

Artículo original

Estandarización, validación y aplicación de la inmunofluorescencia indirecta en un estudio epidemiológico de la infección por *Trypanosoma cruzi*

Mariolga Berrizbeitia^{a,b,*}, Nairobi Seijas^c, Jessica Rodríguez^a, Alicia Jorquera^d, Leomery Romero^d

^aPostgrado en Biología Aplicada, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo de Sucre, ^bInstituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Universidad de Oriente (UDO), Cumaná, ^cDepartamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo de Sucre, ^dCentro de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Barcelona, Venezuela.

Recibido 8 de diciembre de 2014; aceptado 27 de enero de 2015

Resumen: En el presente trabajo se estandarizó una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando epimastigotes fijados de *T. cruzi* (aislado MHOM/VE/08/AU), se validó y posteriormente se aplicó para conocer la seroepidemiología de la infección por *T. cruzi* en Río Brito (estado Sucre). Los parásitos se cultivaron en infusión hígado triptosa y se fijaron con formaldehído (2%). Para la validación se usaron 49 sueros confirmados como positivos y 50 negativos para esta infección y para evaluar reacciones cruzadas se analizaron 48 sueros de pacientes confirmados con leishmaniasis cutánea, toxoplasmosis y helmintiasis. La prueba de IFI se aplicó para evaluar 50 muestras de sangre recogidas sobre papel de filtro, provenientes de Río Brito, estado Sucre. Los factores de riesgo epidemiológicos se determinaron a través de la prueba de Fisher y la razón de probabilidades. La IFI fue 100% sensible y 93,9% específica. La seroprevalencia de la infección en la comunidad de Río Brito fue de 16%. Las variables asociadas a la infección fueron el reconocimiento del vector y su presencia alrededor de las viviendas. La seroprevalencia de esta parasitosis es elevada en Río Brito, en donde existen las variables epidemiológicas para mantener el ciclo del parásito.

Palabras clave: inmunofluorescencia indirecta, seroprevalencia, *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, población rural, Venezuela.

Standardization, validation and application of indirect immunofluorescence assay in an epidemiological study of *Trypanosoma cruzi* infection

Abstract: An indirect immunofluorescence assay (IIF) was standardized using fixed epimastigotes of *T. cruzi* (isolate MHOM/VE/08/AU) and after validation was applied to determine the seroepidemiology of *T. cruzi* infection in Río Brito (Sucre State). The parasites were grown in liver infusion tryptose and fixed with formaldehyde (2%). To validate, the test 49 confirmed as positive and 50 as negative for infection sera were used. To assess cross-reactions 48 sera from patients with confirmed cutaneous leishmaniasis, toxoplasmosis and helminthiasis were analyzed. The IIF test was used to evaluate 50 blood samples collected on filter paper, from Río Brito, Sucre state population. The epidemiological risk factors were determined by Fisher's exact test and the odds ratio. The IIF was 100% sensitive and 93.87% specific. The seroprevalence of infection in the community of Río Brito was 16%. The variables associated with infection were the recognition of the vector and its presence around the houses. The seroprevalence of this infection is high in Río Brito, where there are epidemiological variables to maintain the cycle of the parasite.

Keywords: indirect immunofluorescence, seroprevalence, *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, rural population, Venezuela.

* Correspondencia:
E-mail: mberriz@yahoo.com

Introducción

La infección por *Trypanosoma cruzi* es transmitida por el contacto con las deyecciones de los vectores (triatominos) infectados con el parásito, por transfusión sanguínea, de forma congénita, por trasplante de órganos y por transmisión

oral [1-3]. Afecta aproximadamente entre 7 a 8 millones de individuos, los cuales habitan en 21 países considerados endémicos: México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Surinam, Venezuela, Guyana, Guayana Francesa, Colombia, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile, Paraguay, Argentina y

Uruguay [4].

En la infección temprana, *T. cruzi* puede ser detectado en la sangre a través de métodos parasitológicos, como el examen de sangre al fresco, el extendido de sangre coloreado o con el hemocultivo. Una vez que se establece la respuesta inmune a *T. cruzi* y los niveles de parasitemia descienden durante la fase crónica, el diagnóstico de la infección se realiza a través de pruebas inmunológicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI), entre otras [5].

