

Concordancia de dos pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Agreement between two serological tests for the diagnosis of Chaga's disease

Ana E. Farfán-García, Yeny Z. Castellanos-Domínguez, Katherine P. Luna-Marín y Víctor M. Angulo-Silva

Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales -CINTROP. Universidad Industrial de Santander. Colombia. elvirafarfan01@hotmail.com, yenyzu1@gmail.com;katluna23@yahoo.com; pitorio@hotmail.com

Recibido 16 Junio 2012/Enviado para Modificación 22 Julio 2012/Aceptado 8 Agosto 2012

RESUMEN

Objetivo Establecer la concordancia entre un Ensayo Inmunoenzimático Ligado a una Enzima Casera (ELISA) y la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* empleando eluidos sanguíneos.

Metodología Se realizó un estudio de evaluación de tecnología diagnóstica y muestreo de corte transversal a 650 habitantes de una zona endémica de Colombia. Se determinó el área bajo la curva de operador-receptor (del inglés ROC) y se usó la IFI estandarizada en eluidos sanguíneos como *goldstandard*. Se estableció el punto de corte para el ELISA, así como la concordancia entre las lecturas.

Resultados El ELISA presentó una concordancia de 0,99 (IC95 %: 0,989-0,992) entre las lecturas realizadas y una curva ROC de 0,9795. El punto de corte establecido fue 0,5 de absorbancia en la prueba de ELISA. 16,6 % fueron positivas para anticuerpos anti-*T. cruzi* por ELISA y 10,9 % por IFI.

Conclusiones El ELISA mostró buena concordancia frente a IFI, por lo tanto es una buena elección diagnóstica para la población que vive en áreas remotas.

Palabras Clave: Enzima casera, enfermedad de chagas, *Trypanosomacruzi*, diagnóstico, serología (*fuentes: DeCS, BIREME*).

ABSTRACT

Objective Establishing agreement between an in-house ELISA and an indirect immunofluorescence (IIF) assay for diagnosing infection caused by *T. cruzi* using blood eluates.

Methodology The study involved an evaluation of diagnostic technology and cross-sectional sampling of 650 people residing in an endemic area of Colombia. The area below the receiver operating characteristic (ROC) curve was determined and IIF was used as gold standard. The cut-off for the ELISA was established, as well as agreement between readings.

Results The in-house ELISA had 0.99 agreement (0.989 to 0.992 95%CI) between the two readings taken and ROC curve area was 0.9795. The ELISA test cut-off

point was set at 0.5 absorbance; 16.6 % were positive by ELISA and 10.9 % by IIF. **Conclusions** The in-house ELISA assay had good agreement compared to IIF; it would thus seem a good diagnostic choice for testing a target population living in remote areas.

Key Words: Chaga's disease, *Trypanosomacruzi*, diagnosis, serology (source: MeSH, NLM).

La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosomacruzi* aún se considera un serio problema de salud pública en Latinoamérica (1,2). Los datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) del año 2006 sugieren que 7,6 millones de personas están infectadas y aproximadamente 75 millones se encuentran en riesgo de adquirir el parásito (3,4). En Colombia la enfermedad de Chagas está distribuida en diferentes departamentos, principalmente de la zona oriental del país, donde alrededor de un millón de personas son sero positivas (5-7). Los datos de prevalencia de los tamizajes de bancos de sangre en esta zona oscilan entre 1,2 % y 7,2 % (8,9).

La presencia de *T. cruzi* en muestras biológicas o tejidos confirma el diagnóstico de la infección y su hallazgo depende de la fase clínica de la enfermedad: aguda o crónica. Para el diagnóstico en la fase crónica, asintomática o sintomática, se han desarrollado varias técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos específicos tipo IgG contra epimastigotes de *T. cruzi*, entre ellas la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el Ensayo Inmunoenzimático Ligado a una Enzima (ELISA) y la Hemaglutinación Indirecta (HAI) (10-13). La mayoría de las técnicas inmunológicas comerciales emplean antígenos recombinantes o antígenos preparados a partir de cepas no autóctonas antigénicamente diferentes a las cepas locales, lo que conduce a baja sensibilidad y especificidad de las mismas (14,15).

