



Eficacia de la Técnica de Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay con antígenos de Excreción-Secreción de Tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Effectiveness of Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay Technique with excretion-secretion antigens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to Chagas disease diagnose

Olga Sanabria¹ y Hermes Escalante²

¹Tesista Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT), Trujillo (Perú).

²Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT

RESUMEN

Se estima que aproximadamente 10 millones de personas están infectadas por *Trypanosoma cruzi*, agente productor de la enfermedad de Chagas en América Latina y más de 15 millones de personas están a riesgo de adquirirla. El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la eficacia de la Técnica de Elisa con la utilización de antígenos de excreción-secreción de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) en la detección de anticuerpos específicos. Los tripomastigotes se obtuvieron a partir de epimastigotes de una cepa proveniente Arequipa (Perú), a la cual se le incrementó su biomasa en medio bifásico hasta obtener 1×10^8 parásitos/mL durante 15 días, luego fueron cultivados en medio Grace y en Medio de Eagle (Minimum Essential Medium) para la obtención de los TESA. Estos fueron enfrentados con sueros controles para determinar la eficacia de un ELISA-indirecto. Se encontró que la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 95%. Se concluye que la Técnica de ELISA puede ser utilizada a gran escala, por la facilidad de evaluar un número elevado de muestras y obtener resultados automatizados que no dependen de la subjetividad del personal para su interpretación.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, ELISA, trpomastigotas, *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

An estimated 10 million people are infected with *Trypanosoma cruzi*, producing agent of Chagas disease in Latin America and more than 15 million people are at risk of acquiring it. This study aimed to determine the effectiveness of the Elisa technique with the use of excretory-secretory antigens of trypomastigotes of *T. cruzi* (TESA) in the detection of specific antibodies. The trypomastigotes were obtained from a strain epimastigotes from Arequipa (Peru), which increased its biomass was performing successive cultures in biphasic medium until 1×10^8 parasites/mL for 15 days before being cultured in Grace then Eagle's Medium (Minimum Essential Medium) to obtain the TESA. These antigens were confronted with control sera to determine the efficacy of an indirect ELISA technique. A sensitivity of 100 % and a specificity of 95 % was found. It was concluded that the ELISA technique can be used on a large scale, for ease of evaluating a large number of samples and get automated results that do not depend on the subjectivity of staff for interpretation.

Keywords : Chagas disease , ELISA, trpomastigotas , *Trypanosoma cruzi*



INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, enfermedad causada por *Trypanosoma cruzi*, está íntimamente ligada al ámbito rural y a la pobreza de poblaciones del centro y Sudamérica en donde se registran aproximadamente ocho millones de infectados con deterioro progresivo a su salud^{1,2,3,4,5}. En el Perú existen alrededor de 600 000 personas infectadas y siete millones en riesgo de adquirirla (34% de la población total), principalmente en la macroregión sur del país (Arequipa, Moquegua, Tacna, Ica, Ayacucho y Apurímac) que está considerada como la principal zona chagásica; sin embargo, también se han reportado casos en la vertiente noreste (La Libertad, Tumbes, Piura) y centro oriental de los Andes (Cajamarca, Amazonas, San Martín y Ucayali)^{6,7,8}.

La enfermedad de Chagas posee dos fases sucesivas: aguda, en la que la presentación clínica es confusa, y crónica, que se caracteriza por ser muy duradera y puede pasar por una fase indeterminada, sin presentación clínica; durante la fase aguda o durante una reactivación debido a una inmunosupresión, el diagnóstico se lleva a cabo por detección del parásito circulante, sin embargo en la fase crónica, de baja parasitemia, el diagnóstico es ejecutado por métodos serológicos, dentro de los cuales el ELISA es el más usado debido a su reconocida elevada sensibilidad y especificidad, que dependen del antígeno y el punto de corte usados y de la habilidad para procesar grandes cantidades de muestra rápidamente^{3,4,5}.

Un amplio rango de diferentes antígenos han sido usados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, por ejemplo: extractos crudos de epimastigotes sonicados, proteínas extraídas de epimastigotes, epimastigotes completos fijados, amastigotes fijados y sonicados, proteínas recombinantes de *T. cruzi*, y antígenos de excreción/secreción de las formas epimastigotas del protozoo (antígenos ESEA)^{9,10,11,12,13,14}; estos últimos han demostrado ser excelentes debido a su elevada sensibilidad y especificidad y a que pueden ser aplicados en diferentes formatos (ELISA, Western blot). Estos excretados/secretados son compuestos específicos porque corresponden a sustancias que el parásito utiliza para su protección y por su naturaleza proteica tienen propiedades antigénicas; además, pueden ser obtenidos en medios de cultivo esencial, como el Eagle-MEM, en cantidades apreciables^{15,16,17,18}.