Debido a su alto grado de sensibilidad, la prueba IFI es frecuentemente utilizada conjuntamente con otra prueba serológica para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* [6,7].

Aunque *T. cruzi* no presenta la variabilidad de los tripanosomas africanos, algunos estudios han demostrado variabilidad antigénica entre sus cepas y entre formas evolutivas del parásito, lo cual es determinante en relación a las diferencias de reactividad encontradas en las pruebas diagnósticas que utilizan antígenos de *T. cruzi* [8,9]. En tal sentido, algunos autores afirman que el uso de cepas autóctonas del parásito aumentan la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas [10].

La seroepidemiología de la infección por *T. cruzi* en la región oriental de Venezuela ha sido menos estudiada, si se compara con los diversos trabajos realizados en los estados centro occidentales, los cuales son reconocidos como los más endémicos del país (Portuguesa, Barinas, Yaracuy, Trujillo) [11,12].

Si bien la prueba de IFI es un método diagnóstico ampliamente utilizado para determinar la infección por *T. cruzi*, en el estado Sucre los laboratorios clínicos realizan el despistaje de esta infección basado principalmente en pruebas de ELISA de tipo comercial. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue la estandarización de una prueba de IFI utilizando antígenos autóctonos de *T. cruzi* de la región oriental de Venezuela, su validación a través de la determinación de sus índices diagnósticos y su aplicación en la comunidad rural de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela, lo cual permitió determinar la seroprevalencia y los factores de riesgo epidemiológicos asociados a la infección por *T. cruzi* en esa comunidad rural, así como también ofrecer una herramienta de diagnóstico que estaría disponible en el estado Sucre para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

Materiales y métodos

Aislado de T. cruzi: Se utilizaron formas epimastigotes de *T. cruzi* del aislado MHOM/VE/08/AU. Éste fue obtenido de un paciente con Chagas agudo, en el estado Anzoátegui, y la confirmación taxonómica de la cepa como *T. cruzi* del linaje TcI se realizó por PCR [13].

Muestras de suero: Para la estandarización y validación de la prueba de IFI, se utilizaron sueros de referencia

suministrados por el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico de Chagas (Maracay, Venezuela) y confirmados como positivos (n=49) y negativos (n=50) para la infección por *T. cruzi*. Para evaluar la especificidad de la prueba comprobando la ausencia de las reacciones cruzadas con otras parasitosis se analizaron 10 sueros de individuos confirmados con leishmaniasis cutánea, 34 con toxoplasmosis y con 4 con helmintiasis (*Ascaris lumbricoides* 1, *Strongyloides stercoralis* 1, *Trichuris trichiura* 1, e infección mixta por *A. lumbricoides* y *T. trichiura* 1).

Preparación del antígeno para la prueba de IFI: Los epimastigotes de *T. cruzi* se cultivaron en infusión hígado y triptosa y se recolectaron durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial [14]. Para la obtención de los epimastigotes fijados (2%) se siguió el procedimiento de Guhl y Nicholls [15]. La suspensión antigénica se almacenó a 4-8 °C hasta su uso. Se realizaron diluciones del antígeno de 1/4 a 1/64 en PBS pH 7,6, con la finalidad de conocer la dilución que permitiera observar entre 30-40 parásitos por campo al microscopio óptico [15,16]. La lámina portaobjeto se dividió en ocho cuadrículas con marcador indeleble, y sobre cada una de éstas se repartió el antígeno de *T. cruzi* en forma alterna (15 µL). Las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente por 12 horas, y se procedió a fijar el antígeno con acetona fría por 10 minutos; posteriormente las láminas se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

Estandarización y validación de la prueba de IFI: Se siguió el procedimiento descrito por Camargo [16] con algunas modificaciones. Se realizaron diluciones seriadas de trabajo para la mezcla de controles (positivo y negativo) y el suero de los individuos, desde 1/16 hasta 1/512. Se ensayaron diferentes números de lavados (2 ó 3). Igualmente se realizaron diluciones seriadas del conjugado (anti-IgG conjugada con fluoresceína, Sigma) desde 1/32 hasta 1/128. Las láminas fueron analizadas bajo el microscopio de fluorescencia (Zeiss) utilizando un filtro banda azul de 470-490 nm. La clasificación de la muestra como positiva o negativa obedeció a la presencia o no de parásitos con emisión de fluorescencia (verde manzana). El punto de corte se estableció en la dilución del suero y conjugado que permitió la mejor discriminación entre los sueros positivos y negativos.