En la mayoría de las áreas rurales en donde la enfermedad de Chagas es prevalente existe dificultad para el acceso de los pacientes a los servicios de salud y por lo tanto al diagnóstico oportuno de la infección. Los laboratorios clínicos de los municipios endémicos no tienen la infraestructura adecuada para la realización de dichas pruebas y por consiguiente deben enviar las muestras de suero para el diagnóstico a instituciones de mayor complejidad. Para facilitar el envío de muestras desde zonas de difícil acceso varios autores han recomendado la absorción de la sangre en papel filtro para posteriormente del eluido sanguíneo realizar las pruebas serológicas (16-20).

Desde los años sesenta, países como Brasil, México y Panamá han reportado el uso del eluido sanguíneo para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante prueba de fijación de complemento (FC), IFI y ELISA con excelentes resultados de sensibilidad y especificidad (16,21-22). En Colombia, en 1990 se realizó un trabajo en una zona endémica de Boyacá con el fin de comparar los resultados obtenidos entre ELISA e IFI y el rendimiento de las pruebas en sueros vs eluidos (19).

Es preciso anotar que la mayoría de las pruebas comerciales no están estandarizadas para emplear eluidos sanguíneos; entonces se hace indispensable desarrollar pruebas inmunológicas caseras para el procesamiento de eluidos en las cuales se empleen cepas de *T. cruzi* locales. Si bien existen estudios en los que se emplea el eluido sanguíneo para detección de anticuerpos tipo IgG para Chagas las características de calidad no han sido descritas en todos ellos, por consiguiente el objetivo del presente trabajo fue determinar la concordancia entre las técnicas ELISA casera e IFI utilizando una cepa colombiana como antígeno para detectar anticuerpos tipo IgG anti-*T. cruzi* en eluidos.

METODOLOGÍA

Diseño y población

Se realizó un estudio de evaluación de tecnología diagnóstica en Fase I mediante un muestreo de corte transversal (23,24). Entre los meses de diciembre de 2008 y junio de 2009 y con mínimo 6 meses de duración en la zona y con firma del consentimiento informado se incluyeron participantes de todas las edades procedentes del área rural de los municipios de Aguazul o Maní del Departamento de Casanare. El cálculo del tamaño de muestra se realizó en el programa Epidat 3,0 con base en una prevalencia del evento en Casanare de 7,2 % (9), sensibilidad del 97 %, un nivel de confianza de 95 % y una precisión de 5 %. El tamaño de muestra correspondió a 626.

Muestras biológicas

Las muestras de sangre obtenidas por punción capilar fueron impregnadas en papel filtro Whatman No.3 de 1,5 cm. de diámetro en un volumen de 60 μ l. Cada filtro fue sumergido en 480 μ l de Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,2 e incubado a 4°C por 24 horas. Posteriormente se dejaron a temperatura ambiente, se centrifugaron por siete minutos a 2.500 r.p.m y los eluidos se almacenaron a -20°C.

ELISA

El antígeno correspondió a epimastigotes de una cepa colombiana de *T. cruzi* genotipo I. El ELISA casero fue una versión modificada del protocolo de antígenos inmovilizados (25). Para éste, microplacas de poliestireno de 96 pozos (NUNC®) se incubaron durante 18 horas a 4°C con 6,5 µg/ml de antígeno. Los eluidos diluidos 1/160 en buffer carbonatos pH 9,6 fueron incubados por una hora a 37°C. Después del bloqueo con albúmina de huevo y los lavados con PBS-Tween 20 0,05 % a pH 7,2, se adicionó el conjugado anti-inmunoglobulina G humana cadena específica marcada con fosfatasa alcalina (SIGMA®) diluida 1/2.000 y se incubó por dos horas. La actividad enzimática fue detectada con el sustrato cromogénico p-nitrofenilfosfato. La reacción fue detenida con NaOH 3N y las absorbancias leídas a 405 nm con filtro de referencia de 620 nm en un lector de ELISA (Anthos 2020).