Los ESEA tienen elevada utilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, porque son los que más fácilmente se cultivan *in vitro* y porque se pueden usar en varias técnicas como ELISA¹⁵, IFI y Western blot; sin embargo, existe la tendencia de utilizar los antígenos de excreción/secreción de los tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA), debido a que son igualmente antigénicos y tienen mayor valor en el diagnóstico por que son las formas infectantes naturales⁹.

Teniendo en cuenta que en la actualidad en el Perú esta enfermedad comunicable y de registro obligatorio en todos los Bancos de Sangre y que los kits de Elisa son de fabricación extranjera y utilizan diversos tipos de antígenos de cepas de *T. cruzi* que no proceden de cepas peruanas, resulta pertinente buscar alternativas que permitan mejoras en el diagnóstico. En este contexto, la presente investigación se propuso para responder a la siguiente interrogante: ¿Cuál es la eficacia de la Técnica de Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay “Elisa” con antígenos de Excreción/Secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* obtenidos en medio de cultivo, en la detección de anticuerpos específicos en sueros controles positivos y negativos a la enfermedad de Chagas?

MATERIAL Y MÉTODOS

Antígenos

A partir del cultivo de la Cepa de *T. cruzi* donada por el Laboratorio ESCALABS, se realizaron cultivos hasta aumentar la biomasa, para lo cual se realizó pasos sucesivos en medio bifásico (BHI Y PYLB) enriquecido con 10% de sangre de “conejo” hasta obtener 1×10^8 parásitos/ml (el cálculo se estimó mediante el recuento en cámara de Neubauer), aproximadamente a los doce días de cultivo (fase log).

Después de 15 días de incubación, los epimastigotes alcanzaron su fase logarítmica, momento en el cual los epimastigotes fueron lavados con solución buffer fosfato salino (PBS), pH 7.2 por 3 veces mediante centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos. Después de ser lavados estos epimastigotes, se sembraron en



medio Grace (Sigma) de acuerdo a las instrucciones de este medio^[33] y se dejó incubar a temperatura ambiente en una zona oscura por 6 días. Después de este tiempo se tomó una muestra para verificar el proceso de transformación de epimastigotes a tripomastigotes. La identificación de los tripomastigotes se realizó mediante coloración Giemsa.

Los Tripomastigotes cosechados en tubos de 13 x 100 mm se procedieron a lavar 3 veces con PBS estéril (pH 7.2) más antibiótico, se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos, eliminando el sobrenadante después de cada centrifugación, el sedimento obtenido después de cada lavado se resuspendió hasta llegar a obtener un solo tubo con pellet de *T. cruzi*, luego éste contenido fué lavado dos veces con Minimum Essential Medium (MEM). Luego de los respectivos lavados, el pellet se resuspendió en 3 ml de medio MEM y se incubó a 37°C por 20 horas^{19,20}. Después de este tiempo se centrifugó a 4000 rpm x 5 min y se obtuvo el sobrenadante en el cual se encontraron los antígenos de Excreción-Secreción y se guardó a -20°C hasta su posterior uso. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford²¹.

Sueros

Se utilizaron 20 sueros positivos a *T. cruzi*, 20 sueros negativos correspondientes a neonatos nacidos en zonas no endémicas y los 40 sueros positivos a otras parasitosis: 12 a Toxoplasmosis, 10 a Leishmaniasis, 08 a Hymenolepiasis, 05 a Cisticercosis y 05 a Hidatidosis. Todos ellos fueron proporcionados por la seroteca del laboratorio ESCALABS de Trujillo

Ensayo inmunoenzimático (ELISA indirecto)^{16,22}

• Estandarización de la Técnica de Elisa

Dilución óptima del suero (Sensibilización de la Placa)

Partiendo de una concentración de antígeno de 170 ug/mL se realizaron diluciones seriadas de 1/16, 1/32, 1/64, 1/128. De cada una de las diluciones se sensibilizó con 100 uL por pocillo a una placa de poliestireno, posteriormente esta placa se tapó y se incubó a 37°C en cámara húmeda por toda una noche para facilitar la adherencia de los antígenos al poliestireno, material con que están hechas las placas de microtitulación. Al día siguiente la placa fué lavada por tres veces con PBS de pH 7,2 más Tween 20 a la concentración de 0.5% (PBS-tween 20), y se dejó el líquido de lavado durante 5 minutos en agitación constante.

