempo.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, diagnóstico, pruebas serológicas, Venezuela.

#### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, se estima afecta en la actualidad cerca de 8 a 10 millones de personas, siendo uno de los principales problemas de salud pública que confrontan los pobladores de países latinoamericanos (OMS/TDR, 2007). En general, el diagnóstico para la detección de la dolencia se basa en el análisis de variables diversas, entre las cuales destacan la presunción

clínica, los datos epidemiológicos y los resultados de laboratorio, incluyendo pruebas parasitológicas, serológicas, bioquímicas y/o moleculares (López *et al.*, 2000). En relación con el diagnóstico serológico existe consenso en recomendar, al menos, dos técnicas con la finalidad de tener un alto grado de confiabilidad en el despistaje de la dolencia, sugiriéndose una tercera prueba confirmatoria en caso de conflicto de diagnóstico entre ellas (OMS, 2002). Las técnicas más comúnmente utilizadas incluyen, entre otros, procesos de hemaglutinación (HAI), fluorescencia (IFI), Aglutinación (TAD) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Aunado a éstos, recientemente se han desarrollado poderosas herramientas moleculares como la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y otras metodologías serológicas (TESA-blot), las cuales han contribuido a la obtención de un despistaje más certero de la enfermedad de Chagas

<sup>1</sup> Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

<sup>2</sup> Escuela de Estadística, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

<sup>3</sup> Unidad de Cardiología, Hospital "Luis Razetti", Barinas, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: nanes@ula.ve

(Gomes *et al.*, 1999; López *et al.*, 2000; Bulcao & Yasuda, 2003; Umezawa *et al.*, 1996).

En Venezuela, el sero-diagnóstico de la enfermedad de Chagas es comúnmente realizado en centros públicos y privados utilizándose principalmente pruebas expandidas comercialmente por varios laboratorios nacionales y extranjeros, la mayoría de los cuales están basados en ensayos inmunoenzimáticos cualitativos (Vielma, 2005). En este respecto, algunos investigadores han informado sobre resultados inconsistentes registrados en pacientes diagnosticados en estos centros, cuando se comparan con los obtenidos en laboratorios especializados en el estudio de la enfermedad de Chagas (Díaz-Bello *et al.*, 2008). Esta información parece corroborarse en nuestro laboratorio donde se ha detectado que diagnósticos provenientes de laboratorios privados, arrojan falsos positivos cuando se cotejan con pruebas específicas.

En el presente estudio se evalúan simultáneamente métodos serológicos usados de forma rutinaria en el despistaje de la enfermedad de Chagas en Venezuela, con la finalidad de detectar técnicas confiables para el diagnóstico preciso en muestras de pacientes de áreas endémicas las cuales, a su vez, resulten de utilidad general y corrijan la inconsistencia diagnóstica registrada en algunos centros.

## MATERIALES Y METODOS

### *Muestreo y grupos de estudio*

Un total de 48 muestras de sueros fueron seleccionadas mediante un muestreo aleatorio simple de un contingente de 200 pacientes de diferente procedencia y condición clínica, diagnosticados previo al estudio. Este número de muestras garantiza que pueda estimarse la sensibilidad y especificidad de las pruebas con un error tolerable  $< 0,125$ , asumiendo un  $\alpha=0,05$  (Cochran, 1985). Las muestras fueron divididas en cuatro grupos y empleadas para el cotejo de pruebas serológicas usadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas. El grupo I (PCC1-PCC21) estuvo conformado por muestras de sueros escogidos de pacientes (12 mujeres y 9 hombres; 48+16 años) controlados en la unidad de cardiología del Hospital "Luis Razetti", estado Barinas-Venezuela, siendo la mayoría de ellos pacientes chagásicos y algunos (4) con cardiopatía de otra etiología. El grupo II (PChRE) estuvo conformado por 10 muestras de

sueros seleccionadas del total de pacientes chagásicos crónicos diagnosticados parasitológica, serológica y/o molecularmente en el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Mérida-Venezuela, provenientes de diversas localidades endémicas de los estados Barinas, Trujillo y Mérida (Venezuela). Los pacientes (7 mujeres y 3 hombres) registraron una edad promedio de 31+22 años y habían sido monitoreados serológicamente desde cuando presentaron la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Del total correspondiente a este grupo 8 recibieron tratamiento durante la fase aguda. El grupo III (PBSSP) constituido por 6 muestras de sueros de pacientes seropositivos a *T. cruzi* fueron previamente diagnosticados por pruebas serológicas comerciales en el banco de sangre del Hospital "Luis Razetti" del estado Barinas. El grupo IV (PBSSN) considerado como control negativo, estuvo conformado por 11 muestras de sueros de individuos seronegativos a *T. cruzi* previamente diagnosticados en el banco de sangre del Hospital "Luis Razetti" del estado Barinas y procedentes de diversas localidades de este estado donde la enfermedad de Chagas es endémica. Para los grupos III y IV no fueron obtenidos los datos de distribución por edad o géneros de los pacientes y fueron manejados mediante códigos utilizados en la institución donante, ignorándose su condición hasta el final del estudio. Detalles sobre los componentes de cada grupo valorado serológicamente, incluyendo su condición clínica, se presentan en la Tabla I.