Inmunofluorescencia Indirecta-IFI

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron lavados con solución salina (0,9 %) estéril y posteriormente con formol al 2 %. Enseguida se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en solución salina estéril hasta obtener la concentración de 20 – 40 parásitos por campo en 40X. Se sirvieron en pozos de placas de 18 pozos y se almacenaron a -20°C. Brevemente, se sirvieron las placas con una dilución en serie de los eluidos. Estos se incubaron a 37°C durante 70 minutos. Después de los lavados se adicionó el conjugado anti-IgG humana marcado con isotiocianato de fluoresceína diluido 1/80 en Azul de Evans 1/750. Luego de la incubación, se realizó la lectura en un microscopio de Inmunofluorescencia con objetivo de 40x. Las muestras con título igual o mayor a 1/32 se consideraron positivas. La lectura se realizó sin tener conocimiento previo de los resultados del ELISA y por dos operadores expertos.

Para las dos pruebas serológicas los controles negativos correspondieron a eluidos de pacientes de una zona no endémica y los positivos a eluidos de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Chagas crónica de la misma zona, con resultados de absorbancias altas, medias y bajas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos se registraron en una base de datos de Excel (Microsoft office, 2007) y los análisis se realizaron con el software Stata 10,0 (Stata Corp. 2007. Stata Statistical Software: Release 10. College Station, TX: Stata Corp LP). Se calculó el coeficiente de correlación intraclase para determinar la capacidad discriminativa del ELISA y la validez de esta prueba

se estableció mediante el cálculo del área bajo la curva del receptor operador (ROC) (26), usando como test de referencia la IFI y considerando como resultado reactivo la dilución igual o mayor a 1/32. Se seleccionó el punto de corte donde la sensibilidad y especificidad del ELISA presentó las mejores características de una prueba de tamizaje. La concordancia se analizó teniendo en cuenta los duplicados del mismo corrido del ELISA.

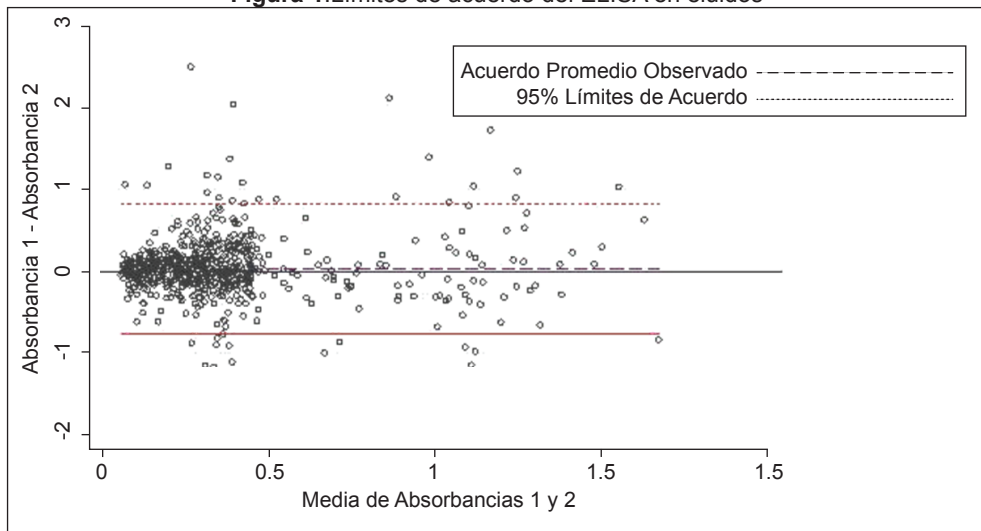
Aspectos éticos

Este estudio correspondió a una investigación con riesgo mínimo de acuerdo con la resolución No.08430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander, Acta No. 015 del 27 de agosto de 2007.

RESULTADOS

Se tomaron 650 muestras de sangre en papel filtro de los habitantes de una zona endémica con edades comprendidas entre los cinco meses y 88 años, las cuales se procesaron con las técnicas de ELISA e IFI.

