

**ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE TRIPOMASTIGOTES DE
Trypanosoma cruzi (TESA) COMO HERRAMIENTAS ÚTILES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS**

**TRYPOMASTIGOTE OF *Trypanosoma cruzi* EXCRETED/SECRETED ANTIGENS (TESA)
AS USEFUL TOOLS FOR THE DIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE**

MARIOLGA BERRIZBEITIA

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Postgrado en Biología Aplicada, Laboratorio de Diagnóstico Serológico en Enfermedades Infecciosas, Instituto en Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, Laboratorio de Inmunoparasitología. E-mail: mberriz@yahoo.com

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria causada por *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* y es transmitida principalmente al hombre por la picadura de insectos hematófagos, por transfusiones de sangre contaminada, verticalmente de la madre al feto, por trasplantes de órganos, accidentes en laboratorios y por alimentos contaminados con heces u orina de los triatominos. Hasta el momento no existe una prueba estándar de oro para el diagnóstico de esta parasitosis. Diferentes fracciones proteicas de *T. cruzi* se han empleado en las pruebas de diagnóstico, de esas los antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) representan una excelente alternativa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas por su elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. Algunas proteínas de TESA de *T. cruzi* son clasificadas como transilidasas, las cuales están involucradas en la penetración del parásito a la célula del hospedador. Estas proteínas estimulan la respuesta de las células B en individuos en la fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas.

PALABRAS CLAVE: Kinetoplastida, Trypanosomatidae, pruebas serológicas.

ABSTRACT

Chagas' disease is a parasitic zoonosis caused by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and it is mainly transmitted through the bite of a vector, contaminated blood transfusion, vertically from mother to fetus, organ transplantation, laboratory accidents, and contaminated food by feces or urines from triatomine bugs. Until now there is no gold-standard test for the diagnosis of Chagas' disease. Different protein fractions has been employed in the diagnostic assays, among them the excreted/secreted antigens from *T. cruzi* tripomastigotes (TESA) represent an excellent alternative for Chagas disease diagnosis due to the high sensitivity and specificity of TESA. Some proteins of TESA are classified as transilidasas that are responsible of *T. cruzi* penetration to host cells. These antigens stimulate B-cell response in individuals with acute and chronic Chagas' disease.

KEY WORDS: Kinetoplastida, Trypanosomatidae, serological assays.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria causada por *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, un protozoo hemoflagelado perteneciente a la familia Kinetoplastida. La infección es transmitida por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, de los cuales los más importantes desde el punto de vista epidemiológico lo constituyen 69 especies de *Triatoma* sp., 13 especies de *Panstrongylus* sp. y *Rhodnius* sp. (Lent y Wygodzinsky 1979). Los reservorios de esta parasitosis son mamíferos de pequeño y mediano tamaño. Entre los silvestres se encuentran los armadillos, marsupiales (*Didelphis* sp.), roedores, murciélagos y primates silvestres, además de animales domésticos como perros, gatos y ratas. Una mayor prevalencia de la enfermedad se encuentra en las regiones rurales más pobres de América Latina.

Los mecanismos de transmisión del parásito al hombre incluyen la picadura por los vectores hematófagos, las transfusiones sanguíneas, transmisión vertical de la madre al feto, ingestión de alimentos contaminados con heces u orinas de los triatominos, trasplante de órganos y accidentes en el laboratorio (WHO 2010).

La importancia de la enfermedad de Chagas radica en su elevada prevalencia en Latinoamérica y la presencia actual de ésta en regiones no endémicas debido a la migración de individuos infectados hacia norte América, Europa y Asia (Tanowitz *et al.* 2011). Además la ausencia de una droga que sea 100% eficaz y sin efectos secundarios adversos, las grandes pérdidas económicas ocasionadas por la incapacidad laboral de quienes padecen esta parasitosis, la ausencia de vacunas y la intervención del hombre en la naturaleza invadiendo el nicho ecológico de los triatominos transmisores, hacen de la enfermedad de Chagas una parasitosis de difícil

control, manejo y tratamiento (WHO 2010).

Actualmente en Latinoamérica existen 7.694.500 individuos infectados, 25 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad, ocurren 41.200 casos nuevos cada año y la prevalencia de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica es de aproximadamente 1,45% (PAHO 2007). Desde el punto de vista de clasificación de la enfermedad de Chagas, se definen tres fases bien diferenciadas. Inicialmente una fase aguda la que se presenta generalmente como un síndrome febril prolongado en algunos acompañado de otros síntomas inespecíficos como edema, vómitos, esplenomegalia, hepatomegalia, hipertrofia de ganglios linfáticos, entre otros. Igualmente de un 30% a 80% de los casos pueden observarse signos de puerta de entrada como el signo de romaña, caracterizado por edema unipalpebral o bipalpebral; al igual que el chagoma de inoculación que no es más que una lesión eritematosa en el sitio de la picadura. Éstos en algunos casos orientan el diagnóstico en zonas donde la parasitosis es endémica. En este período la probabilidad de recuperar el parásito en sangre es más elevada (Tanowitz *et al.* 1992).

El período latente o indeterminado, segunda fase de la enfermedad de Chagas, tiene una duración media de 10 años, la parasitemia es baja y no hay presencia de síntomas aparentes. El diagnóstico se realiza principalmente a través de pruebas serológicas de laboratorio en las cuales se buscan anticuerpos producidos contra el parásito. En esta fase el examen radiológico y el electrocardiograma convencional arrojan resultados normales lo que en muchos casos da lugar a resultados erróneos y enmascaramiento de la enfermedad (Botero y Restrepo 2003). En la fase crónica de 30 a 40% de los pacientes chagásicos desarrollan una enfermedad inflamatoria que comúnmente resulta en cardiomiopatías y disfunciones del tracto gastrointestinal (Tanowitz *et al.* 1992). Sin embargo, recientemente se reclasificó la enfermedad en sólo dos fases: aguda y crónica, la cual puede presentarse con o sin patología demostrada, esta clasificación fue objeto de estudio en el consenso internacional sobre la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas, llevado a cabo en Buenos Aires, Argentina (OMS 2007).