El protocolo de estudio fue previamente aprobado por la comisión de ciencias médicas profesionales del Consejo de Desarrollo Científico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela y el comité de bioética y biomedicina del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología, Caracas, Venezuela. En cada oportunidad todo paciente muestreado por los autores les fue solicitada la firma de un consentimiento previa información, requerimiento exigido por el comité de bioética del FONACIT, el cual reposa en nuestro laboratorio.

### *Selección y procedimientos de pruebas serológicas evaluadas*

Los métodos serológicos convencionales utilizados para detectar anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* incluyeron las pruebas de aglutinación directa (TAD), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), siguiendo procedimientos

**Tabla I. Composición de grupos de pacientes valorados serológicamente para el despistaje de la enfermedad de Chagas.**

| Código  | Serología con métodos convencional |     |       |            | Serología con Kits comerciales |                                    |                            |                |         | Condición clínica |
|---------|------------------------------------|-----|-------|------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------|----------------|---------|-------------------|
|         | TAD                                | IFI | ELISA | Pharmatest | Chagatest ELISA                | Chagatest ELISA Recombinante V.3.0 | Test ELISA para Chagas III | Stat Pak Assay |         |                   |
| PCC1    | Neg                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Neg                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC2    | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC3    | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC4    | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC5    | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC6    | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC7    | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC8    | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | MOE     |                   |
| PCC9    | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | MOE     |                   |
| PCC10   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC11   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC12   | Neg                                | Neg | Neg   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC13   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC14   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC15   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC16   | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | MOE     |                   |
| PCC17   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC18   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC19   | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC20   | Neg                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PCC21   | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | MOE     |                   |
| PChRE1  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PChRE2  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Neg                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PChRE3  | Neg                                | Pos | Pos   | Neg        | Pos                            | Pos                                | Neg                        | Pos            | MChc    |                   |
| PChRE4  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PChRE5  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc    |                   |
| PChRE6  | Neg                                | Pos | Pos   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | MChc    |                   |
| PChRE7  | Neg                                | Pos | Pos   | Pos        | Neg                            | Pos                                | Pos                        | Neg            | MChc    |                   |
| PChRE8  | Neg                                | Pos | Pos   | Pos        | Neg                            | Pos                                | Pos                        | Neg            | MChc    |                   |
| PChRE9  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | MChc*   |                   |
| PChRE10 | Pos                                | Pos | Pos   | Neg        | Nd                             | Pos                                | Neg                        | Neg            | MChc*   |                   |
| PBSSP1  | Neg                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | All     |                   |
| PBSSP2  | Pos                                | Neg | Pos   | Neg        | Pos                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | All     |                   |
| PBSSP3  | Neg                                | Pos | Neg   | Neg        | Pos                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | All     |                   |
| PBSSP4  | Neg                                | Neg | Pos   | Neg        | Pos                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | All     |                   |
| PBSSP5  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | All     |                   |
| PBSSP6  | Pos                                | Pos | Pos   | Pos        | Pos                            | Pos                                | Pos                        | Pos            | All     |                   |
| PBSSN1  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN2  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN3  | Neg                                | Pos | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN4  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN5  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN6  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN7  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN8  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN9  | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN10 | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| PBSSN11 | Neg                                | Neg | Neg   | Neg        | Neg                            | Neg                                | Neg                        | Neg            | Control |                   |
| Total   | 48                                 | 48  | 48    | 48         | 47                             | 48                                 | 48                         | 48             |         |                   |

MChc: Miocarditis chagásica crónica; \*: Paciente no tratado; All: Asintomático con infección inaparente (según Añez *et al.*, 2001); MOE: Miocarditis otra etiología.

previamente publicados (Vattuone & Yanovsky, 1971; Camargo, 1966; Voller *et al.*, 1975). Las condiciones y procedimientos de estos métodos han sido indicados en previas publicaciones (Añez *et al.*, 1999a,b; 2001). Las pruebas serológicas denominadas comerciales incluyeron los tests inmunoenzimáticos Pharmatest® (Laboratorios Pharmatest, Miranda-Venezuela); Chagatest ELISA® (Laboratorios Wiener, Rosario-Argentina); Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® (Laboratorios Wiener, Rosario-Argentina); Test ELISA para Chagas III® (Laboratorios BiosChile, Santiago-Chile); y el ensayo inmunocromatográfico comercial Chagas stat-pak assay® (Laboratorios Chembio, New York-USA). Cada prueba fue ejecutada e interpretada según indicaciones del fabricante.

#### *Criterio diagnóstico*

Las muestras evaluadas por metodologías convencionales fueron consideradas sero-positivas cuando mostraron títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* > 1:64 para TAD e IFI y absorbancia óptica > 0.4 para ELISA. Los pacientes fueron declarados positivos a la infección por *T. cruzi* cuando mostraron reactividad en, al menos, 2 de los 3 métodos serológicos convencionales utilizados. Se consideraron sero-positivos a *T. cruzi* por los tests inmunoenzimáticos comercial Pharmatest®, Chagatest ELISA®, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® y Test ELISA para Chagas III®, las muestras con absorbancias mayores del 10% del punto de corte, determinado según indicaciones del fabricante. Por su parte, utilizando el kit inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay® (Chembio) fueron declarados sero-positivos a *T. cruzi* muestras que revelaran una banda rosapúrpura en el área “test” y en el área “control” de la tira empleada indicada en el estuche del kit.