Figura 1. Límites de acuerdo del ELISA en eluidos

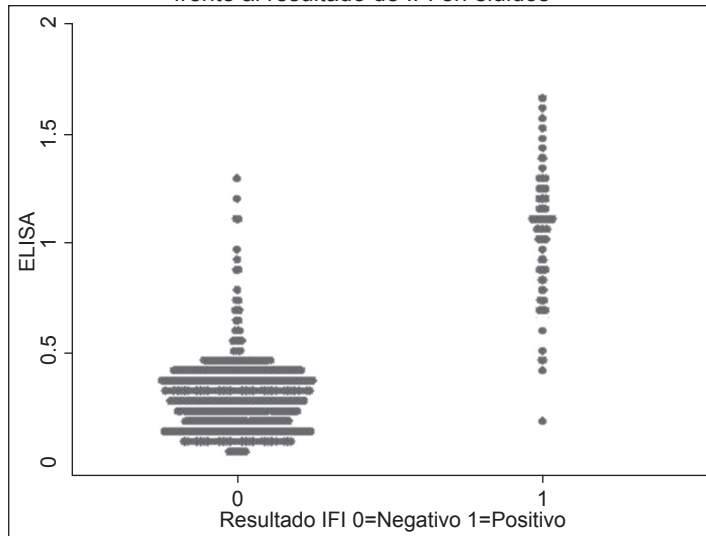


El coeficiente de correlación intraclase obtenido de las dos mediciones del ELISA para evaluar la reproducibilidad intraevaluador fue de 0,99 (IC95 %: 0,989-0,992) con una diferencia entre las dos mediciones de 0,004 (DS 0,04). Los límites de acuerdo del 95 % mostraron la distribución de

las absorbancias de las dos lecturas alrededor del acuerdo promedio más y menos dos desviaciones estándar. El límite de concordancia del 95 % estuvo entre -0,075 y 0,082. Las absorbancias por debajo de 0,5 se agruparon alrededor de cero y se observó que al aumentar la absorbancia se incrementaba la dispersión de los datos (Figura 1).

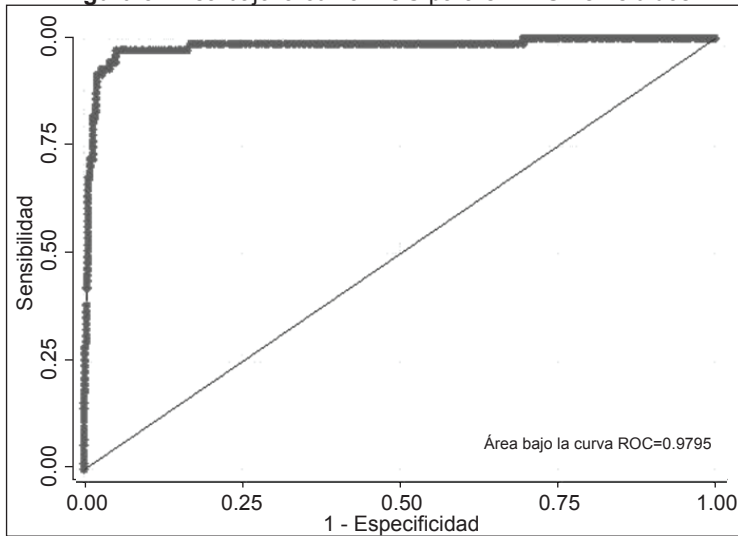
Teniendo como referente la prueba de IFI y estableciendo como resultado positivo una dilución igual o mayor a 1/32 se aprecia que más del 50% de los resultados positivos por IFI presentaron valores de absorbancia en el ELISA superiores a 0,5 (Figura 2).

Figura 2. Distribución de las absorbancias del ELISA frente al resultado de IFI en eluidos



La calidad del ELISA casero se expresó a través del área bajo la curva ROC, la cual fue de 0,9795 (IC95 %: 0,959-0,999) con un error estándar de 0,013, lo que indicó una buena capacidad discriminatoria para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* (Figura 3).

Para seleccionar el punto de corte del ELISA en muestras de eluido se establecieron las características de sensibilidad y especificidad de la prueba a diferentes absorbancias. La mayor eficiencia de la prueba se obtuvo con un punto el corte de 0,5 en donde la prueba mostró una sensibilidad de 97,2 % y una especificidad de 93,7 % (Tabla 1).

Figura 3. Área bajo la curva ROC para el ELISA en eluidos

El índice Kappa entre IFI y ELISA para las muestras de eluidos fue de 0,73 (IC95 % 0,66-0,81). Este valor del coeficiente representa un nivel de concordancia sustancial entre estas dos pruebas (27).

