**Concordancia entre dos pruebas inmunodiagnósticas para la detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Trypanosoma cruzi* en eluídos sanguíneos humanos**

**Agreement between two immunodiagnostic tests to detect IgG antibodies anti-*Trypanosoma cruzi* in human blood eluates**

Ana Elvira Farfán García1, Yeny Zulay Castellanos Domínguez1, Katherine Paola Luna Marín1, Víctor Manuel Angulo Silva1

1. Universidad Industrial de Santander -UIS-. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales -CINTROP-
2. Autor responsable de correspondencia: Yeny Zulay Castellanos Domínguez. Universidad Industrial de Santander -UIS-. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales -CINTROP- Km 2 Vía Refugio, Piedecuesta, Santander, Colombia. Correo electrónico: [yenyzu1@hotmail.com](mailto:yenyzu1@hotmail.com)

**Resumen**

**Introducción.** La enfermedad de Chagas es un problema de salud pública en Latinoamérica y en las áreas endémicas de difícil acceso el diagnóstico no es oportuno. El empleo de eluídos sanguíneos obtenidos a partir de muestra de sangre total facilita el diagnóstico de la infección, pero requiere de pruebas inmunológicas estandarizadas con excelentes características de sensibilidad y especificidad.

**Objetivo.** Establecer la concordancia entre la prueba de ELISA casera y la IFI para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* empleando eluídos sanguíneos.

**Materiales y métodos.** Se llevó a cabo un estudio de evaluación de tecnología diagnóstica, para lo cual se realizó un muestreo de corte transversal a 650 habitantes de los municipios de Aguazul y Maní, Casanare, Colombia. Se determinó la calidad de las pruebas mediante el cálculo del área bajo la curva ROC y se usó la IFI como prueba de oro. Se estableció el punto de corte con la mejor sensibilidad y especificidad para el ELISA casero.

**Resultados.** El ELISA casero presentó una concordancia de 0,99 (IC 95%: 0,989-0,992)entre las dos lecturas realizadas y el área para la curva ROC fue de 0,984. El punto de corte establecido fue 0,5 de absorbancia en la prueba de ELISA; 16,6% fueron positivas por ELISA y 10,9% por IFI.

**Conclusiones.** La prueba de ELISA casera para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* en eluídos sanguíneos mostró una buena concordancia frente a la IFI, por lo tanto es una buena elección diagnóstica para la población que vive en áreas remotas.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, ELISA, IFI, eluído sanguíneo.

**Abstract**

**Introduction.** Chagas disease is a public health problem in Latin America and in endemic areas of access difficult the diagnosis is not appropriate. The use of blood eluates obtained from whole blood sample facilitates the diagnosis of infection, but requires standardized immunological tests with excellent sensitivity and specificity.

**Objective.** Establish the agreementbetween in-house ELISA and IFI for the diagnosis of infection with *T. cruzi* using blood eluates.

**Materials and methods.** It was conducted a study of diagnostic technology evaluation, for which it took a cross-sectional sample of 650 residents of the municipalities of Aguazul and Mani, Casanare, Colombia. It was determined the quality of the evidence by calculating the receiver operating characteristic curve (ROC) and was used as a standard gold IFI. It was established the cutoff with the best sensitivity and specificity for the in-house ELISA.

**Results.** The in-house ELISA it was a agreement of 0,99 (95% CI: 0,989 to 0,992) between the two readings taken and the area for the ROC curve was 0,984. The cutoff was set at 0,5 absorbance in the ELISA test. 16,6% were positive by ELISA and 10,9% by IFI.

**Conclusions.** The in-house ELISA for diagnosis of infection with *T. cruzi* in blood eluates showed good agreement compared to the IFI, so it is a good choice diagnostic for the population living in remote areas.

