

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS
DE MACHADO GUERREIRO Y ELISA
EN EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN CHAGÁSICA**

**COMPARATIVE ASSAY OF MACHADO GUERREIRO AND
ELISA TECHNIQUES IN DIAGNOSIS
OF CHAGAS DISEASE**

*S. Rivera,¹ J.O'Dalys,² A. Fuenmayor,³ O. Briceño,⁴ M. Abdul,⁴ C.
Calderón,⁴ T. Molero,⁴ N. Urdaneta.⁵*

RESUMEN

Se procesaron 241 muestras de donantes voluntarios del Banco de Sangre del Estado Zulia de sexo masculino y femenino, en edades comprendidas entre 18 y 30 años; a cada una de las cuales se le

1. Profesor Titular - Departamento de Enfermedades Transmisibles. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.
2. Investigador Titular. Laboratorio de Microbiología. Departamento de Parasitología Humana. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas-Venezuela.
3. Biólogo I. Laboratorio de HLA e Inmunología. Banco de Sangre del Edo. Zulia. Maracaibo-Venezuela.
4. Lic. en Bioanálisis. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.
5. Bioanalista IV. Departamento de Serología. Banco de Sangre del Edo. Zul. Maracaibo-Venezuela.

Recibido: 29-07-94

Aceptado: 02-12-94

Received: 07-29-94

Accepted: 12-02-94

practicaron las pruebas de ELISA realizadas en el IVIC utilizando cepas puras del antígeno de *T. cruzi*, ELISA utilizando un kit comercial y Machado Guerreiro, ambas técnicas realizadas en el Banco de Sangre del Estado Zulia.

De los resultados obtenidos, con la técnica de Machado Guerreiro, 7 sueros resultaron positivos y 234 negativos, con ELISA (Banco de Sangre) 21 positivos y 220 negativos; con ELISA (IVIC) 32 positivos y 209 negativos. La comparación de Machado Guerreiro con ambas ELISA empleando el método de análisis Ji-Cuadrado modificado por Brand-Snedecor, reveló que las diferencias observadas entre los resultados de las técnicas fueron significativas. Evaluando los resultados ELISA (Banco de Sangre) y ELISA (IVIC) se demostró que no hubo diferencias significativas entre ambas pruebas.

Los resultados de este estudio demostraron que ELISA es más sensible que Machado Guerreiro ya que detectó cantidades mínimas de anticuerpos específicos para antígenos chagásicos que no fueron detectados por Machado Guerreiro.

El uso de la técnica ELISA amplía el rango de seguridad para las transfusiones sanguíneas en relación a pacientes con infección chagásica.

Palabras Claves: Diagnóstico, Chagas, Ensayo, ELISA Machado Guerreiro y Fijación de Complemento.

ABSTRACT

We used 241 samples of serum coming from voluntary donors from the Blood Bank of Zulia State belonging to both sex groups and ages between 18 and 30 years old, we did to each, the ELISA assay done at the IVIC using pure stains of antigen from *T. cruzi* ELISA using a commercial kit and Machado Guerreiro, both techniques done at the Blood Bank of Zulia State. The results with the Machado Guerreiro technique, 7 sera were positive and 234 were negative; with ELISA (Blood Bank) 21 were positive and 220 negative; with ELISA (IVIC) 32 were positive and 209 negative. The comparison between Machado Guerreiro and the

two ELISA's using the method estadistic Ji-Cuadrado modified by Brand-Snedecor, revealed that the difference between the results of the techniques were of meaning. Taking a look at the results from ELISA (Blood Bank) and ELISA (IVIC) showed that there was no difference or significance between both techniques.

The results of this investigation showed that ELISA is more sensible than Machado Guerreiro because it detected lower quantities of specific antibodies for chagas antigens that were not detected by Machado Guerreiro.

ELISA techniques has a wider range of security for the blood transfusion in patients with chaga's infection.

