

COMPARACION DE LAS REACCIONES DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y AGLUTINACION DIRECTA CON 2 MERCAPTOETANOL EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

*Adelina Díaz de Ramírez**

RESUMEN

Se comparó la reacción de aglutinación directa con 2 mercaptoetanol (AD2ME) con la reacción de fijación de complemento (RFC) en 319 muestras de sueros de donantes del Banco de Sangre de la ciudad de Valera, Estado Trujillo y 25 muestras de personas con Leishmaniasis Tegumentaria americana, clínicamente curados. La concordancia observada entre ambas pruebas fue del 92,16%. Las discordancias entre las reacciones comprometió a 25 sueros de los cuales 22 presentaron títulos diagnósticos solamente con AD2ME y 3 sueros dieron títulos positivos con RFC únicamente. El análisis estadístico mediante Chi cuadrado reveló que las diferencias observadas entre los resultados de los métodos no fueron significativos. Concluimos por lo tanto, teniendo en cuenta las ventajas de la AD2ME, que ésta prueba resulta más práctica para la investigación de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* en los laboratorios de los Bancos de Sangre.

* Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Universidad de los Andes. Trujillo - Venezuela, 1984.

ABSTRACT

The Direct Agglutination Test using 2 mercaptoethanol (AD2ME) was compared with the Complement Fixation Test (CF) on sera of 319 blood donors from the city of Valera Blood Bank, in the State of Trujillo, and on sera of 25 persons who had been affected with tegumentaria americana leishmaniasis and had been clinically cured. The agreement observed between the two tests was 92,16%. The disagreements between the test involved 25 sera of which 22 presented positive titers only with AD2ME, and 3 only with CF. The statistical analysis using Chi squared revealed that the differences observed between the results of the methods were not significant. Consequently, the conclusion was reached that, considering the advantages of AD2ME, this test is more practical in the Blood Bank Laboratories for screening out blood with anti *Trypanosoma cruzi* antibodies.

INTRODUCCION

La Tripanosomiasis Americana constituye un importante problema de salud pública en grandes regiones de latinoamérica, considerándose que no menos de 50 millones de personas están expuestas al riesgo de la infección por *Trypanosoma cruzi* y más de 20 millones sufren la infección, TORREALBA, 1980 (42).

El diagnóstico serológico asume gran importancia en la enfermedad de chagas debido a las limitaciones que presenta el diagnóstico clínico y parasitológico.

Desde el año 1913, cuando GUERREIRO Y MACHADO (14) publican la reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la enfermedad de chagas, numerosas pruebas serológicas han sido realizadas y evaluadas con este mismo propósito CAMARGO y cols. 1974 (8); FIFE, 1972 (10); KAGAN y cols., 1978 (15); RUGAI y cols., 1979 (34); MUÑIZ Y BONIELLO, 1944 (23); MUÑIZ Y MORAES, 1962 (24).

Los procedimientos más ensayados con un objetivo diagnóstico son la fijación de complemento al 50% de hemólisis (FCH50), ALMEIDA y FIFE, 1976 (2); MAEKALT, 1959 (17); MAEKELT Y ALCANIZ, 1960 (19); la inmunofluorescencia indirecta (IFI) CAMARGO, 1969 (5); STREIGER y cols., 1980 (40); y la hemaglutinación indirecta (HAI) CAMARGO, 1971 (7); MENDEZ, 1979 (21); siendo reconocidas su sensibilidad y especificidad por numerosos autores.

Existen otras técnicas inmunoserológicas para el diagnóstico del mal de chagas tales como: test de latex, GONZALEZ Y ANDRES (13), QUEBEDO (33), test de floculación, CAMARGO (9), Dye test, PERRUOLO (30), métodos inmunoenzimológicos (ELISA) ANTHONY y cols. 1979 (4); SOARES-GUIMARAES y cols.,

1981 (38); VOLLER, 1975 (45); y aglutinación directa, GONZALEZ Y ANDRES, 1977 (13); VATTUONE Y YANOVSKY, 1971 (43).

Entre esta batería de técnicas la RFC, la IFI y ELISA son de difícil instrumentación o costosas, lo cual ha limitado su uso a un reducido número de servicios especializados. Esta situación ha derivado en ocasiones en la ausencia de exámenes a la sangre transfundida. CAMARGO y cols., (7)(8).