Evaluación de la seroprevalencia de la infección por T. cruzi en Río Brito: El centro poblado de Río Brito es una comunidad rural localizada a 12°21'0" de latitud norte y 64°10'60" de longitud este y a una altitud de 71 msnm. La agricultura es la principal actividad económica de esta localidad, siendo su principal producto la semilla de merey. Se solicitó el consentimiento informado de todos los individuos, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente, así como también de los representantes de los menores de edad quienes

voluntariamente participaron en el estudio. Asimismo, para establecer la correspondencia entre variables de riesgo para la infección por *T. cruzi*, se aplicó una encuesta epidemiológica que permitió conocer los datos de edad y sexo de los participantes, así como el grado de conocimiento de la enfermedad, los vectores y las características generales de las viviendas.

De un total de 50 habitantes de la localidad de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre, se recolectaron sobre papel de filtro (Whatman N° 2) muestras de sangre mediante punción capilar, previa antisepsia. La recolección de las muestras se hizo en forma activa en un recorrido a pie de aproximadamente 10 Km, desde la carretera nacional hasta la última vivienda que conforma el poblado. Los confetis de sangre, fueron depositados en tubos para microcentrifuga con 0,1 mL de PBS pH 7,2 durante 60 min. Los tubos fueron centrifugados por 5 min a 1.200 g y el sobrenadante se utilizó para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* por la prueba de IFI estandarizada y por una prueba de ELISA casera [14].

Análisis estadístico: Los datos fueron analizados utilizando los programas Microsoft Excel® 2010 y SPSS versión 15. Se determinó los índices diagnósticos (sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos: VPP y negativos: VPN) de la técnica de inmunofluorescencia indirecta [17]. La asociación entre la infección por *T. cruzi* y las diferentes variables epidemiológicas evaluadas fue determinada mediante la prueba de Fisher a un nivel de confiabilidad de 95%. La razón de probabilidades (del inglés: Odds ratio: OR) se determinó para la evaluación de la probabilidad de la ocurrencia de un evento en presencia o ausencia de un factor de riesgo.

Resultados

Estandarización y validación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI): Las condiciones que permitieron obtener una mejor discriminación entre el control positivo y negativo, durante el proceso de estandarización, para cada uno de los pasos de la prueba fueron: dilución del antígeno 1/16 (esta dilución permitió observar aproximadamente 40 parásitos por campo), anticuerpo primario 1/32, anticuerpo secundario 1/32 y número de lavados: dos. El punto de corte para determinar seropositividad quedó establecido a partir de la dilución del suero 1/32. Diluciones menores o mayores a las establecidas para cada uno de los parámetros observados, daban como resultado reactividad o fondo sucio en la mezcla de sueros utilizados como control negativo o pérdida en la intensidad de la reacción en la mezcla de sueros utilizados como control positivo, respectivamente.

Los 49 sueros provenientes de individuos confirmados como positivos para la infección por *T. cruzi* fueron reactivos en la prueba de IFI (sensibilidad: 100%), mientras que 3/50 de los sueros confirmados como negativos, 2/10 de los sueros procedentes de los individuos con leishmaniasis

cutánea y 1/34 de los sueros de individuos con infección por *Toxoplasma gondii* reaccionaron en la prueba (especificidad: 93,9%). No se observó reacción cruzada con los sueros provenientes de individuos con helmintiasis. Asimismo los valores predictivos positivos y negativos de la prueba fueron 89,1% y 100%, respectivamente.

Seroepidemiología de la infección por *T. cruzi* en la comunidad rural de Río Brito: En el presente estudio se evaluaron 50 individuos, de los cuales 31 fueron del sexo femenino y 19 del sexo masculino. La edad promedio fue de $31,90 \pm 16,98$ años (rango 13-73). Los seropositivos presentaron edades mayores a los 22 años, lo cual indica que en la población estudiada no ha ocurrido transmisión vectorial en niños y adolescentes recientemente.