**Key words:** Chagas disease,*Trypanosoma cruzi*, ELISA, IFI, blood eluates.

**Introducción**

La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi* aún se considera un serio problema de salud pública en Latinoamérica (1,2). Los datos de la OPS del año 2006 sugieren que 7,6 millones de personas están infectadas y aproximadamente 75 millones se encuentran en riesgo de infección (3,4). En Colombia la enfermedad de Chagas está distribuída en diferentes departamentos, principalmente de la zona oriental del país, donde alrededor de un millón de personas están infectadas (5-7).

La presencia de *Trypanosoma* *cruzi* en muestras biológicas o tejidos confirma el diagnóstico de la infección y su hallazgo depende de la fase clínica de la enfermedad. Para el diagnóstico en la fase crónica e indeterminada se han desarrollado varias técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos específicos contra epimastigotes de *T. cruzi*, entre ellas la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a una Enzima (ELISA) y la Hemaglutinación Indirecta (HAI) (8-11). La mayoría de las técnicas inmunológicas comerciales emplean antígenos recombinantes o antígenos preparados a partir de cepas no autóctonas antigénicamente diferentes a las cepas locales, lo que conduce a baja sensibilidad y especificidad de las mismas (12,13).

En la mayoría de las áreas rurales en donde la enfermedad de Chagas es prevalente existe dificultad para el acceso de los pacientes a los servicios de salud y por lo tanto al diagnóstico oportuno de la infección. Los laboratorios clínicos de los municipios endémicos no tienen la infraestructura adecuada para la realización de dichas pruebas y por consiguiente deben enviar las muestras de suero para el diagnóstico a instituciones de mayor complejidad. Para facilitar el envío de muestras desde zonas de difícil acceso muchos autores han recomendado la absorción de la sangre en papel filtro para posteriormente del eluído sanguíneo realizar las pruebas serológicas (14-18). Es preciso advertir que la mayoría de las pruebas comerciales no están estandarizadas para emplear eluídos sanguíneos; entonces se hace indispensable desarrollar pruebas inmunológicas caseras para el procesamiento de eluídos sanguíneos y sueros en las cuales se empleen cepas de *T. cruzi* locales. El objetivo del presente trabajo fue determinar la concordancia entre las técnicas ELISA casera e IFI utilizando una cepa local como antígeno para detectar anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi* en eluídos sanguíneos.

**Materiales y Métodos**

**Diseño y población**

Se realizó un estudio de evaluación de tecnología diagnóstica en Fase I mediante un muestreo de corte transversal (19,20). Se incluyeron habitantes procedentes del área rural del departamento de Casanare de los municipios Aguazul y Maní de todas las edades durante los meses de diciembre de 2008 y junio de 2009.

**Muestras biológicas**

Las muestras de sangre obtenidas por punción capilar fueron impregnadas en papel filtro Whatman No.3 con un diámetro de 1,5 cm. para un volúmen final de 60 µl. Los papeles filtro recortados fueron introducidos en viales con 480 µl de Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,2 y fueron incubados a 4°C por 24 horas; posteriormente se resuspendieron en el borde del vial durante una hora a temperatura ambiente para después descartarlos. Finalmente el eluído fue centrifugado durante siete minutos a 2.500 r.p.m y almacenado a -20°C hasta su procesamiento por las técnicas serológicas.

**Preparación del antígeno para el ELISA casero**

A partir de un cultivo de siete días en el medio RE1 y suplementado al 2% con suero bovino fetal fueron obtenidos los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa 202, aislada de humano en Mogotes, Santander; esta cepa fue caracterizada molecularmente como genotipo I. Los parásitos fueron lavados y centrifugados varias veces. Posteriormente una solución de lisis fue adicionada (Tris-HCl 10mM, NaCl 10mM, MgCl2 9mM, inhibidor de proteasas PMSF 2mM); enseguida se realizaron tres ciclos de sonicación y por último 10 ciclos de congelación y descongelación. Finalmente se centrifugaron a 14.000 r.p.m durante 10 minutos a 4ºC y se recogió el sobrenadante que correspondió al antígeno soluble, el cual fue almacenado a -20°C.