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad del ELISA frente a diferentes puntos de corte en los eluidos

Punto de corte en absorbancia	Sensibilidad %	Especificidad %	Correctamente clasificados %
≥0,20	100	20,7	29,4
≥0,30	98,6	41,8	48,0
≥0,40	98,6	67,5	70,9
≥0,50	97,2	93,3	93,7
≥0,60	93,0	96,4	96,0

Con el punto de corte de 0,5 establecido para la técnica de ELISA, 108 (16,6 %) muestras fueron positivas por ELISA y 71 (10,9 %) por IFI. Positividad simultánea se observó en 69 (10,6 %) casos (Tabla 2). Los valores predictivos positivo y negativo correspondieron a 63,9 y 99,6 respectivamente.

Tabla 2. Positividad del ELISA e IFI en eluidos

Prueba diagnóstica	Positivos		Negativos	
	n	%	n	%
ELISA	108	16,6	542	83,3
IFI	71	10,9	579	89,1
ELISA e IFI	69	10,6	471	72,5

Con el fin de dar un resultado definitivo a cada uno de los participantes del estudio, se tomó una nueva muestra a aquellos que presentaron pruebas

discordantes: ELISA positiva con IFI negativo o ELISA negativa con IFI positivo (datos no publicados).

DISCUSIÓN

La Organización Mundial de la Salud recomienda emplear tres métodos serológicos distintos para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Chagas (28).

El ELISA es una de las técnicas serológicas más sensible utilizada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en su fase crónica. Su interpretación depende de parámetros calculados más que de la interpretación subjetiva de quien realiza la prueba (29). Además del ELISA está la HAI y la IFI las cuales debido a su simplicidad, bajo costo y a los buenos resultados en términos tanto de especificidad como de sensibilidad son ampliamente usadas para el diagnóstico de la enfermedad. Estas técnicas se basan en el empleo de fracciones antigénicas semipurificadas o totales de epimastigotes o tripomastigotes de *T. cruzi* (30). En este estudio se determinó una buena correlación entre los resultados obtenidos por ELISA y por IFI en eluidos, a pesar de usar preparaciones antigénicas diferentes. En la prueba de ELISA se utilizó un extracto completo crudo que representa los antígenos solubles que componen el mosaico antigénico del epimastigote, mientras que en la IFI se utilizaron parásitos completos donde los únicos antígenos que están disponibles para interactuar con los anticuerpos del huésped son los antígenos de superficie (31).

Tal como fue reportado por Bucio y colaboradores, el uso de cepas autóctonas aumenta la sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (32). Para el ELISA casero de este estudio se usó como antígeno una cepa colombiana de *T. cruzi* que corresponde al genotipo más común que circula en la zona oriental del país (33).

El uso de papel filtro ha sido empleado satisfactoriamente para el tamizaje de otras infecciones de transmisión vectorial como dengue que extiende su uso en zonas de difícil acceso (34). Esta técnica minimiza las dificultades de costo y transporte de las muestras convirtiéndose en una herramienta útil para estudios seroepidemiológicos en población dispersa como la de este estudio. Además bajo condiciones adecuadas de almacenamiento pueden ser usadas hasta por un año sin presentar alteraciones significativas en los títulos de anticuerpos (35).

Estudios previos que usaron sangre colectada en papel filtro y que emplearon la técnica de inmunofluorescencia indirecta mostraron un 100 % de concordancia con los sueros positivos y 0,8 % de los sueros negativos presentaron resultado reactivo cuando se procesaron en papel filtro; estos falsos positivos no fueron significativamente importantes dadas las otras ventajas que representa este método (17).