El costo o la complejidad de una técnica no tiene gran importancia cuando se trata de un diagnóstico clínico individual, pero en el procesamiento de numerosas muestras estos factores son determinantes. Existe el riesgo de que la ejecución de exámenes serológicos de la enfermedad de chagas quede reducido a centros de alta especialización, de allí la necesidad de continuar con la investigación de técnicas diagnósticas confiables por su sensibilidad, y especificidad y que a la vez sean prácticas y económicas.

Entre las técnicas de instrumentación-sencilla para el diagnóstico de la Tripanosomiasis Americana, la aglutinación directa con sueros tratados con 2-mercaptoetanol (AD2ME) ha sido estandarizada e incluso está siendo comercializada en nuestro país para su uso.

En el Estado Trujillo donde este trabajo ha sido realizado, la prevalencia de la infección producida por *Trypanosoma cruzi* es mayor del 30% según un reciente estudio hecho por NOVOA (1983) (26), de allí la importancia de contar con métodos de diagnóstico apropiados, para aumentar la cobertura del examen serológico de las sangres a ser transfundidas.

El objetivo del presente trabajo es hacer un estudio comparativo entre la prueba AD2ME realizado por el sistema de microtitulación según la técnica de VATTUONE Y YANOVSKY, 1971 (43), y la RFC tal como está estandarizada para todo el país de acuerdo a las técnicas de FREITAS (1951) (11), modificada por MAEKELT (1960) (18), cuya utilidad es reconocida tanto en la investigación clínica, en bancos de sangre, como en las encuestas serológicas. MAEKELT, (16) (17) (20). A fin de contribuir a solucionar problemas de orden práctico que se presentan diariamente en los centros dispensadores de salud, por referirse a una enfermedad altamente distribuida en el país MAEKELT, 1957 (16); MAEKELT, 1959 (17); MAEKELT, 1973 (20); NUÑEZ y cols., 1969 (27); PIFANO, 1960 (31); PIFANO, 1973 (32); SALAZAR y cols., 1962 (35), cuyo diagnóstico debería ser ejecutado aún en los servicios de menores recursos técnicos.

MATERIALES Y METODOS

2.1. Procedencia y número de muestra.

La muestra investigada consistió en 319 sueros provenientes de donadores voluntarios que concurren habitualmente al Banco de Sangre del Hospital Central de Vale-

ra, Estado Trujillo, y 25 sueros ¹ de personas que presentaron úlceras por leishmaniasis tegumentaria americana parasitológicamente comprobada, y que al momento de tomar la muestra estaban curadas clínicamente, por tratamiento previo. Estos sueros fueron estudiados ya que algunos autores indican que ocurren reacciones serológicas cruzadas entre *T. cruzi* y algunas cepas de *Leishmania sp.*

La sangre fue tomada por punción venosa, sin anticoagulantes. Una vez retraído el coágulo, se centrifugó y se separó el suero. Una alícuota de cada suero fue congelada a -20°C . En ningún momento se utilizaron sueros que fueron descongelados más de dos veces, ni tampoco sueros con más de un mes de conservación.

Todos los sueros fueron procesados con la reacción de fijación de complemento y aglutinación directa con 2 mercaptoetanol para hacer el estudio comparativo entre estas dos técnicas.

2.2. Reacción de Fijación de Complemento.

La reacción de fijación de complemento fue realizada en el laboratorio del Banco de Sangre de Valera, Estado Trujillo. Se usó la técnica cuantitativa de FREITAS (11), modificada por MAEKELT (18).

Antígeno.

Como antígeno se usó un extracto protéico soluble de *Trypanosoma cruzi* preparado según la técnica de MAEKELT² (18).

Glóbulos Rojos de Carnero.

La sangre de carnero fue obtenida con anticoagulante en condiciones estériles, se centrifugó a 1.500 rpm durante 10 minutos, descartándose el plasma sobrenadante. El sedimento de glóbulos rojos fue lavado tres veces con 10 volúmenes de solución salina isotónica, centrifugando cada vez a 1.500 rpm durante 5 minutos. Los glóbulos rojos fueron centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos y con el paquete globular formado se preparó una suspensión al 5%.

Complemento.

Para la RFC se utilizó un complemento de cobayo comercial³, su título se determinó en base a la menor cantidad de complemento que con la menor dilución de hemolisina produjese un 50% de hemólisis.

1 Sueros cedidos por el Dr. J. Vicente Scorza, de la Universidad de los Andes.

2 Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.