**Procesamiento de los eluídos por ELISA casero**

El ELISA estandarizado en el CINTROP fue una versión modificada del protocolo de antígenos inmobilizados (21). Para éste, microplacas de poliestireno de 96 pozos (NUNC®) se incubaron durante 18 horas a 4°C con antígeno soluble de *T. cruzi* a una concentración de 6,5 µg/ml. Luego se realizó bloqueo durante dos horas con PBS Tween 20 albúmina de huevo al 3%. Los eluídos diluidos 1/160 en buffer carbonatos pH 9,6 fueron incubados por una hora a 37ºC. Después de lavar las placas cinco veces con PBS-Tween 20 0,05% a pH 7,2, se adicionó el conjugado anti-inmunoglobulina G humana cadena específica marcada con fosfatasa alcalina (SIGMA®) diluida 1/2.000 y se incubó por dos horas. La actividad enzimática fue detectada por la adición del sustrato cromogénico p-nitrofenilfosfato. Después de 20 minutos de incubación la reacción fue detenida con NaOH 3N y las absorbancias leídas a 405 nm con filtro de referencia de 620 nm en un lector de ELISA (Anthos 2020). Todas las pruebas se realizaron por duplicado e incluyeron un control positivo un control negativo y un blanco de reactivo.

**Inmunofluorescencia Indirecta -IFI-**

**Preparación del antígeno**

Se cultivaron los epimastigotes de la misma forma que para el ELISA. Fueron lavados con solución salina (0,9%) estéril y posteriormente con formol al 2% para la muerte de los parásitos. En seguida se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en solución salina estéril hasta obtener la concentración de 20 – 40 parásitos por campo en 40X en placas de 18 pozos. Estas láminas se almacenaron a -20°C.

**Procesamiento de los eluídos por IFI**

Se hizo una dilución en serie de las muestras de eluídos. La dilución de 1/16 se sirvió directa puesto que cuando se realizó el proceso de elución la muestra quedó en esa concentración. Se incubaron a 37°C las láminas durante una hora y 10 minutos. Después de lavados exhaustivos se adicionó el conjugado anti-IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido en Azul de Evans. Luego de la incubación de una hora y 10 minutos, se realizó la lectura en un microscopio de Inmunofluorescencia con objetivo de 40x. Las muestras con título mayor o igual a 1:32 se consideraron positivas. Blanco de reactivo, controles positivos y negativos fueron incluidos en cada una de las láminas. La lectura de las láminas de IFI se realizó sin tener conocimiento previo de los resultados obtenidos en el ELISA.

**Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se registraron en una base de datos de Excel (Microsoft office, 2007) y los análisis se realizaron con el software software Stata 10,0 (Stata Corp. 2007. Stata Statistical Software: Release 10. College Station, TX: StataCorp LP).

Se calculó el coeficiente de correlación intraclase para determinar la reproducibilidad del ELISA y la validez de esta prueba se estableció mediante el cálculo del área bajo la curva del receptor operador (ROC) usando como test de referencia la IFI y considerando como resultado reactivo la dilución igual o mayor a 1:32. Se seleccionó el punto de corte donde la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA presentó las mejores características de una prueba de tamizaje.

**Consideraciones éticas**

Todos los participantes que cumplieron con los criterios de inclusión establecidos dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio. Este estudio corresponde a una investigación con riesgo mínimo, de acuerdo con la resolución No.08430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y con aprobación del comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, Acta No. 015 del 27 de agosto de 2007.

**Resultados**

Se tomaron en total 650 muestras de sangre en papel filtro de los habitantes de una zona endémica con edades comprendidas entre los cinco meses y 88 años, las cuales se procesaron con las técnicas de ELISA e IFI estandarizadas en el CINTROP.