#### *Análisis estadístico*

Los parámetros correspondientes a la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), razón de verosimilitud positiva (RVP) y razón de verosimilitud negativa (RVN) fueron estimados a partir de las ecuaciones convencionales descritas por Altman & Bland (1994). Los intervalos del 95% de confianza de los estimadores de la sensibilidad y la especificidad fueron determinados con ecuaciones correspondientes a intervalos de proporciones según Wayne (2002). Por su parte, para la estimación de los intervalos de

confianza de VPP, VPN, RVP y RVN, fue utilizado un Bootstrap con 10.000 interacciones siguiendo a Bradley (1987).

#### *Registro de reactividad de un antígeno comercial*

Con la finalidad de detectar el efecto de cambios de temperaturas en el tiempo sobre un antígeno utilizado en el despistaje serológico de la enfermedad de Chagas, la prueba serológica comercial Test ELISA para Chagas III® (BiosChile) fue sometida a sucesivos cambios de 8°C a 22°C cada 20 días, durante un lapso de 90 días. El efecto de los cambios fue evaluado en muestras de pacientes previamente diagnosticados como positivos o negativos a *T. cruzi*, ejecutándose la prueba cada vez que el antígeno era llevado a 22°C. El procedimiento fue realizado siguiendo de forma estricta las indicaciones de ejecución e interpretación de resultados especificada por el fabricante como se indicó anteriormente.

## RESULTADOS

#### *Detección de seropositividad a Trypanosoma cruzi en pacientes valorados utilizando diferentes métodos diagnósticos*

Un total de 8 pruebas serológicas comúnmente utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Venezuela fueron evaluadas en el presente estudio en tres grupos de pacientes chagásicos y su correspondiente control negativo. En las muestras de pacientes chagásicos controlados en una unidad cardiológica (grupo I) la seropositividad detectada osciló desde 67% con la prueba de TAD hasta 81% con las pruebas Pharmatest, Chagatest ELISA, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® y Chagas Stat-Pak® (Tabla II). Muestras de pacientes chagásicos controlados en un laboratorio especializado (Grupo II) revelaron valores de sero-positividad entre 60% con las pruebas TAD y Chagas Stat-Pak y el 100% en aquellas procesadas con las técnicas IFI y ELISA convencionales (Tabla II). En los sueros procedentes de banco de sangre (Grupo III) fue detectada una alta sero-positividad con el método Chagatest ELISA® (100%), el mismo utilizado en ese centro, y con la técnica de ELISA convencional (83%). El resto de las pruebas arrojaron valores relativamente bajos (Tabla II). El grupo control negativo (IV) arrojó los resultados esperados. En la Tabla II se dan detalles sobre los resultados obtenidos.

**Tabla II. Seropositividad detectada en grupos de pacientes valorados con pruebas comúnmente utilizadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas.**

| Grupo | N° */ (%) de muestras de pacientes seropositivos |                |                |               |                 |                                    |                            |                 |
|-------|--|----------------|----------------|---------------|-----------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------|
|       | TAD  | IFI            | ELISA          | Pharmatest    | Chagatest ELISA | Chagatest ELISA Recombinante V.3.0 | Test ELISA para Chagas III | Chagas Stat-Pak |
| I     | 14/21<br>(67)                                    | 16/21<br>(76)  | 16/21<br>(76)  | 17/21<br>(81) | 17/21<br>(81)   | 17/21<br>(81)                      | 16/21<br>(76)              | 17/21<br>(81)   |
| II    | 6/10<br>(60)                                     | 10/10<br>(100) | 10/10<br>(100) | 7/10<br>(70)  | 6/9<br>(67)     | 8/10<br>(80)                       | 7/10<br>(70)               | 6/10<br>(60)    |
| III   | 3/6<br>(50)                                      | 4/6<br>(67)    | 5/6<br>(83)    | 3/6<br>(50)   | 6/6<br>(100)    | 3/6<br>(50)                        | 3/6<br>(50)                | 3/6<br>(50)     |
| IV    | 0/11<br>(0)                                      | 1/11<br>(9)    | 0/11<br>(0)    | 0/11<br>(0)   | 0/11<br>(0)     | 0/11<br>(0)                        | 0/11<br>(0)                | 0/11<br>(0)     |

\*Numerador: Pruebas positivas. Denominador: Pruebas realizadas

#### *Valoración comparativa entre métodos de diagnóstico serológico en pacientes chagásicos*

La evaluación comparativa de la sensibilidad detectada entre los diferentes métodos serológicos convencionales ensayados en el presente trabajo, reveló valores de 77% para la prueba TAD y 100% para las pruebas IFI y ELISA y sobre el 85% en los restantes tests comerciales utilizados. La comparación estadística de la sensibilidad entre los métodos ensayados no arrojó diferencias significativas ( $P>0.05$ ). En relación con la variable especificidad, valores similares fueron detectados en los diferentes métodos comparados con un rango que osciló entre 68% para Chagatest ELISA y 86% para TAD. Similar a lo observado en la variable sensibilidad, los valores de especificidad tampoco

arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas ( $P>0.05$ ). Detalles particulares sobre cada método se muestran en la Tabla III.