3 Behringwerke G. A., Marburg-Lahn.

Hemolisina.

Como hemolisina anticarnero se empleó un amboceptor comercial³.

Como título de uso, se empleó la dosis de sensibilización óptima (por lo general títulos de 1:1000 ó 1:1500).

Montaje de la Reacción.

Los sueros fueron inactivados a 56 grados centígrados durante 30 minutos. Se realizó la reacción cualitativa para diferenciar los sueros negativos.

Todos los sueros que en la reacción cualitativa dieron resultados positivos, dudosos o anticomplementarios fueron sometidos a una determinación cuantitativa de los títulos.

Cada reacción se acompañó con un suero control negativo, y suero control positivo de título conocido, así como, un control de antígeno y un control de complemento.

Lectura de la Reacción.

Los porcentajes de hemólisis fueron establecidos comparándolos con patrones de lectura, previamente elaborados, que establecen hemólisis del 0 al 100 por ciento.

Fueron considerados positivos las diluciones del suero que producían hemólisis de 60% o menores.

Interpretación.

Fueron considerados títulos diagnósticos para la RFC los sueros que fueron positivos en una dilución de 1:4 o superiores⁴.

2.3. Reacción de Aglutinación Directa 2-Mercaptoetanol Antígeno.

Para la aglutinación directa 2ME se empleó un antígeno comercial⁵ preparado según la técnica VATTUONE Y YANOVSKY (1971) (43) y ALLAIN Y KAGAN (1974) (3), con formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados con tripsina y posteriormente fijados con formaldehído.

4 Méndez de Hubsch, R. (1984): Comunicación Personal.

5 Polychaco S.A.I.C.

Diluyente.

Como diluyente se utilizó solución salina fosfatada pH 7,2 0,15 M diluida al 0,5% con un stock de albúmina bovina al 30%.

Montaje de la Reacción.

La reacción se realizó en placas de Polystyrene descartables para microtitulación con pocillos en forma de "U", en todos los casos los sueros fueron diluidos al doble desde 1:2 hasta 1:128.

1. En el primer pocillo de cada fila de las placas se colocaron 25 μ l de los sueros problemas a los que se añadió un volumen igual de 2ME al 1% en solución salina isotónica. La mezcla homogenizada por vibración, se incubó a 37° C. durante una hora.

2. Terminado el período de incubación la solución anterior se diluyó en forma seriada al doble en diluyente preparado antes de su uso.

3. A cada dilución del suero se le adicionó 25 μ l de antígeno, se mezcló por agitación y se dejó en reposo a 25° C. por un mínimo de 3 horas.

Controles necesarios para la reacción controles de sueros.

Como controles de sueros positivos se utilizaron sueros que dieron resultados positivos con RFC, obtenidos de personas con antecedentes clínicos y epidemiológicos. Como controles de sueros negativos se emplearon sueros negativos con RFC y provenientes de personas sin antecedentes clínicos o epidemiológicos de infección chagásica.

Control de Antígeno.

Se colocó 25 μ l de diluyente en una fila de la placa y se añadió 25 μ l de antígeno, se mezcló por agitación y se dejó en reposo a 25° C. por un mínimo de 3 horas. Esta reacción debe ser negativa.

Lectura de la Reacción.

Se consideraron reactivos los sueros con aglutinación evidente, representada por la formación de una fina película que cubrió el 50% o más del diámetro del pocillo de la policubeta.

La ausencia de reacción se visualizó por la formación de un sedimento que presentó la imagen de un botón compacto en el fondo de la excavación.

El título se determinó por la última dilución del suero en la cual existía reactividad.

Interpretación.

Para la AD2ME se consideraron positivos los sueros que presentaron un título 1:32 o mayores (47).

RESULTADOS

De los 319 sueros procesados con fijación de complemento, 64 (20,06%) fueron positivos y 255 (79,94%) negativos. Con AD2ME 83 (26,02%) resultaron positivos y 236 (73,98%) negativos.

En la Tabla I observamos que de los 319 sueros estudiados con las reacciones de AD2ME y RFC 19,12% (61 sueros) mostraron concordancia positiva con ambas técnicas y 73,04% (233 sueros) concordancia negativa, esto representa una concordancia total de 92,16% (294 sueros). La discordancia global observada fue del 7,84% (25 sueros), de la cual el 0,94% (3 sueros) corresponden a la AD2ME negativa y fijación de complemento positivo y el 6,90% (22 sueros) AD2ME positivos y fijación de complemento negativo.