El coeficiente de correlación intraclase obtenido de las dos mediciones del ELISA para evaluar la reproducibilidad intraevaluador fue de 0,99 (IC 95%: 0,989 - 0,992) con una diferencia entre las dos mediciones de 0,004 (DS 0,04). Los límites de acuerdo del 95% muestran la distribución de las absorbancias de las dos lecturas realizadas alrededor del acuerdo promedio más y menos dos desviaciones estándar. El límite de concordancia del 95% estuvo entre -0,075 y 0,082. Las absorbancias por debajo de 0,5 se agruparon alrededor de cero y se observa que al aumentar la absorbancia se incrementa la dispersión de los datos (Figura 1).

**Figura 1. Límites de acuerdo del ELISA en eluídos sanguíneos**



Teniendo como referente la prueba de IFI y estableciendo como resultado positivo una dilución igual o mayor a 1:32 se aprecia que la mayoría de los resultados positivos por IFI presentaron valores de absorbancia en el ELISA superiores a 0,5 (Figura 2).

**Figura 2. Distribución de las absorbancias del ELISA frente al resultado de IFI en eluídos sanguíneos**



**Curva ROC de sensibilidad y especificidad frente a IFI en eluídos sanguíneos**

La calidad de la prueba de ELISA estandarizada en el CINTROP se expresó a través del área bajo la curva del operador receptor (ROC) la cual fue de 0,9795 (IC 95%: 0,959 – 0,999) con un error estándar de 0,013, lo que indica una buena capacidad discriminatoria para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* (Figura 3).

**Figura 3. Área bajo la curva ROC para la prueba de ELISA en eluídos sanguíneos**



Para seleccionar el punto de corte del ELISA en muestras de eluído se establecieron las características de sensibilidad y especificidad de la prueba a diferentes absorbancias. La mayor eficiencia de la prueba se obtuvo con un punto el corte de 0,5 en donde la prueba mostró una sensibilidad de 97,2% y una especificidad de 93,7% (Tabla 1).

**Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA frente a diferentes puntos de corte en los eluídos sanguíneos**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Punto de corte  en absorbancia | Sensibilidad  % | Especificidad  % | Correctamente clasificados % |
| ≥ 0,20 | 100 | 20,7 | 29,4 |
| ≥0,30 | 98,6 | 41,8 | 48,0 |
| ≥0,40 | 98,6 | 67,5 | 70,9 |
| ≥0,50 | 97,2 | 93,3 | 93,7 |
| ≥0,60 | 93,0 | 96,4 | 96,0 |

El índice Kappa entre IFI y ELISA para las muestras de eluídos fue de 0,73, lo que representa una fuerza de concordancia buena entre estas dos pruebas.

Con el punto de corte de 0,5 establecido para la técnica de ELISA, 108 (16,6%) muestras fueron positivas por ELISA y 71 (10,9%) por IFI; positividad simultánea se observó en 69 (10,6%) casos (Tabla 2). Los valores predictivos positivo y negativo correspondieron a 63,9 y 99,6 respectivamente.

**Tabla 2. Positividad de los pacientes incluidos en el estudio por ELISA e IFI en eluídos sanguíneos**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Prueba diagnóstica** | **Positivos** | | **Negativos** | |
| **n** | **%** | **N** | **%** |
| **ELISA** | 108 | 16,6 | 542 | 83,3 |
| **IFI** | 71 | 10,9 | 579 | 89,1 |
| **ELISA e IFI** | 69 | 10,6 | 471 | 72,5 |

Adicionalmente se tomaron muestras de suero a 50 pacientes que presentaron resultado reactivo en eluído sanguíneo a los cuales se les realizaron las mismas pruebas serológicas. La reproducibilidad de la prueba en suero mediante el coeficiente de correlación intraclase fue de 0,987 (IC 95%: 0,980-0,994) con una diferencia entre las dos mediciones en promedio de 0,026 (DS 0,075). La concordancia establecida a través de los límites de acuerdo del 95% estuvo entre -0,122 y 0,173. Se observó que la dispersión de los datos de absorbancia en sueros fue mayor que en las muestras de eluídos (Figura 4, Figura 1).