De los 50 individuos evaluados en la población rural de Río Brito 12 resultaron positivos por ELISA y 8 por IFI. La seroprevalencia de la infección, utilizando el acuerdo entre dos pruebas serológicas con principios distintos fue de 16% (Tabla 1). La prueba de ELISA detectó 4 individuos serorreactivos que resultaron negativos por IFI, y como consecuencia de esta discordancia fueron clasificados con diagnóstico inconcluso.

Las muestras eluidas de papel de filtro que resultaron seropositivas en la comunidad evaluada mostraron una excelente reactividad, lo cual se evidenció por la fuerte emisión de fluorescencia y la elevada densidad óptica de los seropositivos ($1,59 \pm 0,41$, rango: 0,49-2,02) (Tabla 1).

Variables epidemiológicas: De las variables epidemiológicas evaluadas en la comunidad de Río Brito, sólo se encontraron asociadas a la infección por *T. cruzi* haber reconocido el

Tabla 1. Detección de individuos seropositivos a la infección por *T. cruzi* en Río Brito, estado Sucre, utilizando epimastigotes fijados en la prueba de IFI y ELISA.

Prueba de IFI				
Individuos positivos	Individuos negativos	Seroprevalencia por IFI %		
8	42	16%		
Prueba de ELISA				
Individuos	Media (DO)	Desviación estándar	Rango DO (min-máx)	Seroprevalencia por ELISA
Positivos 12	1,59	0,41	0,49-2,02	24%
Negativos 38	0,16	0,06	0,06-0,31	
Concordancia IFI y ELISA				
IFI/ELISA positivos	IFI/ELISA negativos	IFI/ELISA muestras inconclusas		
8/12	42/38	4		

DO: densidad óptica; IFI: inmunofluorescencia indirecta; min: mínimo; máx: máximo; ELISA: ensayo inmunoenzimático.

vector y la presencia de éste alrededor de las viviendas. El reconocimiento del vector por los individuos de la comunidad aumenta 9 veces la probabilidad de infectarse por *T. cruzi*, constituyendo éste un importante factor de riesgo ($p < 0,05$). De las 25 personas que reconocieron al vector, 7 (28%) resultaron seropositivos para la infección por *T. cruzi*, mientras que de los que no lo reconocieron 1 (4%) resultó positivo (OR: 9,30) (Tabla 2).

los pacientes seropositivos a la infección por *T. cruzi* y el conocimiento de la Enfermedad de Chagas, la picadura del vector, la presencia de vectores dentro de las viviendas y el tipo de piso (Tabla 2).

El 90% de la población estudiada manifestó no conocer acerca de la Enfermedad de Chagas. El 11,1% resultó positivo a la infección por *T. cruzi* y del 10% que mencionó conocer la enfermedad, 60% resultó seropositivo, lo cual

Tabla. 2. Factores de riesgo asociados a la infección por *T. cruzi* en la población de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre.

Factor de riesgo	Nº	% Positivos para el factor de riesgo (n)	OR	IC 95%	P
Sexo					
Femenino	31	22,6 (7)	5,25	0,59-46,57	0,10
Masculino	19	5,3 (1)			
Reconocimiento del vector					
Si	25	28 (7)	9,30	1,05-82,78	0,02*
No	25	4 (1)			
Conocimiento de la enfermedad de Chagas					
Si	5	60 (3)	5,55	0,95- 32,4	0,07
No	45	11,1 (5)			
Picadura del vector					
Si	5	40 (2)	4,33	0,59-31,54	0,17
No	45	13,3 (6)			
Vectores dentro de las casas					
Si	9	33,3 (3)	3,60	0,67-9,16	0,14
No	41	12,2 (5)			
Vectores alrededor de las casas					
Si	10	40 (4)	6,00	1,17	0,04*
No	40	10 (4)			
Tipo de piso					
Cemento	34	8,8 (3)	4,70	0,96-22,99	0,06
Tierra	16	31,2 (5)			

OR=razón de proporciones (del inglés: odds ratio), IC=intervalo de confianza, Valor de probabilidad prueba de Fisher p=probabilidad, * significativo $p < 0,05$.