Words Keys: Diagnosis, Chagas, Assay, ELISA, Machado Guerreiro, Complement Fixation.

INTRODUCCIÓN

Tripanosomiasis americana es una de las enfermedades tropicales que constituye un grave problema para la salud pública en la población rural venezolana, debido a su carácter de evolución crónica.

Con la presencia de tripanosomas en la sangre aparecen en el período latente, anticuerpos específicos contra el parásito, los cuales son detectables con métodos serológicos. Mientras unos anticuerpos disminuyen en sus títulos con la caída del nivel de la parasitemia, otros se mantienen en títulos elevados durante largo tiempo. La mayoría de estos anticuerpos humorales no intervienen directamente en los mecanismos de defensa, pero su importancia es de tipo diagnóstico, siendo la base fundamental de las pruebas inmunológicas.

La infección chagásica puede persistir en el organismo humano quizás durante toda la vida y el potencial peligro de transmisión debe ser tomado en cuenta por todos los bancos de sangre, para que sean implantadas las medidas diagnósticas y evitar este tipo de transmisión. Díaz de Ramírez¹ hace mención que desde el año 1913, Guerreiro y Machado² 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 propósito por Fife³ 1972, Camargo y cols.⁴ 1977, Kagan y cols.⁵ 1978, Rugai y cols.⁶ 1979, Muñiz y Boniello⁷ 1944, Muñiz y Morales⁸ 1962.

Los procedimientos más ensayados con un objetivo diagnóstico son la Fijación de Complemento al 50% de hemólisis (FC H50). Almeida y Fife⁹ 1976, Maekelt¹⁰⁻¹¹ 1959 y 1960; Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Camargo¹² 1966, Streiger y cols.¹³ 1980; y Hemaglutinación Indirecta (HAI), Camargo¹⁴ 1971, Méndez¹⁵ 1979; siendo reconocidas en sensibilidad y especificidad.

Maekelt¹⁶ menciona que existen otras técnicas inmunoserológicas para el diagnóstico de Chagas, tales como: test de latex, González y Andrés,¹⁷ Quevedo,¹⁸ test de floculación, Camargo;¹⁴ dye test, Perruolo;¹⁹ Método Inmunoenzimático (ELISA), Anthony y cols.³² 1979, Soares Guimares y cols.²⁰ 1981, Voller²¹ 1975; y Aglutinación Directa, González y Andrés¹⁷ 1977, Vattuone²² y Yanovsky²³ 1971.

Maekelt¹⁰ reportó que, para la prueba de Machado Guerreiro,² desde el comienzo en 1913, fueron utilizados como antígenos, extractos de órganos fuertemente infectados. En los últimos años, Almeida y Siqueira¹ presentaron excelentes trabajos sobre problemas de la reacción cuantitativa de Fijación de Complemento para el diagnóstico chagásico.

MicroELISA Chagas IgG es una prueba cualitativa inmunoenzimática desarrollada en microplacas, para detectar anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en suero humano, mediante modificación y adaptación hecha en Venezuela por J. Hernández²¹ partiendo del método indirecto descrito por Alistair Voller y cols.²¹

Hoy en día no se tienen muchos estudios estadísticos sobre investigaciones realizadas en nuestro país de la correlación existente en torno a la sensibilidad de las técnicas de Machado Guerreiro y ELISA para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. El método de Machado Guerreiro es utilizado oficialmente en el laboratorio serológico para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi*. ELISA es una técnica muy sensible para la detección de anticuerpos séricos específicos, por lo tanto, es necesario conocer la posibilidad de implantar esta última técnica, como método diagnóstico masivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 241 muestras de sueros sanguíneos provenientes de donantes voluntarios del Banco de Sangre del Estado Zulia, de sexo masculino y femenino, en edades comprendidas entre 18 y 30 años, separados por procedimientos habituales de laboratorio, dividiendo cada muestra en tres alícuotas de 0.5ml. (una de ellas fue al IVIC bajo refrigeración), haciendo un estudio a doble ciego usando las técnicas de Machado Guerreiro, ELISA-IVIC y ELISA-Banco de Sangre a las cuales se les determinó la presencia o no de anticuerpos anti-T. cruzi.