La estimación de los valores predictivos positivos (VPP) permitió, en general, detectar cifras superiores al 85% en la mayoría de los métodos serológicos, lo cual sugiere que las pruebas utilizadas tienen estadísticamente alta probabilidad de detectar las muestras seropositivas. Esta similitud se mantiene cuando se comparan los valores de razón de verosimilitud positiva (RVP), es decir, cuantas veces más probable es la detección de un seropositivo. En este caso los mayores valores obtenidos oscilaron entre 4,40 (IFI, ELISA) y 5,64 (TAD), resultando el método menos confiable el Chagatest ELISA® el cual arrojó un valor de RVP de 2,77. Detalles sobre la

**Tabla III. Evaluación estadística comparativa de pruebas serológicas empleadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas en el occidente de Venezuela.**

| Parámetro                       | TAD  | IFI  | ELISA | Pharmatest | Chagatest ELISA | Chagatest ELISA Recombinante V3.0 | Test ELISA para Chagas III | Chagas Stat -Pak |
|---------------------------------|------|------|-------|------------|-----------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------|
| Sensibilidad                    | 0,77 | 1,00 | 1,00  | 0,88       | 0,88            | 0,92                              | 0,85                       | 0,85             |
| Especificidad                   | 0,86 | 0,77 | 0,77  | 0,82       | 0,68            | 0,82                              | 0,82                       | 0,82             |
| Valor Predictivo Positivo       | 0,87 | 0,84 | 0,84  | 0,85       | 0,76            | 0,86                              | 0,85                       | 0,85             |
| Valor Predictivo Negativo       | 0,76 | 1,00 | 1,00  | 0,86       | 0,83            | 0,90                              | 0,82                       | 0,82             |
| Razón de Verosimilitud Positiva | 5,64 | 4,40 | 4,40  | 4,87       | 2,77            | 5,08                              | 4,65                       | 4,65             |
| Razón de Verosimilitud Negativa | 0,27 | 0,00 | 0,00  | 0,14       | 0,18            | 0,09                              | 0,19                       | 0,19             |

comparación estadística de variables entre los métodos son presentados en la Tabla III.

*Relación costo-beneficio de las técnicas serológicas evaluadas*

Siguiendo parámetros similares a los señalados por Bulcao & Yasuda (2003) en el presente trabajo se detectó que los menores requerimientos en equipo, recurso humano especializado e infraestructura fueron precisados para la prueba de TAD y el kit de diagnóstico inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay®. En relación con el tiempo de ejecución, los métodos más rápidos fueron el kit inmunocromatográfico (Chagas Stat Pak Assay®) e inmunoenzimáticos comerciales con un rango de 15 minutos a 2 horas, mientras que los más consumidores de tiempo fueron las técnicas serológicas convencionales (TAD, IFI y ELISA). Al considerar el costo por prueba, los métodos más costosos resultaron los kits de diagnóstico serológico comerciales Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® y Chagas Stat Pak Assay®, con estimados entre Bs.F. 38,5 (USA \$ 17,90) y Bs.F. 40 (USA \$ 18,6) por muestra respectivamente. Las pruebas más económicas fueron las técnicas serológicas convencionales (TAD, IFI, ELISA) y los kits de diagnóstico serológico comerciales Pharmatest®, Chagatest ELISA® y Test ELISA para Chagas III®. Los costos incluyeron estimaciones de gastos operativos, equipos y reactivos para finales del año 2009. Detalles sobre la relación costo-beneficio se muestran en la Tabla IV.

*Pérdida de reactividad en pruebas diagnósticas*

El efecto de sucesivos cambios de temperatura en el tiempo sobre los resultados obtenidos con un kit serológico comercial (Test ELISA para Chagas III®-BiosChile) fue evaluado en 99 muestras de sueros de individuos previamente diagnosticados por otros métodos como seropositivos o seronegativos a *T. cruzi*. Los resultados revelaron que los rangos de densidades ópticas entre muestras de pacientes seropositivos o seronegativos a *T. cruzi*, fueron disminuyendo progresivamente en el tiempo. Este hecho reveló el acercamiento de los valores de seropositivos y los seronegativos, incrementando el número de muestras con un resultado impreciso, determinado por valores cercanos al 10% del punto de corte recomendado, según especificaciones de los fabricantes del test. Detalles sobre el resultado comparativo en el tiempo se muestran en la Fig. 1, en la cual se nota que la reactividad del antígeno se mantiene por alrededor de 30 días cuando se somete a cambios de temperatura entre 8°C y 22°C.