Bloqueo de las zonas reactivas de la placa

Para evitar la adherencia de proteínas inespecíficas en las zonas de los pocillos no cubiertos por los antígenos y que pueden dar lugar a reacciones cruzadas durante el desarrollo de la prueba, se utilizó una solución de leche descremada al 5% a un pH 9,2. Al cual se le agregó 200 ul de solución bloqueadora a cada pocillo y se incubó a 37°C por una hora en cámara húmeda. Posteriormente la solución bloqueadora fué descartada y los pocillos fueron lavados por tres veces con PBS-Tween 20 en agitación constante.

Incubación con los sueros

Se empleó diluciones de 1/200, 1/400, 1/800 de un pool de sueros positivos y negativos, se agregó 100 ul de cada una de las diluciones del suero en los pocillos sensibilizados con el antígeno, Las placas fueron tapadas e incubadas a 37°C en cámara húmeda por 1 hora y luego se procedió a lavar por tres veces con PBS-tween 20 en agitación constante. Las placas fueron incubadas a 37°C en cámara húmeda después de haber agregado a cada pocillo 100 ul de conjugado; suero anti Ig.G humana, conjugado con peroxidasa a una dilución de 1/1500; en PBS-tween 20. Posteriormente el conjugado remanente fue eliminado y los pocillos fueron lavados con PBS-tween por tres veces en agitación constante. Finalmente se depositó en cada pocillo 100 uL de sustrato (H₂O₂ al 30% preparada en buffer citrato a pH 5 más ortofenilendiamina (OPD) como cromógeno el cual luego fue incubado por 10 minutos en un lugar oscuro del laboratorio, luego la reacción fue detenida agregando a cada pocillo 50 ul de H₂SO₄ 2M. La densidad óptica de la reacción en cada pocillo fue medida mediante un lector de ELISA a 492 nm de longitud de onda.

• Dilución óptima de Antígeno y Congugado

Sensibilización de la Placa

Del mismo modo que en el punto 3.2.2.1, partiendo de una concentración de Ag 170 uL se realizaron las mismas diluciones y se sensibilizó la placa con 100 uL por pocillo, para luego ser tapada y llevada a incubación a 37°C en cámara húmeda por toda una noche, al día siguiente la placa fué lavada por tres veces con PBS de pH 7,2 más Tween 20 a la concentración de 0.5% (PBS-tween 20), y se dejó el líquido



de lavado durante 5 minutos en agitación constante. Se realizó posteriormente el bloqueo de las zonas reactivas del mismo modo que en el punto 3.2.1.2.

Incubación con los sueros

Aquí se empleó una sola dilución, 1/800, de un pool de Sueros positivos, negativos, y otras parasitosis comprobadas. Se agregó 100 ul de la dilución del suero en los pocillos sensibilizados con el antígeno, las placas fueron tapadas e incubadas a 37°C en cámara húmeda por 1 hora y luego se procedió a lavar por tres veces con PBS- tween 20 en agitación constante. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37 °C en cámara húmeda después de haber agregado a cada pocillo 100 ul. del conjugado, a las diluciones de 1/1000, 1/1500, 1/2000, 1/2500 en PBS-tween 20. El conjugado remanente fue eliminado y los pocillos fueron lavados con PBS-tween por tres veces en agitación constante. Por último se depositó en cada pocillo 100 ul del mismo sustrato mencionado anteriormente como cromógeno, éste de la misma manera fue incubado por 10 minutos en un lugar oscuro del laboratorio, luego la reacción fue detenida agregando a cada pocillo 50 ul de H₂SO₄ 2M.

Sensibilidad y Especificidad con Sueros Individuales

Habiendo obtenido la dilución óptima tanto de antígeno como de suero y conjugado, se procedió del mismo modo que en los puntos anteriores pero usando las diluciones óptimas halladas, 1/64 Ag, 1/800 de suero, 1/2500 de conjugado: se usó 20 sueros positivos, 20 sueros negativos a la enfermedad de Chagas y 40 sueros de otras parasitosis. Se sensibilizó la placa con los antígenos de E/S de tripomastigote a la dilución 1/64, se agregó después de la incubación y el lavado como se indica anteriormente, los sueros a la dilución 1/800, y se dejó tres pocillos uno para el control positivo, otro para el control negativo y otro para el blanco (PBS- tween 20 solo). Para luego agregar el conjugado 1/2500, y finalmente el sustrato. Siempre haciendo el lavado correspondiente después de la incubación dada. La densidad óptica de la reacción en cada pocillo fue medida mediante un lector de ELISA a 492 nm de longitud de onda. El punto de corte más óptimo se determinó a partir del promedio de las densidades ópticas de los sueros negativos (sueros negativos y otras enfermedades) más 3 desviaciones estándar.