1. MACHADO GUERREIRO

– PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se fundamenta en la determinación de anticuerpos presentes en el suero problema por formación de un complejo entre éste y el antígeno, en presencia del complemento. Un sistema indicador constituido por glóbulos rojos de carnero sensibilizados con hemolisina adicionado en una segunda etapa, permite demostrar la primera reacción por ausencia de lisis de los glóbulos rojos. Cuando en el suero del paciente no existen anticuerpos, el complemento adicionado queda libre y se fija a la hemolisina produciendo lisis de los eritrocitos.

2. MICROELISA CHAGAS

– PRINCIPIO DEL MÉTODO:

Se basa en la utilización de una enzima como marcador de la reacción Ag-Ac. El complejo formado tiene actividad enzimática sobre un sustrato específico que se manifiesta por el desarrollo de un color. El antígeno soluble es fijado a materiales de fases sólidas como microplacas plásticas de fondo plano. En cada experimento deben incluirse controles adecuados para descartar la hidrólisis espontánea del sustrato, adsorción inespecífica del antígeno, del suero y del conjugado.

Los antígenos utilizados en el IVIC son producto de la purificación de aminoácidos de cepas de **T. cruzi** autóctonas, mientras que los utilizados en Banco de Sangre provienen de un "Kit" comercial (Labotec Chagas).

PROCEDIMIENTO:

Para la realización de esta prueba se utilizaron placas de plástico de 98 pozos (Immunolon II, Dynatech Laboratories). En cada pozo se colocaron 1, 5 y 10 ug de antígeno respectivamente incubando a 37°C toda la noche a fin de evaporar el solvente y fijar totalmente el antígeno al plástico encontrándose que la cantidad de 5ug produjo el valor óptimo de densidad óptica a 405nm en la reacción serológica, por lo cual fue la cantidad de antígeno utilizada en la prueba. En experimentos previos se pudo constatar que la mayor reproducibilidad de los resultados y el máximo en la actividad de la reacción de ELISA se obtuvo adheriendo el antígeno a la placa e incubándolo por toda la noche a 37°C. Una vez adherido el antígeno se lavaron las placas tres veces con SST (solución salina tamponada)-0.05% (v/v) Tween-20 con un lavador automático de placas, y luego se bloquearon los sitios que en la placa no reaccionaron con el antígeno con 1% (p/v) de albúmina sérica bovina en SST por 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los sueros humanos diluidos en SST 1:1000 una hora a 37°C al término de la cual, se lavaron 3 veces con SST-Tween-20 y se les añadió (Fab') 2 anti-inmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidasa de rábano diluidas 1:1000 en SST (0.01 M P04, 0.15M NaCl, pH 7.4), por toda la noche a 4°C (Amersham). Seguidamente se lavaron 3 veces con SST-Tween-20 colocándose 100 ul del sustrato de la enzima consistente de ABTS (2.2' - amino-di-3-etnyl benzothiazoline sulphonate) en el "buffer" que suministra la casa comercial.

La reacción de la ABTS con la peroxidasa produjo un color verde que se cuantificó a 405 nm en un lector de placas de ELISA Titertek, con sustracción automática del valor del color producido por todos los reactivos presentes en el pozo a excepción del antisuero positivo usado

en la reacción. Todos los experimentos se hicieron por duplicado, encontrándose que la desviación estándar osciló, entre 0.1 - 0.2% del valor del promedio.

3. MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

PRUEBA DE JI-CUADRADO MODIFICADA POR BRANDT-SNEDECOR

Esta prueba nos relaciona la positividad y las diferentes técnicas.
Uso de la prueba:

Se emplea en tablas de contingencias $2 \times \gamma$ ó $\gamma \times 2$ (fila x columna) según donde se encuentre ubicada la clasificación y está dada por la siguiente fórmula estadística:

$$X^2 = \frac{\sum a_i P_i - p \sum a_i}{\bar{p} \bar{Q}}$$

$$Q = 1 - \bar{p}$$

Donde:

- P_i = Proporción del evento que interesa en el experimento, bajo el tratamiento i ésimo.
- a_i = Número de elementos del evento que interesa bajo el tratamiento i ésimo.
- p = Medida de las proporciones P_i .

Nota: Hay diferencia significativa (DS) o no.

Utilizando una tabla de contingencia (2 x 3)* Tabla No. 1

TABLA N° 1

**COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
DE LAS TÉCNICAS MACHADO GUERREIRO, ELISA (BANCO
DE SANGRE) Y ELISA (IVIC)**

RESULTADOS	MACHADO GUERREIRO	ELISA (BANCO DE SANGRE)	ELISA (IVIC)	TOTAL
	A	B	C	
a_i				
POSITIVOS	7	21	32	60
NEGATIVOS	234	220	209	663
TOTAL	241	241	241	723 (P) tubos
P_i	*0.02904	0.08714	0.13278	0.08299 (\bar{p})

(*): Número de positivos/total

P_i: Proporción de positivos

\bar{p} : Proporción de positivos en muestra global

CÁLCULOS

$$X^2 = \frac{7(0.02904) + 21(0.08714) + 32(0.13278) - 60(0.08299)}{(0.08299)(0.91701)}$$

$$X^2 = \frac{1.30278}{0.07610}$$

$$\begin{aligned} Q &= 1 - \bar{p} \\ Q &= 1 - 0.08299 \\ Q &= 0.91701 \end{aligned}$$

$$X^2 = 17.1$$

$$\begin{aligned} X^2 &= 9.21 \\ &0.99;2 \end{aligned}$$

HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($p < 0.01$), ENTRE A, B Y C

Dado el resultado anterior procederemos a desglosar la tabla 2x3 en tablas 2x2

Donde: $X^2 = 17.1$

Grado de libertad (gl)

Donde: $gl = (\text{fila} - 1) (\text{columna} - 1)$

$$gl = (2 - 1) (3 - 1)$$

$$gl = 2$$

Ji-CUADRADO TABULADO

= Nivel de significación.

Para ver si se rechaza o no la hipótesis, igual probabilidad de aceptar o rechazar la hipótesis.

$$\alpha = 0.01$$

$$X^2_{0.99;2} = 9.21$$

$$*0.99 = \text{tabla del } Y^2$$

RESULTADOS

De la evaluación a la cual fueron sometidas las 241 muestras de sueros sanguíneos provenientes de donantes voluntarios del Banco de Sangre del Estado Zulia, se obtuvo que con la técnica de Machado Guerreiro, 7 fueron positivos y 234 negativos, con ELISA (Banco de Sangre) 21 positivos y 220 negativos. Con ELISA (IVIC) 32 positivos y 209 negativos.

Como se puede observar, utilizando la Tabla de Contingencia 2 x 3 (Tabla No. 1) y el método de análisis Ji-cuadrado modificado por Brand-Snedecor, hubo diferencia significativa entre las técnicas evaluadas.

En la Tabla No. 2, la comparación de Machado Guerreiro y ELISA (Banco de Sangre) empleando el análisis estadístico antes mencionado,

TABLA N° 2

**COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
DE LAS TÉCNICAS MACHADO GUERREIRO Y ELISA
(BANCO DE SANGRE)**

RESULTADOS	MACHADO GUERREIRO	ELISA (BANCO DE SANGRE)	TOTAL
	A	B	
POSITIVOS	7	21	28
NEGATIVOS	234	220	454
TOTAL	241	241	482
Pi	0.02904	0.08714	0.05809

CÁLCULOS

$$X^2 = \frac{7 (0.02904) + 21 (0.08714) - 28 (0.05809)}{(0.05809) (0.94191)}$$

$$X^2 = \frac{0.4067}{0.05472}$$

$$X^2 = 7.4$$

$$X^2 = 6.63$$

0.99;1

HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($p < 0.01$), ENTRE A Y B

reveló que las diferencias observadas entre los resultados de ambas técnicas fueron significantes; igual análisis demostraron los resultados obtenidos de la evaluación entre Machado Guerreiro y ELISA (IVIC) como lo indica la Tabla No. 3.