Otro factor que resultó asociado a la infección fue la presencia de triatominos alrededor de las viviendas. La prueba de Fisher demostró que haber visto los vectores alrededor de las casas representa un factor de riesgo para adquirir la infección por *T. cruzi*. Por otra parte, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre

indica que no necesariamente tener conocimiento de esta enfermedad es un factor protector para evitar la infección.

Igualmente, a pesar de que el 22,6% de las mujeres y el 5,3% de los hombres resultaron positivos para el factor de riesgo (Tabla 2), no hubo asociación entre el sexo y la infección por el parásito.

Discusión

La prueba de IFI estandarizada mostró una elevada sensibilidad (100%) y VPN (100%) y aceptable especificidad (93,9%) y VPP (89,1%); se observaron algunas reacciones falsas positivas en el caso de los sueros de referencia negativos y reacciones cruzadas con los sueros provenientes de los individuos con leishmaniasis cutánea y toxoplasmosis. La excelente sensibilidad de la prueba de IFI, ha sido demostrada en diferentes trabajos de investigación; sin embargo, la prueba muestra valores y rangos variables de especificidad (77-98) [6,18]. Entre las limitaciones de la prueba de IFI se encuentra la experiencia del operador, así como también las reacciones cruzadas, en algunos casos, con infección por *Leishmania* spp., evidenciado en 2/10 muestras de suero provenientes de individuos con leishmaniasis cutánea. Este resultado está probablemente relacionado con el hecho de que ambos parásitos, *Leishmania* y *Trypanosoma*, comparten múltiples epítomos de superficie, como es el caso de los residuos de galactosil (alfa 1-3) manosa de las moléculas de glicosilfosfatidil inositol (GPI) de la membrana plasmática [19].

Una vez establecidos los índices diagnósticos de la prueba de IFI, se realizó un estudio seroepidemiológico en la población rural de Río Brito, estado Sucre. La seroprevalencia obtenida en esa comunidad utilizando dos pruebas serológicas como lo recomienda la OMS, fue elevada (16%). Previamente, se ha descrito en esa población una seroprevalencia menor (9%), usando pruebas serológicas diferentes (ELISA y MABA) [20]. Esta diferencia puede deberse a que en el presente estudio la población evaluada estuvo representada por adultos con un promedio de edad mayor al reportado por Berrizbeitia *et al.* [20]. Se ha demostrado que la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi*, se encuentra estrechamente asociada con la edad de las personas [21]. Cabe destacar que en ambos trabajos la técnica de ELISA resultó más sensible que las otras técnicas serológicas usadas (IFI- MABA). Seroprevalencias elevadas de la infección por *T. cruzi* en comunidades rurales, como la encontrada en la presente investigación, han sido reportadas en la localidad de Caballito, estado Lara (24,2%) y en el estado Trujillo (19,2%) [22,23].

En muchas ocasiones la recolección y transporte de muestras de sangre constituye una limitación para la realización de estudios poblacionales. Considerando que se ha demostrado que no existen diferencias significativas al comparar los resultados obtenidos con suero total y eluidos de papel filtro [24,25], en esta investigación dada la condición de lejanía y el difícil acceso a la zona estudiada, la recolección de sangre se realizó en papel de filtro, lo cual resultó un método simple y práctico.

Con respecto a las variables epidemiológicas evaluadas, sólo se encontraron asociadas a la infección por *T. cruzi* el haber reconocido el vector y la presencia de éste alrededor de las viviendas, caso contrario a lo encontrado por Bonfante y col [21], en un trabajo realizado en la parroquia San Miguel

del estado Lara, en donde el reconocimiento del vector no estuvo asociado a la seropositividad.