RESEÑA HISTÓRICA DEL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La primera prueba serológica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas fue introducida por Machado y Guerreiro en 1913 (fijación de complemento: FC) (Guerreiro y Machado 1913). Más tarde, Fife y Muschel

(1959) describieron la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico de la enfermedad, y Romaña (1961) utilizó la hemaglutinación indirecta (HAI) (Fife y Muschel 1959, Romaña 1961). A partir de la década de los 70 fue el ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA), descrito originalmente por Engvall y Perlmann en 1971 (Engvall y Perlmann 1971), el cual comenzó a implementarse para el diagnóstico de elección serológico para la infección por *T. cruzi*. En el caso de Venezuela, la adopción del tamizaje universal para la infección por *T. cruzi* en los bancos de sangre públicos y privados se estableció en el año de 1988 a través de esta prueba (Aché 1993). Las ventajas de la prueba de ELISA incluyen: simplicidad, sensibilidad, bajo costo, los resultados pueden ser leídos cuantitativamente, y es adaptable a estudios de campo (Spencer *et al.* 1980). Por lo tanto, los antígenos de *T. cruzi* en el formato de ELISA constituyen la prueba de elección para ser utilizada en los bancos de sangre.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas desde su descubrimiento hasta 1960, se realizó empleando los métodos parasitológicos como el xenodiagnóstico, y serológicos para la fase crónica de la enfermedad como la prueba de fijación del complemento (Guerreiro y Machado 1913, Brumpt 1914). El progreso más importante para el diagnóstico de esta parasitosis ocurrió entre 1960-1975. Para el diagnóstico de la fase aguda, durante este período se introdujo el método de concentración de Strout, el cual permitió elevar la sensibilidad de los métodos tradicionales parasitológicos como el examen directo y la inoculación en animales de experimentación. Igualmente durante esta década, para el diagnóstico parasitológico de la fase crónica se incluyó el hemocultivo (Chiari y Brenner 1966). Y para el caso del diagnóstico serológico la estandarización de la FC, la introducción de la HAI, la IFI y la prueba de ELISA (Cerisola *et al.* 1962, Camargo 1966, Voller *et al.* 1975).

Desde 1975 hasta la actualidad se ha utilizado elevada tecnología para el enfoque parasitológico y serológico de la enfermedad de Chagas. El diagnóstico parasitológico ha mejorado con la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: "polymerase chain reaction") (Moser *et al.* 1989, Britto *et al.* 1999, Virreira *et al.* 2006) y la PCR en tiempo real (Virreira *et al.* 2006, Piron *et al.* 2007, Duffy *et al.* 2009). Sin embargo, hasta el momento no existe un prueba estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas; por tal motivo, la Organización Panamericana de la Salud recomienda el uso de pruebas serológicas con principios distintos para confirmar el diagnóstico de

infección por *T. cruzi* (Carvalho *et al.* 1993).

Diagnóstico de la infección por *T. cruzi* según la fase de la enfermedad de Chagas

En la práctica clínica, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa típicamente en métodos parasitológicos convencionales (examen al fresco y gota gruesa de sangre, hemocultivo y xenodiagnóstico) y los métodos serológicos. El diagnóstico durante la fase aguda de la enfermedad, se realiza empleando los métodos parasitológicos. Adicionalmente durante esta fase, se pueden emplear otros métodos pocos convencionales como lo son los aspirados de ganglio linfático y de médula ósea, el líquido pericárdico y el líquido cerebroespinal (Botero y Restrepo 2003). Cuando estos métodos fallan en detectar a *T. cruzi* en un paciente cuya sintomatología clínica sugiere que el parásito está presente, se pueden emplear los métodos de concentración o el cultivo (Manson-Bahr y Apted 1982). El hemocultivo se realiza cultivando sangre entera en el medio de Nicolle-Novy-MacNeal (NNN). El xenodiagnóstico consiste en alimentar insectos reduvídeos con sangre del paciente posiblemente infectado. Posteriormente, 30 a 40 días después de la ingesta de sangre, el tracto intestinal del insecto se verifica para comprobar la presencia de parásitos (Tanowitz *et al.* 1992).

Aunque la PCR ha sido útil para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, su uso en laboratorios de diagnóstico y en bancos de sangre no es ideal, porque este ensayo es laborioso, costoso y no es conveniente para el procesamiento de numerosas muestras. La PCR puede tener también una sensibilidad limitada detectando una infección crónica (Britto *et al.* 1995, Kirchoff *et al.* 1996).

Los métodos parasitológicos son insuficientes para el diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, debido a la intermitencia del *T. cruzi* en la sangre. En estas fases de la enfermedad, la serología llega a ser crítica en combinación con los datos clínicos y epidemiológicos del individuo (Breniere *et al.* 1985). Debido a la ausencia de un método serológico 100% confiable, la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* se basa en el uso de pruebas que utilizan diferentes metodologías. Los métodos más utilizados son la prueba de ELISA, la HAI y la IFI (Wendel y Biagini 1995, Salles *et al.* 1996). Las reacciones cruzadas y los resultados inconclusos se dan principalmente con pacientes infectados con *Leishmania* sp. (Salles *et al.* 1996, Marcon *et al.* 2002). Para mejorar el desempeño de las

pruebas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, el empleo de gran variedad de moléculas del parásito han sido propuestas como fracciones antigénicas para el diagnóstico de esta parasitosis: GP90 (lectina purificada) (Schechter *et al.* 1983), una cisteína proteinasa (GP57/51) la cual es liberada durante la metacicloogénesis (Bonald *et al.* 1991), grp78 (proteína de choque térmico), la cual es producida por *T. cruzi* durante la infección (Krautz *et al.* 1998), antígenos fijados (Berrizbeitia *et al.* 2004, Berrizbeitia *et al.* 2006a), la ubiquitina del parásito (Telles *et al.* 2003), algunas moléculas recombinantes (Umezawa *et al.* 2003, Marcipar *et al.* 2004, Marcipar *et al.* 2005, Gomes *et al.* 2009) y los antígenos excretados/secretados de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* (TESA) (Umezawa *et al.* 1996a, Kesper *et al.* 2000, Nakazawa *et al.* 2001, Umezawa *et al.* 2001, Matsumoto *et al.* 2002, Berrizbeitia *et al.* 2006, Berrizbeitia *et al.* 2006b).

ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN/SECRECIÓN DE TRIPOMASTIGOTES DE *T. cruzi* (TESA)

Las formas tripomastigotes del *T. cruzi* excretan y secretan una amplia variedad de polipéptidos al medio de cultivo celular. El uso de TESA ha sido descrito en varios formatos de diagnóstico diferentes (Umezawa *et al.* 1996b, Kesper *et al.* 2000, Nakazawa *et al.* 2001, Umezawa *et al.* 2001, Berrizbeitia *et al.* 2006a, Berrizbeitia *et al.* 2006b, Berrizbeitia *et al.* 2010b). El elevado desempeño de esos antígenos se debe a que los tripomastigotes de *T. cruzi* son las formas que se encuentran en el torrente sanguíneo de los individuos infectados, por lo tanto; sus antígenos generan una respuesta inmunitaria más específica y por consiguiente menores reacciones falsas positivas y/o cruzadas en las pruebas que se utilizan para el diagnóstico (Aznar *et al.* 1997). Los sueros de individuos en fase crónica de la enfermedad de Chagas reconocen principalmente los polipéptidos de TESA de elevada masa molar (Fig. 1).

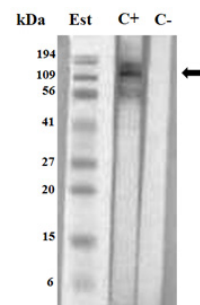


Figura 1. Polipéptidos de TESA blot reconocidos por una mezcla de sueros con infección por *T. cruzi* (C+). El revelado se realizó por diaminobenzidina. Est: estándar marcador de peso molecular. C+: control positivo, C-: control negativo. La flecha indica la banda de aproximadamente 150 kDa inmunoreactiva de TESA.

Algunas proteínas TESA de *T. cruzi* pertenecen a la familia de las transialidasas del *T. cruzi* (TS), las cuales son responsables de la transferencia de ácido siálico exógeno a moléculas receptoras en la superficie del tripomastigote, un acontecimiento crítico en la penetración del parásito (Cross y Takle 1993). La región N-terminal de las TS incluye el dominio catalítico, y la porción C-terminal contiene 12 aminoácidos repetidos. Ambas regiones estimulan las respuestas de la célula B en pacientes con enfermedad de Chagas aguda y crónica (Jazin *et al.* 1991, Cross y Takle 1993). En contraste, los antígenos “shed acute-phase antigens” (SAPA) presentes en TESA estimulan la producción de anticuerpos perceptibles principalmente durante la fase aguda de la enfermedad (Jazin *et al.* 1991).

Utilidad de TESA en diferentes pruebas de diagnóstico

Existen numerosos trabajos que han demostrado el excelente desempeño de TESA de *T. cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La primera prueba serológica que utilizó estos antígenos fue descrita por Umezawa *et al.* (1996a). En ese trabajo se evaluaron un total de 512 individuos, de los cuales 111 eran no chagásicos y 401 individuos chagásicos, igualmente se incluyeron individuos con leishmaniasis y otras patologías. De los individuos chagásicos, 361 se encontraban en la fase crónica de la enfermedad, 36 en fase aguda y 4 casos congénitos. De los individuos en fase crónica, 256 provenían de diferentes regiones de Brasil, en donde *T. cruzi* es endémico, pero con diferentes expresiones de patogenicidad y niveles de parasitemia. Este grupo de individuos presentaban diferentes márgenes de reactividad (bajo, medio y alto) en las pruebas convencionales, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (ELISA e IFI). De tal modo, se contó con una muestra representativa de sueros para evaluar esos antígenos. Como resultado, usando TESA en el formato de Western blot (TESA-blot), el suero de los individuos en fase aguda reconoció bandas en el margen de 130 a 200 kDa, mientras que el suero (IgG) de pacientes crónicos reconoció principalmente las bandas de 150 a 160 kDa. Los sueros, de sujetos sanos y de pacientes con leishmaniasis, no reaccionaron con estos antígenos en ese estudio. Por lo tanto, el TESA-blot fue 100% sensible y específico, demostrando su utilidad en el diagnóstico de los casos agudos, congénitos y crónicos de la enfermedad de Chagas.

Posteriormente, Umezawa *et al.* (2001) emplearon TESA en el formato de ELISA, en ese trabajo se evaluaron 120 individuos (67 casos chagásicos crónicos y 53 agudos), y 164 sujetos no chagásicos (30 donantes

de sangre, 53 pacientes con leishmaniasis y 81 con enfermedades no relacionadas). La sensibilidad y especificidad del TESA-ELISA, utilizando la cepa Y, fue 100% y 96,34%, respectivamente. Todos los anticuerpos de IgM presentes en el suero de pacientes agudos reconocieron a TESA (TESA-ELISA IgM sensibilidad: 100%). Con esos resultados se demostró que TESA en el formato de ELISA mantiene su sensibilidad pero disminuye la especificidad en comparación cuando se utilizan en la prueba de Western blot.

Kesper *et al.* (2000) infectaron la línea celular LLC-MK2 con 5 cepas y 10 aislados de *T. cruzi*, TESA de *T. cruzi* fue reconocido por sueros de pacientes chagásicos, encontrando 13 patrones de reconocimiento diferentes en el Western blot (WB). Igualmente, TESA mostró un único patrón de bandas, que aparece para cada cepa o aislado, sugiriendo que el WB puede ser instrumento útil para la caracterización de cepas y aislados de *T. cruzi*. Mientras que Nakasawa *et al.* (2001) evaluaron la utilidad del uso de TESA empleando cuatro cepas de *T. cruzi* de diferentes biodemos, encontrando que la intensidad de la reacción a los diferentes antígenos fue variable, pero con un patrón similar de reactividad. El suero de pacientes crónicos chagásicos reaccionó con las bandas de 150 a 170 kDa en el TESA-blot usando las cepas Y, WSL, 12SF, y Colombiana. Los polipéptidos por debajo de 150 kDa fueron responsables de las reacciones cruzadas con la leishmaniasis visceral y cutánea. Igualmente, en ese trabajo se estandarizó un prueba TESA-ELISA, la cual fue 100% sensible y 96% específica.