En la Tabla No. 4, comparando los resultados entre ELISA realizada en el Banco de Sangre del Estado Zulia y la Técnica de ELISA-IVIC, se demostró que no hubo diferencias significativas entre ambas técnicas.

DISCUSIÓN

La reacción de Fijación de Complemento (Machado Guerreiro) por su alta sensibilidad y especificidad, es tradicionalmente considerada como prueba patrón para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, es por ello que la hemos utilizado para evaluar la técnica inmunoenzimática de ELISA.

Numerosos autores confirman la sensibilidad de la reacción de Fijación de Complemento empleando un extracto proteico de **T. cruzi**, exento de fosfolípidos por extracción con éter o benzol; donde Romaña y Gil obtienen un 93% de positividad en 174 casos estudiados. Chaffer y cols. encontraron en 96 sueros un 94% de positividad, Freitas²⁴ en 73 casos 98.6% de positividad, Maekelt¹¹ en 65 casos adultos 92% de positividad.

En 1980, Quevedo¹⁸ comparando la prueba de Aglutinación de Partículas de Látex sensibilizadas con antígeno de **T. cruzi** y la reacción de Fijación de Complemento, no encuentra diferencias significativas entre los resultados cualitativos obtenidos.

Díaz de Ramírez¹ en 1984 realizó un estudio comparativo entre la prueba de Fijación de Complemento y la prueba de Aglutinación Directa con 2-mercaptoetanol obteniendo concordancia de los resultados entre ambas pruebas, no existiendo diferencias significativas.

Históricamente corresponde a Engval y Perlmann²⁵ la descripción de la primera técnica de Ensayo Inmunoenzimático específico para proteínas séricas, siendo un ensayo muy promisor para el diagnóstico de Chagas.

TABLA N° 3

**COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
DE LAS TÉCNICAS MACHADO GUERREIRO Y ELISA
(IVIC)**

RESULTADOS	MACHADO GUERREIRO	ELISA (IVIC)	TOTAL
	A	C	
POSITIVOS	7	32	38
NEGATIVOS	234	209	443
TOTAL	241	241	482
Pi	0.02904	0.13278	0.08091

CÁLCULOS

$$X^2 = \frac{7(0.02904) + 32(0.13278) - 39(0.08091)}{(0.08091)(0.91909)}$$

$$X^2 = \frac{1.29675}{0.07436}$$

$$X^2 = 17.4$$

$$X^2 = 6.63$$

0.99;1

HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($p < 0.01$), ENTRE A Y C

TABLA Nº 4

**COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS
DE LAS TÉCNICAS ELISA (BANCO DE SANGRE)
Y ELISA (IVIC)**

RESULTADOS	ELISA (BANCO DE SANGRE)	ELISA (IVIC)	TOTAL
	B	C	
POSITIVOS	21	32	53
NEGATIVOS	220	209	429
TOTAL	241	241	482
Pi	0.08714	0.13278	0.10995

CÁLCULOS

$$X^2 = \frac{21 (0.08714) + 32 (0.13278) - 53 (0.10995)}{(0.10995) (0.89005)}$$

$$X^2 = \frac{0.25155}{0.09786}$$

$$X^2 = 2.6$$

$$X^2 = 6.63$$

0.99:1

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ($p > 0.01$), ENTRE B Y C

Kagan y cols.⁵ afirman que la prueba de ELISA es altamente sensible y específica para cuantificar anticuerpos circulantes de *T. cruzi* en el suero.