**Figura 4. Límites de acuerdo de las absorbancias del ELISA en suero**



De igual manera que para los eluídos se presenta la distribución de las absorbancias del ELISA frente a la IFI en las muestras de suero. La figura 5 muestra resultados negativos para IFI que corresponden a una absorbancia inferior a 0,5 en el ELISA (Figura 5).

**Figura 5. Distribución de las absorbancias del ELISA en sueros frente al resultado de IFI**



Al comparar la calidad del ELISA frente a la IFI en suero se determinó un área bajo la curva ROC de 0,966 (IC 95%: 0.925 - 1.00) con un error estándar de 0,02. De igual manera que en eluídos la prueba mantiene buena capacidad discriminatoria para el diagnóstico de la infección en los sueros (Figura 6).

**Figura 6. Área bajo la curva ROC para la prueba de ELISA en sueros**



Se determinaron las características de sensibilidad y especificidad para diferentes puntos de corte en sueros. La absorbancia de 0,3 presentó las mejores condiciones para una prueba de tamizaje de alta sensibilidad y buena especificidad (Tabla 4).

**Tabla No. 4 Características de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA según el punto de corte en sueros**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Punto de corte | Sensibilidad % | Especificidad % | Correctamente clasificados % |
| ≥ 0,20 | 100 | 40,9 | 74 |
| ≥0,30 | 92,9 | 86,4 | 90 |
| ≥0,40 | 89,3 | 95,5 | 92 |
| ≥0,50 | 67,9 | 100 | 82 |

Al evaluar la concordancia entre las absorbancias de sueros y eluídos se obtuvo un valor para el coeficiente de correlación intraclase de 0,806 (IC 95%: 0,726-0,886) con una diferencia entre las dos mediciones de -0,129 ( DS 0,238) y un límite de concordancia del 95% entre -0,595 y 0,336.

**Discusión**

La Organización Mundial de la Salud recomienda emplear tres métodos serológicos distintos para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Chagas (22).

Las pruebas serológicas constituyen una herramienta importante que permiten estimar los niveles de exposición a *T. cruzi.* La prueba de ELISA es una de las técnicas serológicas más sensible utilizada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. Su interpretación depende de parámetros calculados más que de la interpretación subjetiva de quien realiza la prueba (23). Además del ELISA está la hemoaglutinación (HAI) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) las cuales debido a su simplicidad, bajo costo y a los buenos resultados en términos tanto de especificidad como de sensibilidad son ampliamente usadas para el diagnóstico de la enfermedad. Estas técnicas se basan en el empleo de fracciones antigénicas semipurificadas o totales de epimastigotes o tripomastigotes de *T. cruzi* (24). En éste estudio se determinó una buena correlación entre los resultados obtenidos por ELISA y por IFI en eluídos, a pesar de ser preparaciones antigénicas diferentes; en la prueba de ELISA se utilizó un extracto crudo donde están representados todos lo antígenos solubles que componen el mosaico antigénico del epimastigote mientras que en la IFI se utilizaron parásitos completos donde los únicos antígenos que están disponibles para interactuar con los anticuerpos del huésped son los antígenos de superficie(25).

Tal como fue reportado por Bucio y colaboradores, el uso de cepas autóctonas aumenta la sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (26).Para el ELISA casero de este estudio se usó como antígeno una cepa local de *T. cruzi* Ique corresponde al genotipo más común que circula en la zona oriental del país (27).

El uso de papel filtro ha sido empleado satisfactoriamente para el tamizaje de otras infecciones de transmisión vectorial como dengue lo que extiende su uso en zonas de difícil acceso (28). Esta técnica minimiza las dificultades de costo y transporte de las muestras convirtiéndose en una herramienta útil para estudios seroepidemiológicos en población dispersa como es el caso de la población de este estudio. Además bajo condiciones adecuadas de almacenamiento pueden ser usadas hasta por un año sin presentar alteraciones significativas en los títulos de anticuerpos (29).