Asimismo, Berrizbeitia *et al.* (2006b) estandarizaron un TESA-ELISA utilizando dos cepas diferentes de *T. cruzi* (Tulahuen y Brasil). En ese estudio se evaluaron 709 sueros, de los cuales 195 fueron de individuos confirmados con enfermedad de Chagas en fase crónica, 234 sueros de individuos aparentemente sanos y 114 sueros provenientes de individuos con diferentes parasitosis (leishmaniasis, schistosomiasis, toxoplasmosis, malaria, triquinosis, cisticercosis, fasciolosis, filariasis). La sensibilidad del TESA-ELISA estandarizado para ambas cepas fue 100%, mientras que la prueba presentó 99, 42% de especificidad para la cepa Brasil y 99, 61% para la cepa Tulahuen. En ese trabajo posiblemente se mejoró la especificidad de TESA-ELISA, comparada con trabajos previos, al concentrar las proteínas por ultracentrifugación (Amicon Ultra, Millipore, Billerica, USA) y de esta manera se conservaron las bandas de elevada masa molar, que han sido descritas como las más inmunoreactantes (150-170 kDa) y se eliminaron las proteínas de bajo peso molecular responsables de las reacciones cruzadas (Nawasawa *et al.*

2001, Berrizbeitia *et al.* 2006a). Esos autores describen que una de las grandes ventajas de TESA de *T. cruzi* es su elevado rendimiento antigénico. La concentración de 5 mL de TESA resulta en una concentración proteica de aproximadamente 850 µg/mL, lo cual permite sensibilizar 420 placas de ELISA y realizar aproximadamente 4.200 pruebas. Sin embargo, una de las limitaciones de TESA de *T. cruzi* es su producción; la cual es costosa, ya que requiere de una infraestructura adecuada. Estas proteínas se obtienen infectando líneas celulares, para lo cual se necesita un personal con un adecuado entrenamiento para el mantenimiento e infección de estas líneas, ya que todo se debe realizar en medidas extremas de esterilidad (Berrizbeitia *et al.* 2006a).

Otros trabajos han utilizado TESA en otros formatos de diagnóstico diferentes a la prueba de ELISA y WB. Coelho *et al.* (2007) estandarizaron una prueba multianálítica Dot-ELISA para el diagnóstico simultáneo de infección por *T. cruzi*, *Treponema pallidum*, *Plasmodium falciparum* y *P. vivax*. Los antígenos utilizados en esta prueba fueron el extracto alcalino de la forma epimastigote de *T. cruzi* (EAE) y TESA de *T. cruzi*. De igual modo, para el diagnóstico de malaria el antígeno recombinante (19 kDa) derivado de la proteína de superficie del merozoito de *P. vivax* (PvMSP119), y el extracto Zwittergent® de *P. falciparum* (Pf-Zw), y para el diagnóstico de sífilis el extracto Zwittergent® (Tp-Zw) de *T. pallidum*. El Dot-ELISA TESA para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* fue 100% sensible y 95% específico.

Igualmente, Berrizbeitia *et al.* (2010b) estandarizaron una prueba de enlace de múltiples antígenos (MABA) utilizando TESA de *T. cruzi* y una proteína de 85 kDa purificada de TESA por cromatografía de afinidad, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El MABA estandarizado, con un número limitado de sueros (n = 52), fue 100% sensible y específico. En ese mismo trabajo, se validó la prueba en un estudio epidemiológico en la comunidad de Río Brito, municipio Sucre, estado Sucre. Seis de un total de 66 individuos resultaron positivos para infección por *T. cruzi*. En esa investigación quedó demostrado que la proteína de 85 kDa purificada de TESA, y TESA de *T. cruzi* pueden ser usados en el formato de MABA, como herramienta complementaria para el diagnóstico de esta parasitosis.

Metodologías empleadas para mejorar la especificidad de TESA

Con la finalidad de mejorar la especificidad de

TESA se han utilizado técnicas de biología molecular o cromatográficas, para la obtención de antígenos recombinantes o purificados. Este es el caso del trabajo realizado por Matsumoto *et al.* (2002), en donde se logró clonar un péptido (TESA-1) perteneciente a la fracción TESA de 150 a 160 kDa. Sin embargo, a pesar de que la especificidad del Western blot fue de 93,30%, los antígenos recombinantes de TESA obtuvieron una sensibilidad baja (82,20%).

Se empleó la cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa B4-IgG de individuos chagásicos, con la finalidad de purificar TESA de *T. cruzi*. Con este método cromatográfico, se logró la purificación de cinco bandas inmunogénicas de 220, 170, 120, 85 y 60 kDa. En la prueba de WB con las proteínas purificadas de TESA, se evaluaron 36 sueros, 17 de ellos provenían de individuos confirmados con enfermedad de Chagas, 9 sueros individuos sanos y 11 de individuos con leishmaniasis cutánea. El WB resultó ser 100% sensible, sin embargo, 3 de los 10 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea reaccionaron con una banda de 60 kDa (Berrizbeitia *et al.* 2006a). Este hallazgo demostró que esta banda polipeptídica es parcialmente responsable, de las reacciones cruzadas con *Leishmania* sp., lo cual concuerda a lo reportado por Nakasawa *et al.* (2001) quienes reportan las bandas de bajo peso molecular de TESA como las responsables de las reacciones cruzadas. Asimismo, en ese trabajo se estandarizó un TESA-ELISA con las proteínas purificadas y la prueba aumentó su especificidad (100%) pero la sensibilidad se redujo al 98% (Berrizbeitia *et al.* 2006a). Posteriormente se empleó la cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarosa B4-concanavalina A, con esta técnica se logró purificar 3 bandas de aproximadamente 220, 170 y 20 kDa, las cuales fueron visualizadas en el gel teñido con Coomassie coloidal, mientras que el suero de individuos con infección por *T. cruzi* reconocieron 5 bandas inmunogénicas 220, 120, 85, 50 y 32 kDa. Sin embargo, con las técnicas cromatográficas de purificación aun cuando se puede mejorar la especificidad de los antígenos se disminuye su rendimiento proteico, lo cual representa una limitación cuando se quiere utilizar estos antígenos purificados en las pruebas de diagnóstico convencionales (Berrizbeitia *et al.* 2010a). Con lo descrito previamente queda demostrado que las técnicas de purificación o la biología molecular aumentan la especificidad de TESA, sin embargo, disminuyen su sensibilidad, este último parámetro es crucial cuando se realiza diagnóstico de la infección por *T. cruzi* sobre todo en bancos de sangre de países endémicos.