TABLA I. CONCORDANCIA Y DISCORDANCIA ENTRE LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y AGLUTINACION DIRECTA 2ME CON ANTIGENO DE *T. cruzi* EN 319 SUEROS, TRUJILLO 1980-1981.

PRUEBAS	Nº DE SUEROS	PORCENTAJES	CONCORDANCIA Y DISCORDANCIA	
REACCION FC POSITIVO Y AD2ME POSITIVO	61	19,12%	294 SUEROS 92,16%	CONCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS
RFC NEGATIVO AD2ME NEGATIVO	233	73,04%		
RFC POSITIVO AD2ME NEGATIVO	3	0,94%	25 SUEROS 7,84%	DISCORDANCIA ENTRE LAS PRUEBAS
RFC NEGATIVO AD2ME POSITIVO	22	6,90%		
TOTAL	319	100%	100%	

F. de L.: Laboratorio de Parasitología - Departamento de Biología y Química, Núcleo Universitario Rafael Rangel. Universidad de Los Andes. Laboratorio del Banco de Sangre de Valera. Trujillo.

De los 25 sueros que resultaron discordantes entre las dos pruebas, 3 (0,94%) presentaron títulos diagnósticos solamente con la RFC; de los 22 sueros restantes con títulos diagnósticos para AD2ME y negativos para RFC, 14 (4,38%) fueron reactivos en RFC aunque con títulos inferiores a 1:4 (Tabla II).

En el grupo de muestras de sueros provenientes de personas que habían padecido leishmaniasis tegumentaria americana, se observó que de un total de 25 sueros procesados con AD2ME y RFC, 3 sueros presentaron positividad a la dilución 1:128 para la primera prueba, de los cuales un suero también reaccionó con RFC con el título 1:4. El resto de las muestras fueron negativas para ambas reacciones.

El análisis estadístico mediante Chi cuadrado representado en la Tabla III y en el Gráfico 1, reveló que las diferencias observadas entre los resultados de las reacciones estudiadas, no fueron significantes.

TABLA II. COMPARACION DE TITULOS DE 25 SUEROS DISCORDANTES ENTRE LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO Y AGLUTINACION DIRECTA 2-ME CON ANTIGENO DE *T. cruzi*. TRUJILLO 1980-1981.

REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO ** (b)	REACCION DE AGLUTINACION DIRECTA 2-ME *(a)								TOTAL
	NO REAC	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	
NO REACTIVO						2	3	3	8
<1:2						1	1	1	3
1:2						7	1	3	11
1:4	2								2
1:8									
1:16	1								1
1:32									
TOTAL	3					10	5	7	25

* (a) Título Significante 1:32

** (b) Título Significante 1:4

F. de l.: Laboratorio de Parasitología. Departamento de Biología y Química, Núcleo Universitario Rafael Rangel. ULA. Laboratorio del Banco de Sangre de Valera. Trujillo.

TABLA III. COMPARACION DE 319 SUEROS HUMANOS PROCESADOS CON RFC Y AD2ME PARA *T. cruzi*, CHI CUADRADO. TRUJILLO 1980-1981.

REACCIONES	SUEROS POSITIVOS		SUEROS NEGATIVOS		TOTALES
	FO	FE	FO	FE	
RFC	64	73,5	255	245,5	319
AD2ME	83	73,5	236	245,5	319
	147		491		683

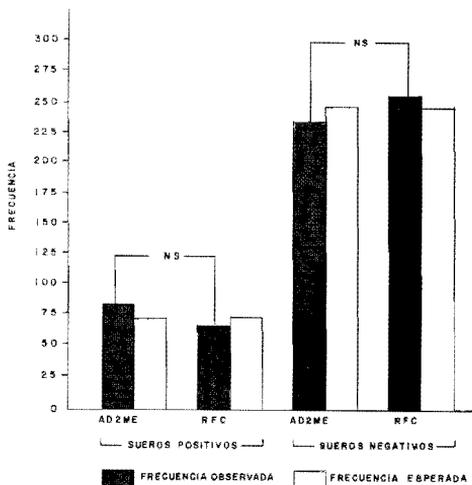
$$X^2 = \sum \frac{(FO - FE)^2}{FE}$$

$$X^2 = \frac{(64 - 73,5)^2}{73,5} + \frac{(83 - 73,5)^2}{73,5} + \frac{(255 - 245,5)^2}{245,5} + \frac{(236 - 245,5)^2}{245,5}$$

$$X^2 = 3.19$$

$$X^2 . 05;1 = 3.84$$

GRAFICO I. COMPARACION DE 319 SUEROS HUMANOS PROCESADOS CON LA RFC Y ADRME PARA *T. cruzi*, CHI CUADRADO. TRUJILLO 1920-1981.