Estudios previos usando sangre colectada en papel filtro y empleando la técnica de inmunofluorescencia indirecta mostraron un 100% de concordancia con los sueros positivos y 0,8% de los sueros negativos presentaron resultado reactivo cuando se procesaron en papel filtro; estos falsos positivos no fueron significativamente importantes dadas las otras ventajas que representa este método(15).

Son pocas las investigaciones que presentan las características de confiabilidad y calidad de las pruebas que son empleadas para realizar diagnóstico y clasificar a un individuo como sano o enfermo. Los resultados de este trabajo concuerdan con los hallazgos de un estudio realizado en Chile en el cual los valores de absorbancia obtenidos en las muestras de pacientes con diagnóstico positivo para Chagas se encuentran entre 0,508 y 1,469 (16). De igual manera López y colaboradores encontraron las mejores características de sensibilidad y especificidad con un punto de corte de 0,4 para la técnica de ELISA en eluídos provenientes de pacientes de zona endémica de Colombia usando como gold estándar la IFI (18). El área bajo la curva ROC para eluídos hallada en este estudio fue de 0,975, similar a la obtenida por Orozco y colaboradores (0,994) quienes usaron muestras colectadas en papel filtro de habitantes de zona endémica de Colombia para la enfermedad de Chagas. En ese mismo estudio el punto de corte establecido estuvo entre 0,4 y 0,5 en con valores de kappa más altos respecto a este trabajo (17). Esta discrepancia puede deberse a una diferencia en la concentración final del antígeno y el procesamiento de la técnica de ELISA.

Dentro de las debilidades de este estudio está el limitado número de muestras de suero recolectadas para realizar la comparación con los eluídos sanguíneos. En estudios previos realizados por el mismo grupo se utilizaron las pruebas IFI y ELISA en sueros para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en habitantes de una zona endémica de Santander; para el ELISA se determinó como punto de corte 0,30, similar a lo establecido en este estudio (30,31). El coeficiente de correlación intraclase entre sueros y eluídos fue más bajo que el establecido para los eluídos sanguíneos (0,81 y 0,99 respectivamente), por consiguiente se sugiere ampliar el número de sueros y de esta forma establecer la concordancia entre sueros y eluídos; no obstante dadas las ventajas que presenta la recolección y el transporte de sangre impregnada en papel filtro*,* en áreas de difícil acceso es innegable la utilidad del papel filtro en el tamizaje para la infección por *T. cruzi.*

**Financiación**

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación –Colciencias- de la República de Colombia (proyecto No. 110240820446 y contrato No. 288-2007) y la Secretaría de Salud de Casanare.

**Agradecimientos**

Doctor Luis Carlos Orozco por sus invaluables aportes en el análisis de los datos, al personal de la Secretaría de Salud del Departamento de Casanare y a las personas de las comunidades incluidas en este estudio.