Son pocas las investigaciones que presentan las características de confiabilidad y calidad de las pruebas que son empleadas para realizar diagnóstico y clasificar a un individuo como sano o enfermo. Los resultados de este trabajo concuerdan con los hallazgos de un estudio realizado en Chile en el que los valores de absorbancia obtenidos en las muestras de pacientes con diagnóstico positivo para Chagas se encuentran entre 0,508 y 1,469 (18). De igual manera López y colaboradores encontraron las mejores características de sensibilidad y especificidad con un punto de corte de 0,4 para la técnica de ELISA en eluidos provenientes de pacientes de zona endémica de Colombia usando como gold estándar la IFI (20). El área bajo la curva ROC para eluidos hallada en este estudio fue de 0,975, similar a la obtenida por Orozco y colaboradores (0,994) quienes usaron muestras colectadas en papel filtro de habitantes de zona endémica de Colombia para la enfermedad de Chagas. En ese mismo estudio el punto de corte establecido estuvo entre 0,4 y 0,5 con valores de Kappa más altos respecto a este trabajo (19). Esta discrepancia puede deberse a una diferencia en la concentración final del antígeno y al procesamiento de la técnica de ELISA.

En estudios previos realizados por el mismo grupo se utilizaron las pruebas IFI y ELISA en sueros para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en habitantes de una zona endémica de Santander, con en el que se obtuvieron resultados de calidad satisfactorios para las dos técnicas evaluadas (36,37).

Una limitación de este estudio fue la no obtención de suficientes muestras de suero de todos los participantes para establecer la concordancia con los eluidos. No obstante dadas las ventajas que presenta la recolección y el transporte de sangre impregnada en papel filtro en áreas de difícil acceso, es innegable la utilidad del papel filtro para el tamizaje de la infección por *T. cruzi*.

Se concluye en este estudio que el ELISA frente a IFI en eluidos sanguíneos tiene muy buena concordancia y por lo tanto se recomienda extender su uso para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en poblaciones que viven en áreas remotas*

Agradecimientos: Al Doctor Luis Carlos Orozco por sus invaluable aportes en el análisis de los datos, al personal de la Secretaría de Salud del Departamento de Casanare y a las personas de las comunidades incluidas en este estudio.

REFERENCIAS

1. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol.* 2006;22(12):583-8.
2. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *MemInstOswaldo Cruz.* 2009;104(Suppl 1):17-30.
3. Schmunis G. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *MemInstOswaldo Cruz.* 2007;102(1):75-5.
4. Hernández P, Heimann M, Riera C, Solano M, Santalla J, Luquetti AO, et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas' disease. *ClinVaccineImmunol.* 2010;17(10):1598-604.
5. Enciso C, Montilla M, Santacruz M, Nicholls R, Rodríguez A, Mercado M, et al. Comparación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta, un inmunoensayo enzimático y la prueba comercial Chagatek para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosomacruzi*. *Biomédica.* 2004;24:104-8.
6. Angulo VM. Aspectos ecológicos de la enfermedad de Chagas en el oriente de Colombia. *MVZ Córdoba.* 2000;5(1):64-8.
7. Guhl F. Estado actual del control de la enfermedad de Chagas en Colombia. En: Guhl F, Jaramillo C. Editores. Curso-taller control de tripanosomiasis americana y leishmaniasis: aspectos biológicos, genéticos y moleculares. Santafé de Bogotá: CorcasEditores; 1998. p.47-81.
8. Behrend M, Beltrán M, Restrepo M, Kroeger A. Control de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre de Colombia. *Biomédica.* 2002; 22(1): 39-45.
9. Beltrán M, Bermúdez MI, Forero MC, Ayala M, Rodríguez MJ. Control de la infección por *Trypanosomacruzi* en donantes de sangre de Colombia, 2003. *Biomédica.* 2005; 25(4): 527-32.
10. Macêdo V. Indeterminate form of ChagasDisease. *MemInstOswaldo Cruz.* 1999; 94(1):311-6.
11. Zicker F, Smith PG, Luquetti AO, Oliveira OS. *Bull World Health Organ* 1990;68(4):465-71.
12. Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, de Aguilar V, Gonzalez A, et al. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of chagas' disease by detection of *Trypanosomacruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *J ClinMicrobiol.* 2005;43(10):5065-8.
13. Nakazawa M, Rosa DS, Pereira VR, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, et al. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. Excretory-secretory antigens of *Trypanosomacruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *ClinDiagnLabImmunol.* 2001;8(5):1024-7.
14. Brasil P. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta- analysis. *BMC Infec Dis.* 2010;10 (37):1-17.
15. Barfield CA, Barney RS, Crudder CH, Wilmoth JL, Stevens DS, Mora-Garcia S, et al. A highly sensitive rapid diagnostic test for Chagasdisease that utilizes a recombinant *Trypanosomacruzi* antigen. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2011;58(3):814-7.
16. De Souza SL, Camargo ME. The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American Trypanosomiasisserodiagnosis. *RevInstMedTrop Sao Paulo.* 1966;8(6):255-8.
17. Alvarez M, De Rissio AM, Wynne de Martini GJ, Orrego LA, Cerisola JA. Recolección de sangre en papel para diagnóstico de infección chagásica por inmunofluorescencia. *Bol ChilParasitol.* 1971;26(1):1-6.