DISCUSION

Las técnicas de aglutinación con formas de *Trypanosoma cruzi* han sido ensayadas desde hace más de 40 años (PAKCHAMIAN, A., 1935 (28) MUÑIZ y cols., (23) (24) demostraron que los antígenos preparados con esta finalidad, presentaban baja sensibilidad para los sueros positivos, mostrando tendencia a reaccionar con títulos altos en presencia de sueros normales.

En 1971, VATTUONE Y YANOVSKY (43) demostraron que el empleo de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados enzimáticamente y fijados con formaldehído, permitía obtener un antígeno de aglutinación que posibilitaba distinguir adecuadamente sueros positivos de enfermedad de Chagas, de sueros de individuos no parasitados.

Diversos estudios permitieron establecer diferencias estructurales entre las aglutininas presentes en sueros de individuos parasitados y los que no lo están. Así, en los individuos chagásicos el poder aglutinante del suero está relacionado principalmente con moléculas de anticuerpos de IgG, salvo en la fase aguda donde al igual que en los sueros de individuos no infectados predominan moléculas de tipo IgM. (VATTUONE y cols. (1973) (44), GONZALEZ CAPPÁ y cols. (1973) (12).

VATTUONE y cols. (1973) (44), comprobaron que el tratamiento de los sueros con 2ME, permitía distinguir con la reacción de aglutinación, fases agudas de formas crónicas de la infección.

Esta técnica fue inmediatamente comparada con otras de relativamente fácil ejecución como la IFI y HAI, demostrándose que es la prueba más precoz en la detección de anticuerpos específicos para la enfermedad de chagas, GONZALEZ CAPPÁ y cols., 1973 (12), y SCHMUÑIS y cols., 1972 (36).

La reacción de fijación de complemento, por su alta sensibilidad y especificidad es tradicionalmente considerada como prueba patrón para el diagnóstico de la enfermedad del chagas, es por ello que la hemos utilizado para evaluar la reacción de AD2ME.

La concordancia observada en nuestro trabajo entre ambas pruebas alcanza el 92,16% porcentaje ligeramente inferior al hallado por GONZALEZ Y ANDRES (1977) (13), quienes reportan una congruencia de 94,5%.

STORNI y cols., (1975) (39), demostraron que el tratamiento sistemático con 2-Mercaptoetanol de los sueros que se utilizan para efectuar la reacción de AD, no afecta su sensibilidad, demostrando una elevada correlación entre la AD2ME y las reacciones de IFI y HAI en el estudio de la infección crónica.

Sin embargo, si el 2ME se emplea en forma sistemática, obstaculiza la detección de formas agudas de la infección, debido a la capacidad del agente reductor para disminuir los títulos serológicos dependientes de IgM específica.

De allí la necesidad de aplicar simultáneamente la AD y la AD2ME ante toda sospecha clínica de infección aguda y a todo paciente de área endémica que presente una sintomatología infecciosa de etiología no determinada.

En nuestro caso, de los 25 sueros que mostraron títulos discordantes entre las dos reacciones comparadas, solamente 3 sueros (0,94%) fueron positivos a RFC y negativos a AD2ME.

PERALTA y cols. (1981) (29), considerando títulos de 1:16 como positivos para AD2ME reportan una concordancia del 99,22% con IFI y HAI, mientras que hallan una sensibilidad del 98,11% y una especificidad del 99,36%.

La existencia en las muestras estudiadas de 22 sueros (6,90%) que presentaron solamente AD2ME positiva podría corresponder a una mayor sensibilidad de esta prueba como la señala SCHMUÑIS y cols., (1972) (36), o la posibilidad de que la AD2ME detecta anticuerpos que han persistido durante más tiempo que aquellos detectados por RFC, o bien a falsos positivos por reacciones cruzadas con otros trypanosomatideos, ya que no se han registrado resultados positivos en sueros de individuos portadores de otras enfermedades. (SCHMUÑIS y cols., 1980) (37). Es importante señalar que de los 22 sueros que resultaron positivos con AD2ME, 14 también fueron reactivos con RFC a diluciones inferiores de 1:4.