Entre las modificaciones a la técnica de ELISA, Castilla y col. en 1988,²⁶ utilizaron el Ensayo Inmunoenzimático por Difusión en Gel (DIG-ELISA), comparándola con Hemaglutinación Indirecta (HAI) alcanzando mayor porcentaje de positividad de casos para ELISA al realizar la evaluación de ambas pruebas.

En 1991, Lorca y Thiermann²⁷ realizaron un estudio comparativo entre la técnica de ELISA por anticuerpos IgG e IgM contra *T. cruzi* y la prueba de Anticuerpos Inmunofluorescentes (IFAT), confirmando que ELISA es mucho más sensible que la prueba IFAT por anticuerpos IgM.

Contreras y cols. en 1992²⁸ estudiaron sueros por ELISA-IgG y por pruebas de Hemaglutinación Indirecta, demostrando que ambos métodos presentaron concordancia de 93,3% y 100,0%, respectivamente.

Figueredo y cols.²⁹ realizaron un estudio de la prevalencia de infección por *T. cruzi* en 265 individuos utilizando examen microscópico, hemocultivo, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), ELISA y ELISA-competitiva (C-ELISA), arrojando una seropositividad de 14.3% por IFI, 14.7% por ELISA y 13.2% por C-ELISA.

Estudios comparativos de cuatro métodos serológicos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas fueron aplicados por Schattschneider y cols. en 1992,³⁰ reportando que las pruebas de Aglutinación por Látex, IFAT y ELISA identificaron el 81% de los pacientes con infección aguda, la prueba de Fijación de Complemento no presentó un diagnóstico potencial en esta fase de la enfermedad. En estados tardíos la prueba de Fijación de Complemento mostró una sensibilidad del 69% comparado con el 100% para pruebas de aglutinación por látex, IFAT y ELISA.

Requejo y cols.,³¹ en 1991 realizaron comparaciones entre las pruebas serológicas convencionales, tales como Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Hemaglutinación Pasiva (PHA), Fijación de Complemento y DIG-ELISA, concluyendo que esta última representa una técnica alternativa para la detección de infecciones chagásicas.

Basados en la utilidad reconocida de Machado Guerreiro para el diagnóstico de la infección **T. cruzi**, se tomó como parámetro esta prueba, para determinar si hay diferencia significativa de sus resultados con los obtenidos al utilizar la prueba de ELISA. En este estudio se obtuvo una diferencia significativa entre Machado Guerreiro y ELISA confirmando la superioridad de esta última en la detección de anticuerpos anti-**T. cruzi**.

La sensibilidad de ELISA permite detectar anticuerpos que han persistido durante más tiempo que aquéllos detectados por Machado Guerreiro, además la facilidad y rapidez para el montaje de la misma y lo sencillo del equipo a utilizar, hacen de ésta una prueba útil en los laboratorios de bancos de sangre, ya que no requiere de infraestructura compleja, ni aparatos costosos ni personal altamente especializado.

La positividad de ELISA (Banco de Sangre) y ELISA-IVIC no mostró una diferencia significativa en relación a la encontrada en ambas técnicas con la de Machado Guerreiro, a pesar de que por ELISA-IVIC se obtuvo un mejor resultado, ya que se utilizaron antígenos de cepas puras de **T. cruzi** por lo que en relación a futuros trabajos se debe hacer hincapié en la necesidad de emplear antígenos puros para obtener resultados óptimos en la ejecución de dicha prueba.

CONCLUSIONES

Utilizando la técnica de ELISA se detectaron reactores positivos los cuales fueron reactores negativos con la técnica de Machado Guerreiro, estableciéndose una diferencia significativa de sensibilidad entre los resultados.