18. Contreras MC, Salinas P, Sandoval L, Solís F, Rojas A. Utilidad de la ELISA-IgG en muestras de sueros y eluidos de sangre en papel filtro en el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bol ChilParasitol. 1992;47(3-4):76-81.
19. Orozco LC, Camargo D, Lopez M, Duque S, Gualdrón LE, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección en humanos por *Trypanosomacruzi* mediante ELISA utilizando sangre recolectada en papel filtro. Biomédica. 1999;19(2):164-8.
20. López MC, Duque S, Orozco LC, Camargo D, Gualdrón LE, Cáceres E, et al. Inmunodiagnóstico de la infección chagásica por ELISA. Biomédica. 1999;19(2):159-3.
21. Kagan IG, Goldsmith RS, Zárate-Castañeda R, Allain DS. Evaluación de pruebas serológicas utilizadas para estudiar la enfermedad de Chagas. Bol Oficina SanitPanam. 1979;87(4):309-18.
22. Anthony RL, Johnson CM, Sousa OE. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to *Trypanosomacruzi* and *Trypanosomarangeli*. Am J Trop Med Hyg. 1979;28(6):969-73.
23. Orozco LC. Fases y muestreos, o de cómo tomar las personas de una población para hacer el estudio. Confiabilidad de la consistencia, reproducibilidad, acuerdo y algo más. En: Medición en Salud. Diagnóstico y Evaluación de Resultados. División de Publicaciones UIS. Bucaramanga; 2010. p. 63-157.
24. Kraemer H. Sensitivity and Specificity: The signal Detection Approach. In: Evaluating medical Tests. Objective and quantitative guidelines. Sage publications, Inc; Newbury Park, California, USA; 1992. p. 63-95.
25. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. Trans Roy Soc Trop Med and Hyg. 1976;70(2):98-06.
26. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectosteórico-prácticos. Rev ChilenaInfectol. 2012;29(2):138-141.
27. Seigel DG, Podgor MJ, Remaley NA. Acceptable values of kappa for comparison of two groups. Am J Epidemiol. 1992;135(5):571-8.
28. Reiche EM, Cavazzana M Jr, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. Am J TropMedHyg. 1998;59(5):750-6.
29. Palacios X, Belli A, Espino AM. Detección de anticuerpos contra *Trypanosomacruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. RevPanam Salud Publica. 2000;8(6):411-7.
30. Ramos-Ligonio A, Ramírez-Sánchez ME, González-Hernández JC, Rosales-Encina JL, López-Monteon A. Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosomacruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. Salud PublicaMex. 2006;48(1):13-21.
31. Monteon VM, Sosa T, Reyes PA. Serological tests for American tripanosomiasis. A comparative study. Lat-amer. Microbiol. 1989;31(1):35-8.
32. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino M. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosomacruzi*. Immunol Invest. 1999; 28(4):257-68.
33. Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. Parasitology. 2004;129(4):439-44.
34. Vázquez S, Fernández R, Llorente C. Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. RevInstMedTrop Sao Paulo. 1991;33(4):309-11.
35. Marinkelle CJ, de Sánchez N, Grögl M, Guhl F. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. RevInstMedTrop Sao Paulo. 1978;20(2):112-4.
36. Angulo VM. Estandarización de IFI para Chagas. Biomédica. 1987(Supl.1):83.
37. Ramírez G, Angulo VM, Cabrales CC, Rodríguez M, Muñoz G, Torres de Leal A. Comparación de ELISA con IFI en la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*. Biomédica. 1987(Supl.1): 83-84.