TESA-blot COMO PRUEBA CONFIRMATORIA

Debido a la elevada sensibilidad y especificidad de TESA demostrada en los diferentes formatos de diagnóstico (Tabla 1), el TESA-blot es la prueba de

elección confirmatoria en muchos bancos de sangre de Brasil y en el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta) (Flores-Chávez *et al.* 2010).

Tabla 1. Resumen de la utilización de los antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes (TESA) en diferentes formatos para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

Antígeno	TP	Sen (%)	Esp (%)	Autor
TESA (cepa Y)	TESA-blot	100	100	Umezawa <i>et al.</i> 1996a
TESA (cepa Y)	ELISA	100	96,4	Umezawa <i>et al.</i> 2001
TESA (cepas: Y, WSL, 12S y colombiana)	ELISA	100	96	Nakazawa <i>et al.</i> 2001
TESA-1, péptido recombinante (cepa G)	TESA-blot	82,2	93,3	Matsumoto <i>et al.</i> 2002
TESA (cepa Tulahuen)	ELISA	100	99,6	Berrizbeitia <i>et al.</i> 2006b
TESA (cepa Brasil)	ELISA	100	99,4	Berrizbeitia <i>et al.</i> 2006b
*TESA purificado (220, 170, 120, 85 y 60 kDa)	ELISA	98,	100	Berrizbeitia <i>et al.</i> 2006a
TESA	DOT-ELISA	100	99	Coelho <i>et al.</i> 2007
TESA (cepa Tulahuen)	MABA	100	100	Berrizbeitia <i>et al.</i> 2010b

TP: tipo de prueba, Sen: sensibilidad, Esp: especificidad, TESA: antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes de *T. cruzi*, MABA: prueba enlazante de múltiples antígenos, %: porcentaje.*: Proteínas purificadas de TESA por cromatografía de afinidad.

Aunque el TESA-blot es altamente sensible y específico no es un método que puede ser utilizado de rutina para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, específicamente en laboratorios en donde se analicen una gran cantidad de muestras sanguíneas, como es el caso de los bancos de sangre. Por lo tanto, esta prueba se emplea como prueba secuencial, para mejorar la especificidad del diagnóstico (Gordis 2004). Diferentes estudios muestran la utilidad del TESA-blot como prueba confirmatoria. En un trabajo realizado en el Hospital “Parkland Memorial” (Texas, USA) se analizaron 500 muestras de suero provenientes de individuos de origen latino, la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* fue de 0,04% (1/500), empleando una prueba de ELISA comercial (Hemagen Chagas´ kit-EIA method). En ese trabajo se seleccionaron aleatoriamente 50 muestras, entre ellas la que resultó positiva por ELISA, y fueron enviadas para ser confirmadas por Chagatest- ELISA recombinante, IFI y TESA-blot, en el Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC, Atlanta, USA), la prueba de TESA-blot confirmó la positividad de la muestra y resultó negativa para el resto de los sueros analizados (n = 49) (Arena *et al.* 2011).

Furuchó *et al.* (2008) evaluaron 60 muestras de individuos chagásicos, 40 provenientes de individuos con resultados inconclusos para la infección por *T. cruzi* y 41 de individuos no chagásicos. Los sueros fueron evaluados por una prueba de ELISA que utilizó un extracto alcalino de epimastigotes de *T. cruzi* (ELISA-EAE), por una prueba de ELISA quimioluminiscente que empleó un antígeno glicoconjugado purificado de tripomastigotes (CL-ELISA), por un ensayo linfoproliferativo y por TESA-blot. La combinación de los resultados del TESA-blot y el ensayo linfoproliferativo aumentó el número de resultados positivos en el grupo de sueros inconclusos. En ese estudio se confirmó la elevada sensibilidad y especificidad del TESA-blot y se recomendó como prueba confirmatoria para esta parasitosis.

Araujo *et al.* (2008) utilizaron TESA-blot para confirmar la reactividad de 43/4 482 (0,96%) de sueros que resultaron positivos para la infección por *T. cruzi* por las pruebas de ELISA (Chagatek®, Alka/Adaltis®), HAI (IHA Chagatest®) e IFI (IFI Imunocruzi). De esta forma, 21/43 fueron confirmados como positivos por TESA-blot (0,47%). Los autores concluyen y recomiendan

la aplicación de más de una prueba serológica para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en los bancos de sangre de países endémicos.

La elevada sensibilidad de TESA-blot quedó demostrada en el trabajo de Amato-Neto *et al.* (2005) en donde se comparó el TESA-blot con otras pruebas serológicas (ELISA, HAI e IFI). En ese trabajo se analizaron cuatro grupos de 30 sueros cada uno. Los grupos estuvieron conformados por muestras provenientes de individuos seropositivos y seronegativos para la infección por *T. cruzi* por tres pruebas serológicas distintas, grupo I y II, respectivamente, sueros con resultados discordantes o inconclusos entre las tres pruebas (grupo III) y sueros provenientes de individuos con leishmaniasis visceral (grupo IV). El TESA blot fue 100% sensible y específico para los sueros de los grupos I y II, sólo 6/30 de los sueros del grupo III arrojaron resultados positivos y 2/30 de los sueros del grupo IV mostraron reactividad en la prueba de TESA-blot. Por lo tanto, con los datos presentados previamente, se demuestra que el TESA-blot es una excelente prueba para la clasificación definitiva de los sueros inconclusos.