Los sueros estudiados en este trabajo proceden del Estado Trujillo (VENEZUELA), donde la prevalencia para las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* y *Leishmania sp* es elevada.

AGUILAR (1981) (1) reporta más de 2.000 casos de leishmaniasis tegumentaria americana diagnosticados entre los años 1955 y 1977 para dicho estado.

El primer caso de leishmaniasis visceral fue diagnosticado por WUANI Y MELLETT (1963) (46) en un niño procedente de la región central del Estado Trujillo y recientemente MILLIANI, E. (1982)⁶, reportó otros seis casos. Diversos autores sin embargo confirmaron que la leishmaniasis visceral en Venezuela es esporádica o de endemidadad baja (TORREALBA, 1970 (41); MORENO, 1982 (22)).

Con relación a *T. rangeli*, si bien no se ha hecho una evaluación sistemática en los casos de infección humanos, existe un alto porcentaje de *Rhodnius prolixus* domésticos infectados por *T. rangeli* según los estudios realizados por la división de endemias del Servicio Zonal de Malariología.

En cuanto a los resultados obtenidos con los sueros provenientes de personas con leishmaniasis tegumentaria americana, observamos que 3 de los 25 sueros presentaron reactividad 1:128 a la AD2ME, sin embargo este estudio no puede considerarse concluyente porque harían falta un mayor número de muestras de sueros de personas con leishmaniasis tegumentaria americana preferentemente con lesiones

6 Milliani, E., 1982: Comunicación Personal.

activas, así como sueros de personas con leishmaniasis visceral, pues algunos autores reportan reacciones cruzadas con estas afecciones utilizando diversas reacciones serológicas. CAMARGO Y REBONATO, 1969 (6); CAMARGO y cols., 1971 (7); KAGAN y cols., 1978 (15); NERY-GUIMARAES y cols., 1969 (25).

El análisis estadístico mediante Chi cuadrado reveló que las diferencias observadas entre los resultados de las reacciones objeto del presente estudio, no son significantes.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por nosotros muestran que la concordancia entre AD2ME y la RFC se encuentran dentro de lo esperado, no existiendo diferencias significativas entre ambas reacciones.

La facilidad y rapidez para el montaje de AD2ME, lo sencillo del equipo a utilizar hacen de ésta, una prueba útil en los laboratorios de bancos de sangre, ya que no requiere infraestructura compleja, ni aparatos costosos, ni personal altamente especializado.

Deseamos señalar, en razón de su utilidad, que en esta reacción serológica como en todas las demás, su utilidad depende fundamentalmente de la calidad del antígeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1 AGUILAR, C. M.: Estudios sobre un foco de leishmaniasis tegumentaria en el case-río de Las Rosas del Estado Cojedes. Participación de los animales domésticos. Trabajo de As-censo, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela 132 pp., 1981.

2 ALMEIDA, J. O., FIFE, E. H.: Quantitatively standardized complement-fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. *Pan American Health Organization, Scientific Publication*, N° 319. Washington, 1976.

3 ALLAIN, D. S.; KAGAN, F. G.: An evaluation of the direct agglutination test for Chagas' disease. *The Journal of Parasitology*, 60: 179-184, 1974.

4 ANTHONY, R. L.; JOHNSON, C. M., and SOUSA, O. E.: Use of micro ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 28: 969-973, 1979.

5 CAMARGO, M. E.: Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Sao Paulo*, 8: 227-234, 1966.

6 CAMARGO, M. E.; REBONATO, C.: Cross reactivity in fluorescence test for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18: 500-505, 1969.