Determinación del punto de corte, sensibilidad y especificidad²²

Para determinar el punto de corte, la especificidad y la sensibilidad se emplearon las fórmulas propuestas para ello.

RESULTADOS

Después de colocar la placa en el lector de ELISA se encontró que las densidades ópticas en los pocillos con sueros positivos fueron mayores que con los sueros negativos y sueros de otras parasitosis (Fig. 1). Los valores hallados luego de restar el valor del Blanco (0.289) y del punto de corte (0.76664458), siguieron siendo mayores en los sueros de chagasicos respecto de los demás (Figs. 2 y 3). Con los datos de la Tabla 1, se encontró una especificidad del 95.0% y una sensibilidad del 100%.

DISCUSIÓN

Las pruebas serológicas constituyen importantes herramientas que permiten estimar los niveles de exposición a *T. cruzi* en regiones endémicas y muchas han sido utilizadas para evaluar medidas de control en Sudamérica^{9,10}. A pesar de que existen programas de control, aún no se ha puesto en práctica ningún programa de eliminación del vector, es por eso que se pone en práctica realizar diagnósticos con técnicas altamente sensibles, con la cual pudiera realizar el diagnóstico individual y acometer estudios poblacionales a gran escala que permitieran estimar la diseminación de la enfermedad de Chagas en el país y, más tarde, evaluar los programas de control^{13,20}.

En este proyecto la técnica seleccionada fue una prueba de ELISA indirecto, que es una de las técnicas serológicas más sensibles utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica^{13,14,15}.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A	2.769	2.900	2.969	1.191	0.673	0.729	0.913	0.864	0.679	0.747	3.031
B	3.107	3.093	3.106	0.575	0.57	1.039	0.786	0.866	0.474	0.718	0.903
C	2.906	2.899	2.973	0.631	0.646	0.945	0.831	0.661	0.831	0.658	
D	2.906	1.78	3.026	0.633	0.574	0.772	1.114	0.654	0.522	0.742	
E	2.613	2.891	0.496	0.605	0.704	0.753	0.913	0.615	0.489	0.787	
F	3.067	3.075	0.566	0.521	0.581	0.764	0.794	0.653	0.732	0.648	
G	2.97	2.895	0.702	0.604	0.611	0.704	1.047	1.463	0.785	0.524	
H	3.04	3.09	0.635	0.639	0.708	0.744	0.909	0.827	0.693	0.905	0.289

Fig 1. Densidades ópticas en los resultados de ELISA utilizando antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y sueros individuales con pacientes positivos (color amarillo), negativos a la enfermedad de Chagas (verde) y pacientes con otras parasitosis: toxoplasmosis, leishmaniasis, himenolepiasis, cisticercosis e hidatidosis (blanco).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A	2.48	2.619	2.68	0.902	0.384	0.44	0.624	0.575	0.39	0.458	2.742
B	2.818	2.804	2.817	0.286	0.281	0.75	0.497	0.577	0.185	0.429	0.614
C	2.617	2.61	2.684	0.342	0.357	0.656	0.542	0.372	0.542	0.369	
D	2.697	1.491	2.737	0.344	0.285	0.483	0.825	0.365	0.233	0.453	
E	2.324	2.602	0.207	0.316	0.415	0.464	0.624	0.326	0.2	0.498	
F	2.778	2.786	0.277	0.232	0.292	0.475	0.505	0.364	0.443	0.359	
G	2.681	2.606	0.413	0.315	0.322	0.415	0.758	1.174	0.496	0.235	
H	2.751	2.801	0.346	0.35	0.419	0.455	0.62	0.538	0.404	0.616	

Fig 2. Densidades ópticas en los resultados de ELISA utilizando antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y sueros individuales con pacientes positivos (color amarillo), negativos a la enfermedad de Chagas (verde) y pacientes con otras parasitosis: toxoplasmosis, leishmaniasis, himenolepiasis, cisticercosis e hidatidosis (color blanco), después de restar el valor del Blanco (0.289).