El TESA-blot fue usado como prueba confirmatoria para sueros dudosos provenientes del Hemocentro Regional de Uberlândia, Fundação Hemominas, Minas Gerais, Brasil. Este banco de sangre recibe anualmente aproximadamente 17.218 donaciones. Se evaluó la sangre de 348 donantes cuyas muestras habían sido diagnosticadas como dudosas para infección por *T. cruzi* (resultados inconclusos), debido a resultados contradictorios entre la prueba de ELISA e IFI. El TESA-blot fue positivo en 2,87% (n = 10) y negativo en 97,12% (n = 338) (Silveira-Lacerda *et al.* 2004).

Ramirez *et al.* (2009) compararon las pruebas serológicas y moleculares en la evaluación de 240 muestras provenientes de individuos clínicamente clasificados como chagásicos y seropositivos para la infección por *T. cruzi*. Las pruebas moleculares utilizadas fueron una PCR con ADN del kinetoplasto (kDNA) y una PCR de elementos repetitivos de ADN nuclear de *T. cruzi* (stDNA). Las pruebas serológicas empleadas fueron IFI, la prueba de ELISA comercial Chagatest ELISA recombinant versión 3,0 (Wiener lab) y el TESA-blot el cual fue usado como método estándar de oro. Al comparar las diferentes técnicas evaluadas, el mejor acuerdo de Kappa fue encontrado entre IFI y TESA-blot (1,0) y ELISA y TESA-blot cuando se eliminaron los sueros inconclusos (1,0). Sin embargo, el acuerdo fue muy pobre entre TESA-blot y las dos

pruebas de PCR empleadas: stDNA (Kappa index: 0,3) y kDNA (PCR: 0,2).

UTILIDAD DE TESA EN ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS

Debido al excelente desempeño de TESA de *T. cruzi* en diferentes formatos de diagnóstico, estos antígenos se han utilizado para conocer la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en diferentes estudios epidemiológicos, lo cual garantiza una mayor confiabilidad y clasificación de los individuos evaluados y permite la detección de valores de seroprevalencia más precisos.

Anticuerpos tipo IgG específicos contra *Leishmania chagasi* y *T. cruzi* fueron estudiados en muestras de suero de 111 perros provenientes de la municipalidad de Araguaína (Brasil), en donde la leishmaniasis visceral y la enfermedad de Chagas son endémicas. Para el diagnóstico de leishmaniasis visceral las muestras fueron evaluadas por IFI y ELISA, mientras que para la infección por *T. cruzi* se aplicó la prueba TESA-blot. La detección de anticuerpos IgG-anti *L. chagasi* por IFI fue de 54,95% (61/111) y 51,35% por ELISA. El coeficiente de Kappa para IFI-ELISA fue de 0,74. La detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* mostró que 4,5% (5/111) de las muestras fueron positivas por TESA-blot. Cuatro de los cinco caninos positivos para infección por *T. cruzi*, fueron igualmente seropositivos para leishmaniasis por ELISA, mientras que tres de ellos fueron negativos por IFI. Sólo un animal fue considerado co-infectado con *Leishmania* spp. Los autores describen la falta de reacción cruzada entre *L. chagasi* y *T. cruzi* cuando se utiliza la prueba de IFI. Sin embargo, si se presentó reacción cruzada entre estos dos parásitos cuando se emplea un extracto soluble proteico de promastigotes de *L. chagasi* en la prueba de ELISA (Morais *et al.* 2013).

Una prueba TESA-ELISA con las cepas Tulahuen y Brasil se validó en distintos bancos de sangre de Venezuela. En ese trabajo se evaluaron 2.038 muestras de suero provenientes de regiones de alta y baja prevalencia la enfermedad de Chagas, estado Portuguesa y Bolívar, respectivamente. Los TESA-ELISA validados, usando ambas cepas, presentaron 100% de sensibilidad mientras que la prueba fue 99, 90% específica para la cepa Brasil y 99, 85% para la cepa Tulahuen. Ambas pruebas mostraron ser superiores a la prueba comercial (ELISA Chagas IgG, Pharmatest) utilizada para ese momento en los bancos de sangre evaluados en Venezuela (Berrizbeitia *et al.* 2006a). La seroprevalencia de la

infección por *T. cruzi* en el banco de sangre del Hospital Ruiz y Páez (Ciudad Bolívar, estado Bolívar) fue de 0,62%, mientras que en los bancos de sangre de los hospitales del estado Portuguesa (Hospital Miguel Orea y Jesús María Casal) fue de 5,47% (Berrizbeitia *et al.* 2006b). Las seroprevalencias encontradas en los bancos de sangre evaluados no habían variado en los últimos 12 años si se comparan con los datos reportados por Aché en 1993.

Se evaluó la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* en una comunidad indígena Kariña, municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela utilizando TESA-ELISA. En ese trabajo se estudiaron 173 individuos, con edades comprendidas entre 6 meses y 73 años, trece individuos resultaron positivos por ELISA y HAI. La seroprevalencia en esa comunidad fue de 7,43% (n = 173). Igualmente se recolectaron 10 triatomíneos de la especie *P. geniculatus*, de los cuales dos resultaron positivos para *Trypanosoma* sp. (20%). Se encontró asociado a la infección la falta de conocimiento acerca de la enfermedad de Chagas, haber sido picado por un triatomíneo y el reconocimiento del vector. Los autores concluyen que todas las variables epidemiológicas están presentes para que ocurra una transmisión vectorial activa en esta comunidad (Berrizbeitia *et al.* 2012).