DISCUSION

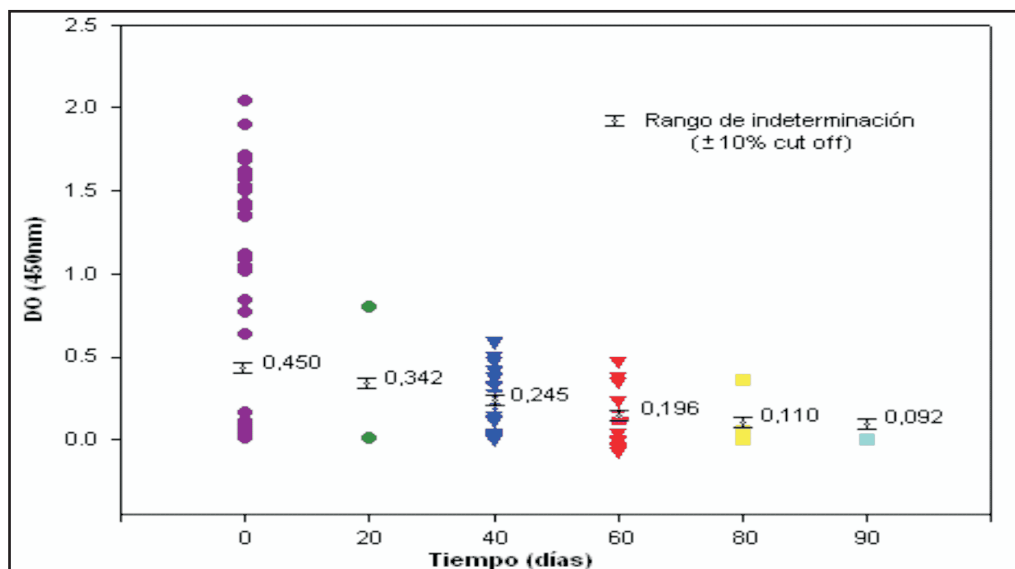
En el presente trabajo todos los métodos seleccionados para la detección de seropositividad a *T. cruzi* en muestras de pacientes escogidos aleatoriamente fueron capaces de detectar tal condición, cumpliendo con los requisitos aquí establecidos. Este propósito se refleja en el análisis de los resultados obtenidos, el cual reveló valores de sensibilidad y especificidad

**Tabla IV. Relación costo-beneficio de métodos serológicos usados en el despistaje de la enfermedad de Chagas en Venezuela.**

| Métodos                                      | Costo estimado/<br>prueba |          | Requerimientos |                                 |                              |   |
|--|---------------------------|----------|----------------|---------------------------------|------------------------------|---|
|  | Bs.F.                     | (USA \$) | Equipo         | Recurso humano<br>especializado | Infraestructura<br>requerida | Tiempo estimado para<br>obtener resultado |
| TAD  | 30,0                      | (13,9)   | Bajo           | Moderado                        | Bajo                         | 24 horas                                  |
| IFI  | 31,0                      | (14,4)   | Moderado       | Alto                            | Moderado                     | 6 horas                                   |
| ELISA  | 32,0                      | (14,8)   | Moderado       | Moderado                        | Moderado                     | 8 horas                                   |
| Pharmatest                                   | 32,2                      | (14,9)   | Moderado       | Moderado                        | Moderado                     | 2 horas                                   |
| Chagatest ELISA                              | 32,8                      | (15,3)   | Moderado       | Moderado                        | Moderado                     | 2 horas                                   |
| Chagatest ELISA<br><i>Recombinante V.3.0</i> | 38,5                      | (17,9)   | Moderado       | Moderado                        | Moderado                     | 2 horas                                   |
| Test ELISA para Chagas III                   | 32,8                      | (15,3)   | Moderado       | Moderado                        | Moderado                     | 2 horas                                   |
| Chagas Stat-Pak Assay                        | 40,0                      | (18,6)   | Bajo           | Bajo                            | Bajo                         | 15 minutos                                |



**Fig.1. Efectos de sucesivos cambios de temperatura sobre la reactividad de una prueba de diagnóstico serológico.**



cercanas al 100% en casi todas las técnicas evaluadas. Asimismo, el análisis estadístico comparativo no reveló diferencias significativas entre ellas, lo cual pareciera indicar que cualquiera de las técnicas podrían ser de utilidad para llevar a cabo el diagnóstico serológico en individuos sospechosos de padecer infección por *T. cruzi*. Por otra parte, este hecho pareciera simplificar la escogencia para implementar la ejecución de más de un método para realizar un diagnóstico serológico de certeza en la enfermedad de Chagas. En este caso, la primera prueba a ser implementada, la cual puede considerarse como prueba de rutina, debería caracterizarse por poseer alta sensibilidad permitiendo detectar los casos sospechosos de infección. Esta propuesta coincide con una similar de previos autores (Enciso *et al.*, 2004., Avila *et al.*, 1993) y corrobora la opinión de otros quienes sostienen que la misma podría resultar particularmente importante en bancos de sangre, evitando transmisiones de *T. cruzi* por la vía transfusional (Krauts *et al.*, 1995., Affrachino *et al.*, 1989). La segunda prueba a ser implementada o prueba confirmatoria debería garantizar una alta especificidad, permitiendo discriminar entre reacciones cruzadas ocurridas con otras infecciones, evitando así alarmas innecesarias a causa de un falso resultado positivo. Si existiera discordancia entre ambas pruebas, debería ejecutarse una tercera técnica diagnóstica, tal como ha sido sugerido para estudios epidemiológicos en áreas de Colombia y Venezuela donde la enfermedad

de Chagas es endémica (Guhl *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 1999a).