El resto de las variables epidemiológicas evaluadas no estuvieron asociadas a la infección por *T. cruzi*. Se pudo evidenciar, en trabajos previos, que no existe un consenso de la asociación de estas variables y la infección, encontrando diferentes factores, predictores o no, de acuerdo a las variables estudiadas, el tipo de población y la zona geográfica evaluada; en tal sentido, Feliciangeli *et al.* [26] describieron que la estructura de la vivienda no parece ser el principal factor asociado a la infección por *T. cruzi* en el estado Barinas; sin embargo, en ese trabajo vivir en un domicilio con piso de tierra fue un predictor positivo para la infección por el parásito, lo cual no coincide a lo encontrado en la presente investigación ni con el trabajo realizado por Serrano y col [27]. Cannova y col establecieron una alta prevalencia de la infección por *T. cruzi* (14,8%) en Las Cuevas (estado Carabobo) y aunque no demostraron asociación entre los factores de riesgo evaluados y la infección, describieron que todos los seropositivos habitaban en ranchos con paredes de bahareque [28].

En la presente investigación tener conocimiento acerca de la Enfermedad de Chagas no fue un factor protector para evitar la infección. Estos resultados concuerdan con otro estudio en el cual el 60% de la comunidad encuestada, a pesar de conocer y haber visto al vector, no conocía la enfermedad transmitida por éste ni sus repercusiones en la salud [27]. De igual manera, en la colonia Laurel, departamento San Roque en Argentina, se encontró un grado de desconocimiento insuficiente o nulo sobre esta enfermedad y el principal vector doméstico que la transmite [29].

El tipo de piso de tierra y las paredes irregulares de las viviendas constituye un importante albergue para los triatomíneos, favoreciendo su presencia dentro de éstas; aun cuando en la presente investigación estos factores no estuvieron asociados a la infección por *T. cruzi*, lo cual posiblemente se deba a la especie de triatómino involucrado en la transmisión en Río Brito (*Panstrongylus geniculatus*), el cual es capaz de visitar las viviendas para alimentarse sin necesidad de domiciliación [20]. Sin embargo, en Venezuela se ha reportado un mayor número de triatomíneos infectados en casas cuyos techos son de palmas y los pisos son de tierra [30]. Igualmente, a pesar de que el 22,6% de las mujeres y el 5,3% de los hombres resultaron positivos para el factor de riesgo, no hubo asociación entre el sexo y la infección por el parásito; este resultado pudo deberse al tamaño de la muestra evaluada. Adicionalmente, hubo una mayor proporción de mujeres con respecto a los hombres.

Conclusiones

La prueba de IFI estandarizada, utilizando los antígenos de epimastigotes fijados, mostró una excelente sensibilidad y aceptable especificidad, por lo tanto demostró su utilidad como método diagnóstico en estudios epidemiológicos y como prueba complementaria junto a otra técnica

serológica convencional. El almacenaje y transporte de muestras en papel de filtro resultó muy práctico. Por otra parte, la seropositividad de la infección por *T. cruzi* en la comunidad de Río Brito fue elevada y estuvo asociada al reconocimiento del vector y su presencia alrededor de las viviendas. Finalmente, los datos obtenidos en la presente investigación parecieran indicar que, al presente, no existe transmisión activa de la infección por *T. cruzi*, en esta población del estado Sucre.

Agradecimientos

A Steven Bloomst y Robert Albert de la fundación SERVYR por el apoyo en la logística para la recolección de las muestras en la comunidad de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre y la Lcda. Mehudy Medina por la donación de los sueros confirmados para infección por *T. cruzi* en el Laboratorio de Referencia Nacional de Inmunodiagnóstico para la Enfermedad de Chagas, (Maracay, estado Aragua). Este trabajo fue financiado por FONACIT (Misión Ciencias, proyecto N° 2007001425).

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no hay conflicto de intereses.