Estadísticamente se comprobó que hubo diferencia significativa entre los resultados obtenidos por ELISA y Machado Guerreiro. No así entre la técnica de ELISA del Banco de Sangre y ELISA-IVIC usando diferentes antígenos en ambas pruebas.

Para fines prácticos, Machado Guerreiro resulta mucho más laborioso al ser aplicado en grandes poblaciones y de alto riesgo como la de los bancos de sangre necesitando el empleo de mayor tiempo y de personal especializado para la obtención de los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DÍAZ DE RAMÍREZ A. "Comparación de las Reacciones de Fijación de Complemento y Aglutinación directa con 2-Mercaptoetanol en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas". *Kasmera* 1984; 12: 96-107.
2. GUERREIRO C., MACHADO A. "Da reacáo de Bordet Gerigon na malestia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico". *Bras. Med.* 1913; 27: 225-226.
3. FIFE E. H. "Current state of serological test used to detect blood parasite infection" *Exp. Parasitol* 1972; 31: 136-152.
4. CAMARGO M. E., HOSCHIMO S., MACEDO V., PÉREZ B., CASTRO C. "Diagnóstico serológico da infeccáo humana pelo *Trypanosoma cruzi*. Estudio comparativo de testes de fixacáo do complemento, imunofluorescencia hemaglutinicaó e floculacáo em 3624 soros". *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1977; 19: 254-260.
5. KAGAN I. G., GOLDSMITH R. S., ZÁRATE-CASTAÑEDA., ALLAIN D. S. "Evaluation on serologic test for studies on Chagas's disease" *Bol. Pan. Amer. Health Org.* 1978; 12: 341-347.
6. RUGAI E., VEDA M., NAKAMURA P. M., BRITO e SILVA M. "Antígeno metilico para fixacáo do complemento. Extracáo a temperatura ambiente" *Rev. Ins. Adolfo Lutz.* 1979; 39: 1-3.
7. MUÑIZ J., BONIELLO A. "Contribucáo para o diagnóstico de doenca de Chagas pela reacões de inmunidad. I estudio comparativo entre as reacões de aglutinicaó e de fixacáo do complemento". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1944; 41: 303.
8. MUÑIZ G., MORALES J.A.C. "Das reacões de inmunidad de no diagnóstico de doenca de Chagas". *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1962; 4: 112-118.
9. ALMEIDA J. O., FIFE E. H. "Quantitatively stantardized complement fixation methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*". *Pan Amer. Health Org. Sc. Pub. No. 319.* Washington, 1976; 116-119 pp.
10. MAEKELT A. "Medicina Tropical. La Enfermedad Tropical". *Guía de Estudio; Caracas, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Medicina, Cátedra de Medicina Tropical.* 69-74 pp.
11. MAEKELT A. "El diagnóstico parasitológico inmunológico de la infección chagásica". *UCV. Facultad de Medicina, Cátedra de Medicina Tropical.* Caracas, 1965. 127-136 pp.

12. CAMARGO M. E. "Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis, technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi*". *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1966; 8: 227-234.

13. STREIGER M. L., BOVENO N. M., DÁVILA E. V. "Reacción de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de la infección chagásica". *Conservación de improntas médicas*. Buenos Aires. 1980; 40: 250-251.

14. CAMARGO M. E., HOSCHIMO S., DE SALLES N., PÉREZ B. "Hemagglutination test for chagas's disease with chromiun chloride, formalin-treated erythrocytes sensitezed with *Trypanosoma cruzi* extracts". *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1971; 13: 45-50.

15. MÉNDEZ de HUBSCH R., SIPPE de CHIECHI N., NÚÑEZ V. "La reacción de hemaglutinación indirecta (RHI) en estudios serolepidemiológicos sobre enfermedad de Chagas". *Bol. Dir. Malarial. Saneam. Amb.* 1979; 19: 129-142.