Siguiendo las sugerencias anteriormente mencionadas, y basados en el análisis de los resultados obtenidos en este estudio, los métodos serológicos convencionales IFI y ELISA, los cuales arrojaron un 100% de sensibilidad, así como 3 de los kits de diagnóstico serológico comerciales (Pharmatest®, Chagatest ELISA® y Chagatest ELISA Recombinante V.3.0®) con valores de sensibilidad entre 88% y 92%, pudieran proponerse como pruebas de rutina, mientras que las pruebas comerciales (Pharmatest, Chagatest ELISA Recombinante V.3.0®, test ELISA para Chagas III y Chagas Stat Pak Assay®) además de la prueba convencional TAD, las cuales arrojaron especificidad de 82% y 86% respectivamente, podrían ser utilizadas como métodos confirmatorios para el diagnóstico serológico. Esta propuesta pareciera corresponderse en parte, con la práctica rutinaria de diagnóstico serológico en Venezuela, considerando que los kits serológicos comerciales Pharmatest® y Chagatest ELISA® se encuentran entre las pruebas más usadas para realizar el despistaje de la enfermedad de Chagas en el país (Vielma, 2005). No obstante esto, fue la prueba Chagatest ELISA la que arrojó el menor valor de RVP en el análisis estadístico realizado. Esto indica que la mencionada técnica presenta una mayor probabilidad de generar resultados erróneos. En

consecuencia, se recomienda que en centros donde se emplee esta prueba, debería haber un estricto control de calidad antes de emitir algún resultado diagnóstico de pacientes que resulten seropositivos, lo cual podría lograrse implementando la ejecución de alguna de las pruebas confirmatorias sugeridas aquí (Pharmatest, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*®, Test ELISA para Chagas III, Chagas Stat Pak Assay® y TAD).

El análisis comparativo de la relación costo-beneficio entre las pruebas ensayadas, indicó que los métodos con menores requerimientos en equipos, personal e infraestructura fueron la técnica de aglutinación directa (TAD) y el kit de diagnóstico inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay®. Considerando los bajos requerimientos de la técnica de aglutinación directa (TAD) sumado a su relativamente alta sensibilidad y a su alta especificidad y bajo costo, podría sugerirse su uso potencial como prueba de rutina a ser implementada en áreas rurales donde no se cuenta con infraestructura adecuada ni equipos requeridos para ejecutar los complejos protocolos de la mayoría de las técnicas empleadas en el despistaje de la enfermedad de Chagas, lo cual coincide con previas recomendaciones (Roddy *et al.*, 2008; Wendel & Gonzaga, 1993). Además de esto, el kit de diagnóstico inmunocromatográfico comercial Chagas Stat Pak Assay® resultaría, a pesar de su relativamente alto costo unitario, ideal en centros públicos y privados, rurales y urbanos del país por su eficiencia como prueba de alta especificidad y bajos requerimientos, ofreciendo ventajas para ser utilizada en estudios poblacionales de levantamientos epidemiológicos, dada la facilidad para obtener resultados in situ en pocos minutos, sin requerir personal especializado (Luquetti *et al.*, 2003; Ponce *et al.*, 2005).

A pesar de los requerimientos, las técnicas basadas en ELISA presentan la posibilidad de automatización simplificando su ejecución y permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras en cortos periodos de tiempo (Wendel & Gonzaga, 1993; Knecher *et al.*, 1994; Guhl *et al.*, 2002). Adicionalmente, estas técnicas en formato cuantitativo podrían eliminar la subjetividad característica de la mayoría de las pruebas serológicas (Zicker *et al.*, 1991). Por estas razones, y dada su alta sensibilidad, las técnicas basadas en ELISA resultan particularmente útiles como pruebas de rutina en centros públicos y privados del país, en especial en aquellos donde se requiera el procesamiento de un gran número de muestras diarias, como ocurre en

bancos de sangre de centros hospitalarios, opinión esta compartida con previos autores (Winkler *et al.*, 1995; Guhl *et al.*, 2002).

La prueba diagnóstica con mayores requerimientos en equipos, personal e infraestructura fue la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Aún así, algunos autores señalan que esta técnica es tradicionalmente usada dada su alta sensibilidad (Oelemann *et al.*, 1998; Malan *et al.*, 2006) lo cual se corrobora en el presente estudio. Sin embargo, su uso se ha restringido a laboratorios debidamente equipados con microscopios de fluorescencia, requiriéndose para su ejecución de técnicos capacitados, ya que la interpretación de los resultados por personal inexperto puede llegar a ser cuestionable (Malan *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 1989). Por estas razones, la técnica de IFI se recomienda sólo como prueba de rutina en centros especializados, para los casos en los que se requiera determinar la fase de la infección chagásica en individuos en los que se deba tomar la decisión de aplicar algún tratamiento tripanocida (Camargo *et al.*, 1986; Luquetti & Rassi, 2000; Añez *et al.*, 2001).