Referencias

1. Alarcon de Noya B, Diaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R *et al.* Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis.* 2010; 201:1308-15.
2. Flores-Chavez M, Fernandez B, Puente S, Torres P, Rodriguez M, Monedero C *et al.* Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis.* 2008; 46:44-7.
3. Russomando G, Almiron M, Candia N, Franco L, Sanchez Z, de Guillen I. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 8:49-54.
4. World Health Organization. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/. Acceso 25 de mayo de 2013.
5. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6:1881.
6. Añez N, Romero M, Crisante G, Bianchi G, Parada H. Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela. *Bol Malariol Salud Amb.* 2010; 50:17-27.
7. Flores-Chavez M, Cruz I, Rodriguez M, Nieto J, Franco E, Garate T, *et al.* Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28:284-93.
8. Cazzulo J, Frasc A. SAPA/trans-sialidase and cruzipain antigens from *Trypanosoma cruzi* contain immunodominant but enzymatically inactive domains. *FASEB J.* 1992; 6:3259-64.
9. Montiel G, Díaz G. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev Med Hosp Nac.* 2002; 37:57-63.
10. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino M. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Invest.* 1999; 28:257-68.
11. Añez N, Crisante G, Rojas A. Update on Chagas disease in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99:781-7.
12. Rodríguez-Bonfante C, Amaro A, García M, Mejías Wohler LE, Guillén P, García RA, y col. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Eloy Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad Saude Publica.* 2007; 23:1133-40.
13. Morocoima A, Tineo E, Ferrer E, Herrera L, Núñez M. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui. Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol Malariol Salud Amb.* 2008; 48:121-6.
14. Berrizbeitia M, Ndao M, Gottschalk M, Ache A, Vasquez F, Lacouture S, *et al.* Development and comparison of enzyme immunoassays for diagnosis of Chagas' disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes, and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1766-9.
15. Guhl F, Nicholls S, editors. (2001). Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bogotá, DC: Quebecor Impresores; 2001.
16. Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1966; 8:227-35.
17. Gordis L. *Epidemiology.* Third edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2004.
18. Duarte AM, de Andrade HM, do Monte SJ, de Toledo Vde P, Guimaraes TM. Assessment of chemiluminescence and PCR effectiveness in relation to conventional serological tests for the diagnosis of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39:385-7.
19. Avila JL, Rojas M. A galactosyl (alpha 1-3) mannose epitope on phospholipids of *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* is recognized by trypanosomatid-infected human sera. *J Clin Microbiol.* 1990; 28:1530-

- 7.
20. Berrizbeitia M, Ward BJ, Bubis J, Gottschalk M, Ache A, Perdomo D, *et al.* 85-kDa protein of *Trypanosoma cruzi* purified by affinity chromatography used in the multiple antigen binding assay (MABA) for the diagnosis of *T. cruzi* infection in a Venezuelan rural community. *Parasitol Res.* 2010; 106:1127-34.
21. Bonfante-Cabarcas R, Rodríguez-Bonfante C, Vielma BO, García D, Saldivia AM, Aldana E, y col. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y factores asociados en un área endémica de Venezuela. *Cad Saude Publica.* 2011; 27:1917-29.
22. Sandoval I, Añez N, Villegas E, Scorza JV. Persistencia de la transmisión de la enfermedad de Chagas sin colonización por el vector conocido, en localidades controladas de Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol.* 2003; 23:166-8.
23. Traviezo L, Bonfante R. Estudio seroepidemiológico de la enfermedad de Chagas en la localidad de Caballito, municipio Simón Planas, estado Lara. Venezuela. *Parasitol Latinoam.* 2004; 59:46-54.
24. Briceño D, Caballero G, Lares M, Vietri M, Medina M, Ferrer E. Diagnóstico inmunológico de la enfermedad de Chagas a partir de muestras colectadas en papel de filtro. *Salus.* 2012; 16:43-52.
25. Palacios X, Belli A, Espino A. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante Elisa indirecto e IFI en muestras de sangre en papel filtro. *Rev Panam Salud Publica.* 2000; 8:411-7.
26. Feliciangeli MD, Sanchez-Martin MJ, Suarez B, Marrero R, Torrellas A, Bravo A, *et al.* Risk factors for *Trypanosoma cruzi* human infection in Barinas State, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76:915-21.
27. Serrano O, Mendoza F, Suárez B, Soto A. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en dos localidades del municipio Costa de Oro, estado Aragua, Venezuela. *Biomedica.* 2008; 28:108-15.
28. Cannova D, Leidy A, Simons M. Seroepidemiología de Tripanosomiasis Americana sector Las Cuevas Estado Carabobo. *Salus.* 2003; 7:28-33.
29. Bar M, Damborsky M, Oscherov E, Wisnivesky C. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en San Roque, Corrientes. Infestación por triatominos y seroprevalencia humana. *Medicina.* 2005; 65:97-102
30. Feliciangeli MD, Carrasco H, Patterson JS, Suarez B, Martinez C, Medina M. Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stal, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71:501-5.