**Referencias**

1. Schofield C, Chris J Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends in parasitology. 2006;22(12):583-8.
2. Moncayo A, Silveira A. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(1):17-30.
3. Schmunis G. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(1):75-5.
4. Hernández P, Heimann M, Riera C, Solano M, Santalla J, et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas disease. Clin Vaccine Immunol. 2010;17(10):1598- 04.
5. Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls R, Rodríguez A, Mercado M, et al. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-Trypanosoma cruzi. Biomédica.2004;24:104-8.
6. Angulo VM. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. MVZ Córdoba. 2000;5(1):64-8.
7. Guhl F. Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. En: Guhl F, Jaramillo C. Editores. Curso-taller control de tripanosomiasis americana y leishmaniasis: aspectos biológicos, genéticos y moleculares. Santafé de Bogotá: Corcas Editores; 1998. p.47-81.
8. Macedo V. Indeterminate Form of Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1):311-6.
9. Zicker F, Smith P, Luquetti A, Oliveira O. Bolletin of the World Health Organization. 1990;68(4):465-71.
10. Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, Aguilar V. Validation of a Rapidand Reliable Test for Diagnosis of Chagas’Disease by Detection of Trypanosoma cruzi-Specific Antibodies in Blood of Donors and Patients in Central America. J Clin Microbiol. 2005; 43(10):5065–68.
11. Nakazawa M, Rosa D, Pereira RA, Moura MO, Furtado V, Souza W, et al.Excretory-Secretory antigens of Trypanosoma cruzi are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas disease.Clin Diagn Lab immunol.2001;8 (5):1024-7.
12. Brasil P. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta- análysis. BMC Infectious Disease. 2010;10 (37):1-17.
13. Barfield CA, Barney RS, Crudder CH, Wilmoth JL, Stevens DS, Mora-Garcia S, et al. A highly sensitive rapid diagnostic test for Chagas disease that utilizes a recombinant Trypanosoma cruzi antigen. IEEE Trans Biomed Eng. 2011;58(3):814-7.
14. Souza SL, Camargo M. The use of paper blood smears in a practical fluorescent test for american Trypanosomiasis serodiagnosis. Rev Inst Med Trop. 1966;8:255-8.
15. Álvarez M, De Rissio AM, Wynne G, Abramo L, Cerisola J. Recolección de sangre en papel para diagnóstico de infección chagásica por inmunofluorescencia. Bol chil Parasitol.1971;26:2-6.
16. Contreras M, Salinas P, Sandoval L, Solís P, Rojas A. Utilidad de la ELISA-IgG en muestras de sueros y eluídos de sangre em papel filtro em el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol Chil Parasitol. 1992;47:76-81.
17. Orozco LC, Camargo D, Lopez M, Duque S, Gualdrón LE, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infeccion en humanos por Trypanosoma cruzi mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999;19(2):164-8.
18. López MC, Duque S, Orozco LC, Camargo D, Gualdrón LE, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. Biomédica. 1999;19(2):159-3.
19. Orozco LC. Fases y muestreos, o de cómo tomar las personas de una población para hacer el estudio. Confiabilidad de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: Medición en Salud. Diagnóstico y Evaluación de Resultados. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga; 2010. p. 63-157.
20. Kraemer H. Sensitivity and Specificity: The signal Detection Approach. In: Evaluating medical Tests. Objective and quantitative guidelines. Sage publications, Inc; Newbury Park, California, USA; 1992. p. 63-95.
21. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans Roy Soc Trop Med and Hyg. 1976;70(2):98-06.
22. Vissoci EM, Cavazzana M, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius S, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas disease. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59 (5): 750-56.
23. Palacios X, Belli A, Espino AM. Detección de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. Rev Panam Salud Publica.2000;8(6): 411-7.
24. Ramos A, Ramírez ME, González JC, Rosales JL, López A. Prevalencia de anticuerpos contra Trypanosoma cruzi en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. Rev Salud Pública de México. 2006;48(1):13-1.
25. Monteon VM, Sosa T, Reyes P. Serological tests for American tripanosomiasis. A comparative study. Lat-amer. Microbiol. 1989;31:35-8.
26. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar M. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of Trypanosoma cruzi. Immunol Invest.1999; 28(4):257-68.
27. Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. Parasitology. 2004;129:439-44.
28. Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. Rev Inst Med Trop. 1991;33(4):309-11.
29. Marinkelle C, De Sanchez N, Grogl M, Guhl F. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. Rev Inst Med trop.1978;20(2):112-4.
30. Angulo VM. Estandarización de IFI para Chagas. Biomédica. 1987(Supl.1):83.
31. Ramírez G, Angulo VM, Cabrales CC, Rodríguez M, Muñoz G, Torres de Leal A. Comparación de ELISA con IFI en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi.* Biomédica. 1987(Supl.1): 83-84.