- 7 CAMARGO, M. E.; HOSCHIMO, S.; De SALLES, N.; PEREZ, B.: Hemagglutination test for chagas's disease with chromiun chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitezed with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Revista Instituto Medicina Tropical*, Sao Paulo, 13: 45-50, 1971.
- 8 CAMARGO, M. E.; HOSCHIMO, S. S.: Metodología Serológica na infecao pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista Goiana de Medicina*, 20: 47-65, 1974.
- 9 CAMARGO, M. E.; HOSCHIMO, S. S.; MACEDO, V.; PEREZ, B. A.; CASTRO, C.: Diagnóstico serológico da infeccao humana pelo *Trypasonoma cruzi*. Estudo comparativo de testes de fixacao do complemento, imunofluorescencia, hemaglutinicao e fluculacao, em 3.624 soros. *Revista Instituto Medicina Tropical*, Sao Paulo, 19: 254-260, 1977.
- 10 FIFE, E. H.: Current state of serological test used to detect blood parasite infection. *Experimental Parasitology*, 31: 136-152, 1972.
- 11 FREITAS, J. L. P.: Reacao de fixacao do complemento para diagnostico da molestia de chagas pela tecnica quantitativa. *Arquivos de Hygiene de Saude Publica*, 16: 55-94, 1951.
- 12 GONZALEZ CAPP, S. M.; VATTUONE, N. H.; MENES, S.; SCHMUÑIS, G. A.: Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental american trypanosomiasis. *Experimental Parasitology*, 34: 32-39, 1973.
- 13 GONZALEZ, G. R. de; ANDRES, A. S.: La utilización de la reacción de aglutinación directa para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en Bancos de Sangre. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 11: 353-356, 1977.
- 14 GUERREIRO, C.; MACHADO, A.: Da reacao de Bordet gerigon na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Médico*, 27: 225-226, 1913.
- 15 KAGAN, I. G.; GOLDSMITH, R. S.; ZARATE-CASTAÑEDA, R.; ALLAIN, D. S.: Evaluation on serologic test for studies on chagas's disease. *Bulletin Pan American Health Organization*, 12: 341-347, 1978.
- 16 MAEKELT, G. A.: Investigación de sangre de donantes mediante la reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Acta Médica Venezolana*, 5: 104-107, 1957.
- 17 MAEKELT, G. A.: Investigación serológica de la enfermedad de Chagas mediante la reacción de fijación de complemento. *Archivos Venezolanos de Patología Tropical y Parasitología Médica*, Caracas, 3: 252-271, 1959.
- 18 MAEKELT, G. A.: Die Komplement bindungs readtion der Chagas Krankheit. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 11: 152:186, 1960.
- 19 MAEKELT, G. A.; ACANIZ, A. M.: Estudio serológico sobre la incidencia de la infección chagásica en pacientes no seleccionados del Hospital Vargas. *Archivos Hospital Vargas*, 2: 249-259, 1960.
- 20 MAEKELT, G. A.: Evaluación estadística de los resultados de encuestas epidemiológicas realizadas en Venezuela respecto a la etiología chagásica de las miocardiopatías reurales. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical Parasitología Médica*, 5: 107-115, 1973.
- 21 MENDEZ, de HUBSCH, R.; SIPPLE de CHIECHI, N.; NUÑEZ, V.: La reacción de hemaglutinación indirecta (RHI) en estudios seroepidemiológicos sobre enfermedad de Chagas. *Boletín Dirección Malariología Saneamiento Ambiental*, 19: 129-142, 1979.
- 22 MORENO, G.: Estudio epidemiológico sobre Leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo, Venezuela. Trabajo de Ascenso. Núcleo Universitario Rafael Rangel. Universidad de los Andes. Trujillo, Venezuela, 1982.
- 23 MUÑIZ, J.; BINIELLO, A.: Contribucao para o diagnóstico de doenca de Chagas pela reacoes de inmunidad. I Estudi comparativo entre as reacoes de aglutinacao e de fixacao do complemento. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 41: 303, 1944.