Otro aspecto valorado en el presente trabajo fue la demostración de la pérdida de reactividad de un test comercial (Test ELISA para Chagas III®-BiosChile) luego de haber sido sometido a sucesivos cambios de temperatura por cortos periodos de tiempo. Como resultado fue detectado un progresivo estrechamiento entre las densidades ópticas de los sueros de pacientes seropositivos y seronegativos con el consecuente aumento de diagnósticos erróneos o inconsistentes. La razón de la escasa o nula reactividad pudiera deberse a la pérdida de estabilidad y la consecuente degradación del antígeno como consecuencia de los shock térmicos recibidos en el tiempo, argumento este compartido con De Lima *et al.* (2001) en sistemas inmunodiagnósticos aún tratados con inhibidores de proteasas. Estos hallazgos plantean la necesidad de que cada prueba empleada en el despistaje de la enfermedad de Chagas en centros públicos y/o privados sea ejecutada en su totalidad en un tiempo breve, con la finalidad de garantizar un resultado confiable en la detección de la infección chagásica.

En conclusión, tomando en consideración los aspectos analizados en el presente estudio, podría proponerse una combinación de pruebas candidatas a ser utilizadas como técnicas de rutina y/o métodos confirmatorios de acuerdo a las condiciones presentes



en cada centro diagnóstico. Así para centros localizados en poblaciones rurales con escaso equipamiento e infraestructura y carentes de personal formado, se sugiere la utilización de técnicas sencillas en su ejecución y que a la vez tengan alta sensibilidad/especificidad, bajo costo y reflejen resultados en corto tiempo. En este caso alguna de las pruebas comerciales como Pharmatest®, Chagatest ELISA *Recombinante V.3.0*® o la prueba convencional TAD, pudieran ser seleccionadas como método diagnóstico de rutina, combinándola con una prueba de alta especificidad y corto tiempo de ejecución como el método Chagas stat-pak® como prueba confirmatoria. Otra opción mas económica pudiera ser la combinación de una de las mencionadas pruebas comerciales como rutina y la TAD convencional como confirmatoria dada su alta especificidad. Por otra parte, para centros bien equipados donde se procesa un gran número de muestras las pruebas formato ELISA podrían considerarse como rutinarias, pudiéndose confirmar con el test Chagas stat-pak® o con IFI o ELISA convencional, dependiendo del nivel de equipamiento. Finalmente, para estudios poblacionales y evaluaciones epidemiológicas in situ, se sugiere la utilización del test Chagas stat-pak® assay de Chembio, el cual además de registrar resultados inmediatos, arroja alta especificidad (82%) y alto valor predictivo positivo (85%) y alta razón de verosimilitud positiva (4,65) estadísticos que la definen como prueba excelente para detección de prevalencia nacional.

#### AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por los proyectos FONACIT G-2005000370 (NA), G-2005000387 (ON) y G-2006000457 (NA). Los autores agradecen al Dr. Rafael Rangel-Aldao su diligente ayuda en conseguir la donación de la prueba Chagas Stat Pak Assay®. Nuestro agradecimiento al personal del Banco de Sangre del Hospital "Luis Razetti", Barinas, por su colaboración, a la coordinación de salud del estado Barinas por la donación del Pharmatest y a los pacientes chagásicos por su comprensión.

#### Comparative evaluation of serologic diagnostic tests used to detect Chagas disease in Venezuela

#### SUMMARY

The comparative evaluation of conventional serologic methods (DAT, IFAT, ELISA) and commercial

tests (Pharmatest®, Chagatest ELISA®, Chagatest ELISA *Recombinant V.3.0*®, Test ELISA for Chagas III®, Chagas stat pak™ assay®) commonly used to detect Chagas disease is presented. Sera samples were taken from chagasic patients and controls from different rural localities of western Venezuela. Statistical comparison of the sensitivity and specificity level, revealed no-significant differences among methods ( $P > 0.05$ ). To warrant a secure sero-diagnosis the implementation of a routine and a confirmatory test is suggested. The cost-benefit analysis showed significant differences among methods, suggesting its use according to the condition of each diagnostic center. Considering the results obtained in the present study a combination of candidate tests is proposed to be used either as a routine or confirmatory method according to the circumstances. The effect of thermo-shock on the loss of reactivity of a commercial test is demonstrated.

**Key words:** Chagas disease, diagnostic, serologic tests, Venezuela.

#### REFERENCIAS

- Affrachino J. L., Ibañez C. F., Luquetti A. O., Rassi A., Reyes M. B., Macina R. A., Aslund L., Petterson U. & Frasc A. C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 221-228.
- Altman D. G. & Bland M. (1994). Statistic Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *B. M. J.* **308**: 1552.
- Andrade A. L., Martelli C. M., Pinheiro E. D., Santana C. L., Borges E. P. & Zicker F. (1989). Rastreamento sorológico para doenças infecciosas em banco de sangue como indicador de morbidade populacional. *Rev. Saud. Públ. São Paulo.* **23**: 20-25.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., Gonzalez N., Ramirez J. L., Guevara P., Rivero, C., Borges R. & Scorza J. V. (1999<sup>a</sup>). Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am. J. Med. Hyg.* **60**: 215-222.
- Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., Fuenmayor C., Gonzalez N., Percoco G.,