Tabla 1. Relación entre el resultado de la prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad

Positivo	20	3	23
Negativo	0	57	57
TOTAL	20	60	80

Cut off 3D 0.76664



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
A	1.713355	1.05235542	1.91335542	-0.13535542	-0.30264458	-0.32664458	-0.14264458	-0.19164458	-0.37664458	-0.30864458	1.97535542
B	2.051355	2.03735542	2.05035542	-0.40064458	-0.40564458	-0.01664458	-0.26964458	-0.10964458	-0.58164458	-0.33764458	-0.15264458
C	1.850355	1.04335542	1.91735542	-0.42464458	-0.40964458	-0.11064458	-0.22464458	-0.39464458	-0.22464458	-0.39764458	
D	1.930355	0.72435542	1.97035542	-0.42264458	-0.40164458	-0.28364458	0.05835542	-0.40164458	-0.53364458	-0.31364458	
E	1.557355	1.03535542	-0.55964458	-0.45064458	-0.35164458	-0.30264458	-0.14264458	-0.44064458	-0.56664458	-0.26864458	
F	2.011355	2.01935542	-0.48964458	-0.53464458	-0.47464458	-0.29164458	-0.26164458	-0.40264458	-0.32364458	-0.40764458	
G	1.914355	1.03935542	-0.35364458	-0.45164458	-0.44464458	-0.35164458	-0.00864458	0.40735542	-0.27064458	-0.53164458	
H	1.904355	2.03435542	-0.42064458	-0.41664458	-0.34764458	-0.31164458	-0.14664458	-0.22864458	-0.36264458	-0.15064458	

Fig 3. Densidades ópticas en los resultados de ELISA utilizando antígenos de excreción-secreción de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* y sueros individuales con pacientes positivos (color amarillo), negativos a la enfermedad de Chagas (verde) y pacientes con otras parasitosis: toxoplasmosis, leishmaniasis, hymenolepiasis, cisticercosis e hidatidosis (color blanco) después de restar el valor del punto de corte 0.76664458.

La determinación de la especificidad de la Técnica de ELISA utilizando 20 sueros positivos a la enfermedad de Chagas, 20 sueros negativos a la misma y 40 sueros de otras parasitosis se considera adecuado, porque corresponde a un número suficiente para este tipo de exámenes. En otras investigaciones se ha usado números de sueros similares^{9,11,14}, aun cuando debe tenerse en cuenta que para investigaciones seroepidemiológicas el número de sueros usados es mayor^{10,17} y ello tiene su base en que, precisamente, el diseño de un ELISA es para procesar gran número de muestras, pero la validez se prueba siempre con menor cantidad, como ha sucedido en la presente investigación.

La estandarización de la Técnica de ELISA es un paso inicial y el más importante, porque se busca hallar la concentración óptima de antígeno a utilizar, la dilución óptima de suero y conjugado, que son la base para la generación y confección de los kits comerciales¹⁴. Entonces, el uso de antígenos de excreción/secreción de *T. cruzi* resulta adecuado y recomendable porque se ha verificado que éstos inducen una elevada respuesta inmune humoral, generándose anticuerpos que poseen una especificidad tan precisa capaz de distinguir entre diferentes cepas de una misma especie o entre diferentes estadios evolutivos del mismo parásito^{9,15}. Lógicamente, si se usa otros tipos de antígenos u otras concentraciones se obtendrán distintos resultados; sin embargo, en caso de proponerlo a gran escala debe precisarse para que los laboratorios tengan una adecuada información cuando elijan uno u otro, para diagnóstico o investigación¹⁶. En concordancia con ello, se considera que los antígenos usados en la presente investigación constituyen adecuados para el uso de la técnica de ELISA, bajo cualquiera de sus formatos, pues la dilución y el punto de corte encontrados así lo demuestran.

Utilizando la fórmula dada se halló un 100% de sensibilidad de esta Técnica con un 95% de especificidad, la concordancia de los resultados obtenidos fue la esperada, y se puede comparar la sensibilidad y especificidad de la prueba con otros estudios que utilizaron inmunoensayos enzimáticos semejantes. El 100% de sensibilidad es un resultado comparable a casi todos los ELISA^{14,15,16} ya que la técnica tiene como mayor propiedad ello, aspecto que está relacionado con el hecho de que ELISA, por la reacción enzima-sustrato, potencia la reacción antígeno-anticuerpo, mas bien el 95 de especificidad, aun cuando es comparable a lo encontrado en otras investigaciones^{16,17}, podría mejorarse un poco proponiendo dos dígitos en el punto de corte y con ello sacar ventajas de otros antígenos usados, aspecto que tiene que ver con las reacciones cruzadas, principalmente con infecciones por *Leishmania* spp.¹⁷.