- 24 MUÑIZ, G.; MORALES, J. A. C.: Das reacoes de inmunidad de no diagnostico da doenca de Chagas. *Revista Instituto Medicina Tropical*, San Pablo. 4: 112-118, 1962.
- 25 NERY-GUIMARAES, F.; LAGE, H. A.; VENANCIO, I. A.; GRYNBERG, N. F.: Estudio comparativo da reacao indirecta de anticorpos fluorescentes en doenca de Chagas, leishmanioses tegumentares e calasar con varios antigenos de "Leishmania" e "Trypanosoma". *O. Hospital*, 75: 299-313, 1969.
- 26 NOVOA, D.: Chagas's disease and chronic myocardiopathy: an epidemiological study of four Venezuelan rural communities. Tesis Doctoral, Baltimore, Maryland. 383 pp. 1983.
- 27 NUÑEZ, M. A.; ARTEAGA, P. R.; MONTILLA, P. L.: Estudio sobre la incidencia chagásica en donantes del Banco de Sangre del Estado Zulia. *Kasmera*. 3: 159-165, 1969.
- 28 PAKCHAMIAN, A.: Agglutination and precipitation test for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas's disease). *Journal of Immunology*. 29: 84-85, 1935.
- 29 PERALTA, J. M.; MAGALHAES, T. C. R.; ABREU, L.; MANIGOT, D. A.; LUQUETTI, A.; DIAS, J. C. P.: The direct agglutination test for chronic Chagas's disease. The effect of pretreatment of test samples with 2-mercaptoetanol. *Transaction Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*. 75: 695-698, 1981.
- 30 PERRUOLO, L. G. J.: Valor de la prueba del "Dye Test" (Reacción antichitidia) en el diagnóstico de la enfermedad de chagas crónica. *KASMEHA*, 3: 343-379, 1971.
- 31 PIFANO, C. F.: Algunos aspectos de la enfermedad de chagas en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas*. 68: 6-43, 1960.
- 32 PIFANO, C. F.: La epidemiología de la enfermedad de chagas en Venezuela. *Archivos Venezolanos de Patología Tropical y Parasitología Médica*. 5: 171-184, 1973.
- 33 QUEBEDO, I.: Comparación de las reacciones de Machado Guerreiro y aglutinación de partículas de latex en el diagnóstico serológico de la enfermedad de chagas. *KASMEHA*, 8: 79-87, 1980.
- 34 RUGAI, E.; VEDA, M.; NAKAMURA, P. M.; BRITO e SILVA, M.: Antígeno metílico de *Trypanosoma cruzi* para fixacao de complemento. Extracao a temperatura ambiente. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 39: 1-3, 1979.
- 35 SALAZAR, J. ARENDS, T.; MAEKELT, G. A.: Comprobación en Venezuela de la transmisión de *Schizotrypanum cruzi*, por transfusión de sangre. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical y Parasitología Médica*, 4: 355-363, 1962.
- 36 SCHMUÑIS, G. A.; SZARFMAN, A. y VATTUONE, N. H.: Direct agglutination test in the detection of anti *Trypanosoma cruzi* antibodies in mice. *The Journal of Parasitology*, 58:
- 37 SCHMUÑIS, C. A.; SZARFMAN, A.; COARASA, L.; GUILLERON, C.; PERALTA, J. M.: Anti-*Trypanosoma cruzi* agglutinins in acute human chagas disease. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 170-178, 1980.
- 38 SOARES-GUIMARAES, M. C.; CELESTE, B. J., AYRES de CASTILLO, E. MINEO, J. R.; PAIVA DINIZ, J. M.: Inmunoenzimatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, Kalaazar, and chagas's disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 30: 942-947, 1981.
- 39 STORNI, P. D.; BOLSI, F. L.; YANOVSKY, J. D.: Reacción de aglutinación directa para el diagnóstico de la enfermedad de chagas. Utilización sistemática del 2 Mercaptoetanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina (Bs. As.)*, 35: 67-72, 1975.
- 40 STREIGER, M. L.; BOVENO, N. M.; DAVILA, E. V.: Reacción de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección chagásica. Conservación de improntas. *Medicina (Bs. As.)*, 40: 250-251, 1980.

41 TORREALBA, J. W.: Observaciones sobre diagnóstico, terapéutica y evolución de la leishmaniasis visceral humana y canina. Tesis doctoral. V. C. (Valencia, Venezuela) 367 pp. mimeografiado, 1970.

42 TORREALBA, J. W.: Epidemiología de la enfermedad de chagas. Convención anual de ASOVAC, Mérida, Venezuela, 1980.

43 VATTUONE, N. H.; YANOVSKY, J. F.: *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. *Experimental Parasitology*, 30: 349-355, 1971.

44 VATTUONE, N. H.; SZARFMAN, A.; GONZALEZ, CAPPA, S. M.: Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas's disease). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 45-47, 1973.

45 VOLLER, A.: Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas's disease. *The Lancet*, February 22, 426-428, 1975.

46 WUANI, H. y MELLET de BRAVO, A.: Kalaazar en niños. A propósito de una nueva observación. *Archivos del Hospital Vargas*, Caracas, 5: 47-64, 1963.

47 YANOVSKY, J. F.: Criterios para la selección de individuos parasitados con *T. cruzi*. Propuesta basada en el estudio de 5.000 dadores de la ciudad de Sao Paulo. Congreso Brasileiro de Hemoterapia e Imunohematología. Río de Janeiro, Brasil, 1979.