- Borges R., Guevara P. & Ramirez J. L. (1999b). Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 726-732.
- Añez N., Crisante G., Rojas A., Carrasco H., Parada H., Yepez Y., Borges R., Guevara P. & Ramirez J. L. (2001). Detection and significance of inapparent infections in Chagas disease in western Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 227-232.
- Avila H. A., Pereira J. B., Theimann O., Paiva E., Degrave W., Morel C. M. & Simpson L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2421-2426.
- Bradley, E. (1987). Better Bootstrap Confidence Intervals. *J. Am. Stat. Assoc.* **82**: 171-185.
- Bulcao A. A. & Yasuda S. A. (2003). Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura a reação em cadeia da polimerasa. *Rev. Saúde. Pública.* **37**: 107-115.
- Camargo M. E. (1966). Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Chagas disease. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* **8**: 227-234.
- Camargo M. E., Segura E. L., Kagan I. G., Souza J. M., Carvalheiro J. R., Yanovsky J. F. & Guimarães M. C. (1986). Collaboration on the standardization of Chagas disease in the Americas: an appraisal. *PAHO Bull.* **20**: 233-244.
- Cochran, W. G. (1985). *Técnicas de muestreo*. CECSA, México.
- De Lima A. R., Fariás M. N., Tortolero E., Navarro M. C. & Contreras V. T. (2001). Purificación parcial y empleo de fracciones glicosídicas de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Cient. Venezol.* **52**: 235-247.
- Díaz-Bello Z., Zavala R., Díaz M., Mauriello L., Maekelt A. & Alarcón B. (2008). Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos de bancos de sangre en Venezuela. *Invest. Clín.* **49**: 141-150.
- Enciso C., Montolla M., Santacruz M. M., Nicholls R. S., Rodriguez A., Marcano M. & Puerta C. (2004). Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. *Biomédica.* **24**: 104-108.
- Gomes M. L., Galvao L. M., Macedo A. M. & Peña S. D. (1999). Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 205-210.
- Guhl F., Jaramillo C., Carranza J. C. & Vallejo G. A. (2002). Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Arch. Med. Research.* **33**: 362-370.
- Knecher L. M., Rojkin L. F., Capriotti G. A. & Lorenzo L. E. (1994). Chagas' disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. *Int. J. Parasitol.* **24**: 207-211.
- Krauts G. M., Galvao L. M., Cancado J. R., Guevara-Espinosa A., Ouaisi A. & Krettli A. U. (1995). Use of a 24-Kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2086-2090.
- López F. J., Flores H. R. & Ramos C. (2000). Diagnosis of Chagas' disease. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **42**: 121-129.
- Luquetti O. & Rassi A. (2000). Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. P. 344-378. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds.: Z. Brener, Andrade, Z. A., & Barral-Neto, M. 2nd ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Luquetti A. O., Ponce C., Ponce E., Esfandiari J., Schijman A., Revollo S., et al. (2003). Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnos. Microbiol. Infectio. Dis.* **46**: 265-271.

- Malan A., Avelar E., Litwin S. E., Hill H. R. & Litwin C. M. (2006). Serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi*: evaluation of three enzyme immunoassays and an indirect immunofluorescent assay. *J. Med. Microbiol.* **55**: 171-178.
- Oelemann W. M., Teixeira M. D., Verissimo G. C., Borges-Pereira J., De Castro J. A., Coura J. R. & Peralta J. M. (1998). Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2423-2427.
- OMS (2002). *Control of Chagas disease*. Technical report series. Report 905. WHO expert Committee, Geneva, Switzerland.
- OMS/TDR (2007). *Reporte del Grupo de Trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas*. Eds.: Guhl F. & Lazdins-Helds J. 17-20 de Abril 2005, actualizado en Julio 2007.
- Ponce C., Ponce E., Vinelli E., Montoya A., de Aguilar V., Gonzalez A., et al. (2005). Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease in blood donors and patients in Central America. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5065-5068.
- Roddy P., Goiri J., Flevaud L., Palma P. P., Morote S., Lima N., et al. (2008). Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. *J. Clin. Microbiol.* **46**: 2022-2027.
- Umezawa E., Nascimento M. S., Kesper N., Coura J. R., Borges-Pereira J., Junqueira A. C. & Camargo M. E. (1996). Immunoblot assay using excreted-secret antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2143-2147.
- Vattuone N. H. & Yanovsky J. F. (1971). Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. *Exp. Parasitol.* **30**: 349-355.
- Vielma J. R. (2005). *Diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizando como antígeno la proteína recombinante de 24kDa (Pgr24)*. Tesis doctoral Postgrado interdisciplinario en biología celular. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.
- Voller A., Draper C., Bidwell D. & Bartleti A. (1975). Microplate enzyme-linked-immunosorbent assay for Chagas disease. *The Lancet.* **1**: 426-428.
- Wendel S. & Gonzaga A. L. (1993). Chagas' disease and blood transfusion: A new World problem?. *Vox Sang.* **64**: 1-12.
- Wayne D. W. (2002). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Ed. Limusa Wiley, Mexico
- Winkler M. A., Bracear R. J., Hall H. J., Schur J. D. & Pan A. A. (1995). Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of supplemental enzyme immunoassay and seroreactivity. *Transfusion.* **35**: 219-225.
- Zicker F., Smith P. G., Luquetti A. O. & Oliveira O. S. (1991). Detección de infectados con *Trypanosoma cruzi* mediante inmunofluorescencia, ELISA y hemoaglutinación en sueros y eluidos de sangre seca. *Bol. Sanit. Panam.* **110**: 489-498.

Recibido el 04/09/2009  
Aceptado el 28/06/2010