Comparando nuestros resultados con otras investigaciones realizadas, en el caso de la prueba de IFI, ésta es igual de sensible y específica que la Técnica de ELISA pero tiene un número de limitaciones



prácticas, especialmente debido a la subjetividad de la interpretación de resultados, al requerimiento de personal altamente calificado y con experiencia para diferenciar los casos positivos de los negativos^{14,15,16}. Por lo contrario, estudios indican que la prueba de Western Blot es menos sensible que la Técnica de Elisa, pero más específica ya que esta se basa en la detección sólo de proteínas específicas^[46].

CONCLUSIÓN

- La Técnica de Enzyme Linked Immuno- Sorbent Assay “Elisa” con antígenos de Excreción/Secreción de tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa “CH”, obtenidos en medio GRACE es eficaz en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, con una sensibilidad de 100 % y una especificidad de 95 %, observándose reacciones cruzadas sólo con sueros de pacientes con Leishmaniasis.

RERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Rev Inst Med Trop*, 2007; 102: 75-85.
2. Carod-Artal FJ, Gaseon J. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol*, 2010; 9: 533-542
3. Kowalski A, Kowalski P, Torres TMA. Chagas disease-American tripanosomiasis. *Pol Ann Med*, 2011; 18(1): 156-167
4. Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, et al. Pathogenesis of Chagas disease: parasite persistence and immunity. *Clin Microbiol Rev*, 2011; 24(3): 592-630
5. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, et al. Current understanding to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Sem Immunopathol*, 2012; 34: 753-770
6. Bayer AM, Hunter GC, Gilman RH, Cornejo del Carpio JG; et al. Chagas disease, migration and community settlement patterns in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009; 3(12): e567
7. Hunter GC, Barroni-Mayori K, Juarez JA, Neyra RC, et al. A field trial of alternative target screening strategies for Chagas disease in Arequipa, Peru. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(1): e1468
8. Chiarpenello J. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). *Evid Actual Pract Ambul*. 2004; 7: 114-9
9. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, et al. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tool from diagnosis of Chagas disease. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(2): 291-296
10. Berrizbeitia M, Aguilera G, Ward B, Rodríguez J, Jorquera E, Ndao M. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Rev Soc Ven Microbiol*, 2010; 30(1): 1-5.
11. Nakasawa M, Rosa DS, Pereira VRA, Moura MO, et al. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001; 8(5): 1024-1027
12. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine crossreactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vacc Immunol*, 2007; 14(8): 1045-1049.
13. Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. Detección de infectados por *Trypanosoma cruzi* mediante inmunofluorescencia, ELISA y hemaglutinación en suero y eluidos de sangre seca. *Bol Of Sanit Panam* 1991; 110: 489-496.
14. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangernis LHC, Braga JV. ELISA vs PCR from diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*, 2012; 10: 337
15. Berrizbeitia M, Figueroa M, Ward BJ, Rodriguez J, et al. Development and application of an ELISA assay using excretory/secretory proteins from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease *J Trop Med*, 2012; 2012: 875909
16. Santos LS, Torres RM, Machacado de Asis GF, Bahia MT, et al. In house ELISA method analyzes anti-*Trypanosoma cruzi* reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2012; 45(1): 35-44
17. Figueredo-Silva J, Kaneda Y, Tachibana H, Furushima R, Tateno S, Correia-Lima FG, et al. Epidemiological survey of *Trypanosoma cruzi* infection in north-eastern Brazil using different diagnostic methods. *Rev Med Inst Trop São Paulo*, 1991; 33:193-198.
18. Gazzinelli RT, Galvao LM, Cardoso JE, Cancado JR, Kretti AU, Brener Z, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1795-1800.
19. Eagle H. myo-Inositol as an Essential Growth Factor for Normal and Malignant Human Cells in Tissue Culture. *J Biol Chem*, 1956; 214: 845-847



20. Vega S, Náquira C. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Trypanomiosis americana (Enfermedad de Chagas). 2da ed. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2006.
21. Bradford, MM (1976), Método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de la proteína de unión a colorante. *72* :248-254, doi : 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
22. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. A systematic review of high quality diagnosis test for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012; 6(11): e1881.