16. MAEKELT A. "Nociones Básicas para el Curso Teórico Práctico sobre el Diagnóstico de las Enfermedades Tropicales". *UCV Facultad de Medicina. Cátedra de Medicina Tropical*. Caracas, 1966. 36-38 pp.

17. GONZÁLEZ G. R. de, ANDRÉS A. S. "La utilización de la reacción de Aglutinación Directa para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en Bancos de Sangre". *Acta Bioq. Clin. Latin.* 1977; 11: 353-356.

18. QUEVEDO I. "Comparación de las reacciones Machado Guerreiro y Aglutinación de partículas de Látex en el Diagnóstico Serológico de la Enfermedad de Chagas". *Kasmera* 1980; 8: 79-87.

19. PERRUOLOL G. J. "Valor de la prueba del Dye Test (reacción anticrithidia) en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas crónica". *Kasmera* 1971; 3: 343-379.

20. SOARES-GUIMARAES M. C., CELESTE B. J., AYRES de CASTILLO E., MINEO R., PAIVA DIVIZ J. M. "Inmunoenzimatica assay (ELISA) in mucocutaneous Leishaniasis, Kalazar and Chagas's disease an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti T. cruzi and anti Leishmanis antibodies". *J. Trop. Med. Hyq.* 1981; 30: 942-947.

21. **Folleto de Micro Elisa Chagas**. Caracas. Laboratorio Técnico S.R.L. 1989. 1-14 pp.

22. VATTUONE N., PESCE M. "Evaluación de un antígeno de aglutinación de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*". *Bol. Chil. Parasitol.* 1971; 26: 7-10.

23. YANOSKY J. "Criterios para la selección de individuos parasitados con *Trypanosoma cruzi*". *Congreso Brasileiro de Hemoterapia e Inmunohematología*. Río de Janeiro. 1979.

24. FREITAS J. L. P. de. "Reacao de fixacao do complemento para diagnóstico da molestia de Chagas pela tecnica quantitativa". *Arq. Hyg. Saude Pub.* 1951; 16: 55-94.

25. ENGVALL E.; PERLMANN P. *Inmunochemistry*. 1971; 8: 871.

26. CASTILLA M., SANTOS-GÓMEZ G. BRACHO C., BAUTISTA GARFIA C. R. "A new method for diagnosis of chagas disease: Difusion-In-Gel enzyme linked immunosorbent assay". *J. Parasitol.* 1988; 74: 805-809.

27. LORCA M. y THIERMANN E. "Serological diagnosis of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*". **Rev. Chil. Pediatr.** 1991; 62: 337-344.
28. CONTRERAS M. C., SALINAS P., SANDOVAL L., SOLÍS F., ROJAS A. "Usefulness of the ELISA-IgG test in sera and filter paper blood eluates the chagas disease immunodiagnosis". **Bol. Chil. Parasitol.** 1992; 47: 76-81.
29. FIGUEREDO SILVA J., KAMEDA y TACHIBANA H., FURUSHIMA R., TATENO S., CORREIA LIMA F. G., BENTO D. N. "Epidemiological Survey of *Trypanosoma cruzi* infection in north-eastern Brazil using different diagnostic methods". **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** 1991; 33: 193-198.
30. SCHATTSCHIEDER W., LOPES E. R., DE ALENCAR J. E., BIENZLE U., FELDMER H. "A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic chagas disease in brazilian patients". **Trop. Geogr. Med.** 1992; 44: 210-218.
31. REQUEJO H. I., NAKAMURA P. M., VAZ A. J., PIALARSSI, C. S.; HOSHINO-SHIMIZU S., MATSUMOTO T. K., NAKAMURA H. "Diffusion in gel enzyme linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) for chagas disease serodiagnosis". **Braz. J. Med. Biol. Res.** 1991; 24: 471-483.
32. ANTHONY R. L., JOHNSON C. M., SOUSA O. E. "Use of micro ELISA for quantitating antibody to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*". **Amer. J. Trop. Med. and Hig.** 1979; 28: 969-973.