CONCLUSIONES

La gran cantidad de trabajos realizados han demostrado que TESA de *T. cruzi* constituye una de las mejores herramientas para la detección de la infección por *T. cruzi*. Estos antígenos en diferentes formatos de diagnóstico ofrecen una elevada sensibilidad y especificidad en comparación con el desempeño de otros antígenos de *T. cruzi*. Asimismo TESA-blot representa y es reconocido como prueba estándar de oro para la confirmación de muestras positivas o de resultados dudosos por otras pruebas serológicas convencionales como ELISA, HAI, IFI. Hasta el momento las proteínas totales de TESA y no las moléculas purificadas de éstas presentan una mayor sensibilidad para el diagnóstico de *T. cruzi*, así como también un elevado rendimiento antigénico. Sin embargo, TESA presenta algunas limitaciones como son su elevado costo y la exigencia tanto de un personal capacitado y una infraestructura adecuada para su producción, estas limitaciones se pueden subsanar ya que con una sola colecta de estos antígenos se puede obtener suficiente cantidad de ellos para garantizar el diagnóstico por muchos años, ya que son estables por largos periodos de tiempo si se almacenan adecuadamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHE A. 1993. Prevalence of human infections by *Trypanosoma cruzi* in blood banks in Venezuela. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 35(5):443-448.
- AMATO NETO V, DE MARCHI CR, FERREIRA CS, FERREIRA AW. 2005. Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38(6):534-535.
- ARAUJO AB, VIANNA EE, BERNE ME. 2008. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody detection in blood donors in the Southern Brazil. Braz. J. Infect. Dis. 12(6):480-482.
- ARENA R, MATHEWS CE, KIM AY, LENZ TE, SOUTHERN PM. 2011. Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* in Hispanic-surnamed patients seen at Parkland Health & Hospital System, Dallas, Texas. BMC. Res. Notes. 4(132).
- AZNAR C, LIEGEARD P, MARIETTE C, LAFON S, LEVIN MJ, HONTEBEYRIE M. 1997. A simple *Trypanosoma cruzi* enzyme-linked immunoassay for control of human infection in nonendemic areas. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 18(1):31-37.
- BERRIZBEITIA M, NDAO M, GOTTSCHALK M, ACHE A, VASQUEZ F, LACOUTURE S, MEDINA M, WARD BJ. 2004. 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. 42(4):1766-1769.
- BERRIZBEITIA M, NDAO M, BUBIS J, GOTTSCHALK M, ACHE A, LACOUTURE S, MEDINA M, WARD BJ. 2006a. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. J. Clin. Microbiol. 44(2):291-296.
- BERRIZBEITIA M, NDAO M, BUBIS J, GOTTSCHALK M, ACHE A, LACOUTURE S, MEDINA M, WARD B J. 2006b. Field evaluation of four novel enzyme immunoassays for Chagas' disease in Venezuela blood banks: comparison of assays using fixed-epimastigotes, fixed-trypomastigotes or trypomastigote excreted-secreted antigens from

- two *Trypanosoma cruzi* strains. *Transfus. Med.* 16(6):419-431.
- BERRIZBEITIA M, FIGUERA M, HERMOSO T, WARD B, JORQUERA A, NARVÁEZ M, GUILARTE D, NDAO M. 2010a. Purificación de una fracción de antígenos de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 30:134-139.
- BERRIZBEITIA M, WARD BJ, BUBIS J, GOTTSCHALK M, ACHE A, PERDOMO D, MEDINA R, MEDINA M, SPENCER L, NDAO M. 2010b. 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.* 106(5):1127-1134.
- BERRIZBEITIA M, MORENO D, WARD BJ, GÓMEZ E, JORQUERA A, RODRÍGUEZ J, GARCÍA N, HERRERA M, MARCANO M, NDAO M. 2012. *Trypanosoma cruzi* infection in an indigenous Kariña Community in Eastern Venezuela. *Epidemiol. Res. Int.* 2012(138259).
- BONALDO MC, D'ESCOFFIER LN, SALLES JM GOLDENBERG S. 1991. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* 73(1):44-51.
- BOTERO D, RESTREPO M. 2003. *Parasitosis Humanas*. Medellín.
- BRENIERE SF, CARRASCO R, MIGUEZ H, LEMESRE JL CARLIER Y. 1985. Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in Bolivian patients. *Trop. Geogr. Med.* 37(3):231-238.
- BRITTO C, CARDOSO A, SILVEIRA C, MACEDO V, FERNANDES O. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina (B Aires)*. 59 (Suppl 2):176-178.
- BRITTO C, CARDOSO MA, RAVEL C, SANTORO A, PEREIRA JB, COURA JR, MOREL CM WINCKER P. 1995. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp. Parasitol.* 81(4):462-471.
- BRUMPT E. 1914. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la trypanosomose de chagas. *Bull. Soc. Pat. Exot.* 7:706-710.
- CAMARGO ME. 1966. 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. São Paulo.* 8(5):227-235.
- CARVALHO MR, KRIEGER MA, ALMEIDA E, OELEMANN W, SHIKANAI-YASSUDA MA, FERREIRA AW, PEREIRA JB, SAEZ-ALQUEZAR A, DORLHIAC-LLACER PE, CHAMONE DF *et al.* 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion.* 33(10):830-834.
- CERISOLA J, FATALA M, LAZAARI J. 1962. Hemagglutination test for the diagnosis of Chagas' disease. *Prensa Med. Argent.* 24:1761-1767.
- COELHO JS, SOARES IS, LEMOS EA, JIMENEZ MC, KUDO ME, MORAES SL, FERREIRA AW, SANCHEZ MC. 2007. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58(2):223-230.
- CROSS GA, TAKLE GB. 1993. The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:385-411.
- CHIARI E, BRENNER Z. 1966. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 8:134-138.
- DUFFY T, BISIO M, ALTCHER J, BURGOS JM, DIEZ M, LEVIN MJ, FAVALORO RR, FREILIJ H, SCHIJMAN AG. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3(4):e419.
- ENGVALL E, PERLMANN P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8(9):871-874.
- FIFE E, MUSCHEL L. 1959. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:540-543.

- FLORES-CHAVEZ M, CRUZ I, RODRIGUEZ M, NIETO J, FRANCO E, GARATE T, CANAVATE C. 2010. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28(5):284-293.
- FURUCHO CR, UMEZAWA ES, ALMEIDA I, FREITAS VL, BEZERRA R, NUNES EV, SANCHES M C, GUASTINI CM, TEIXEIRA AR, SHIKANAI-YASUDA, MA. 2008. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop. Med. Int. Health.* 13(12):1527-1533.
- GOMES YM, LORENA VM, LUQUETTI A O. 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104 (Suppl 1):115-121.
- GORDIS L. 2004. *Epidemiology.* E. Saunders. Third edition. Philadelphia.
- GUERREIRO C, MACHADO A. 1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas como elemento diagnóstico. *Nota Previa. Brasil Medico.* 27:225-226.
- JAZIN EE, LUQUETTI AO, RASSI A, FRASCH AC. 1991. Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infect. Immun.* 59(6):2189-2191.
- KESPER N, JR DE ALMEIDA KA, STOLF AM, UMEZAWA ES. 2000. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J. Parasitol.* 86(4):862-867.
- KIRCHHOFF LV, VOTAVA JR, OCHS DE, MOSER DR. 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J. Clin. Microbiol.* 34(5):1171-1175.
- KRAUTZ GM, PETERSON JD, GODSEL LM, KRETTLI AU, ENGMAN DM. 1998. Human antibody responses to *Trypanosoma cruzi* 70-kD heat-shock proteins. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(2):137-143.
- LENT H, WYGODZINSKY P. 1979. Revision of the triatominae (Hemiptera, Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 163:125-520.
- MANSON-BAHR P, APTED F. 1982. *Manson's Tropical Diseases.* 18th edition. Baillière Tindall London.
- MARCIPAR IS, OLIVARES ML, ROBLES L, DEKANTY A, MARCIPAR A SILBER AM. 2004. The diagnostic performance of recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2beta protein is influenced by its expression system. *Protein Expr. Purif.* 34(1):1-7.
- MARCIPAR IS, ROODVELDT C, CORRADI G, CABEZA ML, BRITO ME, WINTER LM, MARCIPAR AJ, SILBER AM. 2005. Use of full-length recombinant calflagin and its c fragment for improvement of diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Clin. Microbiol.* 43(11):5498-5503.
- MARCON GE, ANDRADE PD, DE ALBUQUERQUE DM, WANDERLEY JDA S, DE ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, COSTA SC. 2002. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43(1):39-43.
- MATSUMOTO TK, COTRIM PC, DA SILVEIRA JF, STOLF AM, UMEZAWA ES. 2002. *Trypanosoma cruzi*: isolation of an immunodominant peptide of TESA (Trypomastigote Excreted-Secreted Antigens) by gene cloning. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42(3):187-192.
- MORAIS AN, SOUSA MG, MEIRELES LR, KESPER N, JR UMEZAWA ES. 2013. Canine visceral leishmaniasis and Chagas disease among dogs in Araguaina, Tocantins. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22(2):225-229.
- MOSER DR, KIRCHHOFF LV, DONELSON JE. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27(7):1477-1482.
- NAKAZAWA M, ROSA DS, PEREIRA VR, MOURA MO, FURTADO VC, SOUZA WV, BARROS MN, ABATH FG, GOMES YM. 2001. Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(5):1024-1027.
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2007.

- Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Buenos Aires, Argentina. Disponible en línea en: <http://www.who.int/tdr>. (Acceso 06.01.2014).
- PAHO (PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION). 2007. Salud en las Américas 2007. Disponible en línea en: <http://www.paho.org/hia/archivosvoll/volregionalesp/SEA07%20Regional%20SPA%20Front%20Matter.pdf>. (Acceso 18.12.2013).
- PIRON M, FISA R, CASAMITJANA N, LOPEZ-CHEJADE P, PUIG L, VERGES M, GASCON J, GOMEZ I, PRAT J, PORTUS M, SAULEDA S. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103(3):195-200.
- RAMIREZ JD, GUHL F, UMEZAWA ES, MORILLO CA, ROSAS F, MARIN-NETO JA, RESTREPO S. 2009. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J. Clin. Microbiol.* 47(12):3945-3951.
- ROMAÑA C. 1961. Aplicación del método de hemaglutinación al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Argen. Biol.* 37:73-76.
- SALLES NA, SABINO EC, CLIQUET MG, ELUF-NETO J, MAYER A, ALMEIDA-NETO C, MENDONCA MC, DORLIACH-LLACER P, CHAMONE DF, SAEZ-ALQUEZAR A. 1996. Risk of exposure to Chagas' disease among seroreactive Brazilian blood donors. *Transfusion.* 36(11-12):969-973.
- SCHECHTER M, FLINT JE, VOLLER A, GUHL F, MARINKELLE CJ, MILES MA. 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet.* 2(8356):939-941.
- SILVEIRA-LACERDA EP, SILVA AG, JUNIOR S F, SOUZA M A, KESPER N, BOTELHO-FILHO A UMEZAWA ES. 2004. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang.* 87(3):204-207.
- SPENCER HC, ALLAIN DS, SULZER AJ, COLLINS WE. 1980. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29(2):179-182.
- TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS SA, WEISS LM, WITTNER M. 1992. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5(4):400-419.
- TANOWITZ HB, WEISS LM, MONTGOMERY SP. 2011. Chagas disease has now gone global. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 5(4):e1136.
- TELLES S, ABATE T, SLEZYNGER T, HENRIQUEZ DA. 2003. *Trypanosoma cruzi* ubiquitin as an antigen in the differential diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 37(1):23-28.
- UMEZAWA ES, NASCIMENTO MS, KESPER N, JR COURA JR, BORGES-PEREIRA J, JUNQUEIRA AC, CAMARGO ME. 1996a. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34(9):2143-2147.
- UMEZAWA ES, SHIKANAI-YASUDA M. A, STOLF AM. 1996b. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies from acute to chronic Chagas disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 10(6):407-413.
- UMEZAWA ES, NASCIMENTO MS, STOLF AM. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 39(3):169-176.
- UMEZAWA ES, BASTOS SF, COURA JR, LEVIN MJ, GONZALEZ A, RANGEL-ALDAO R, ZINGALES B, LUQUETTI AO, DA SILVEIRA JF. 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion.* 43(1):91-97.
- VIRREIRA M, ALONSO-VEGA C, SOLANO M, JIJENA J, BRUTUS L, BUSTAMANTE Z, TRUYENS C, SCHNEIDER D, TORRICO F, CARLIER Y, SVOBODA M. 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(5):871-879.
- VOLLER A, DRAPER C, BIDWELL DE, BARTLETT A. 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for chagas' disease. *Lancet.* 1(7904):426-428.

WENDEL S, BIAGINI S. 1995. Absence of serological surrogate markers for *Trypanosoma-cruzi*-infected blood donors. Vox Sang. 69(1):44-49.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2010. Working to

overcome the global impact of neglected tropical diseases. First report on neglected tropical diseases. Disponible en línea en: http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/ (Acceso 04.01.2014).