

ARTICULO

Diagnóstico inmunológico de la Enfermedad de Chagas a partir de muestras colectadas en papel de filtro.

Diosmarbe Briceño¹, Gabriela Caballero¹, María Lares¹, Mercedes Vietri¹, Mehudy Medina², Elizabeth Ferrer^{1,3}

1 Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

2 Laboratorio de Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Maracay, Venezuela.

3 Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela.

Correspondencia: Elizabeth Ferrer

E-mail: elizabeth.ferrer@gmail.com

Financiamiento: Ayuda Menor CDCH-UC 0440-10 y Ayuda Menor CDCH-UC-0450-10. Universidad de Carabobo.

Recibido: Enero 2012 **Aceptado** Abril 2012

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas, es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Los métodos de diagnóstico inmunológico son los más utilizados, pero presentan problemas de reacciones cruzadas con Leishmaniasis y Rangeliosis, por lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere la ejecución de tres pruebas inmunológicas

diferentes. En Venezuela la disponibilidad de las tres pruebas sólo se encuentra en centros de investigación y en laboratorios de referencia. Debido a esto, las muestras deben ser transportadas bajo estrictas condiciones de conservación y aún así pueden llegar deterioradas. El uso del papel de filtro podría ser una alternativa para la recolección y transporte de las muestras. El objetivo del presente trabajo fue comparar los resultados de las técnicas de ELISA, HAI e IFI utilizando muestras de sangre colectadas en tubo y en papel de filtro. Las muestras se procesaron mediante las técnicas de Inmunoensayo Enzimático (ELISA), Hemaglutinación Indirecta (HAI) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Para las muestras de papel se hicieron eluciones de 1/50 a diferentes tiempos para ELISA e IFI, y de 1/25 para HAI. Se obtuvo una sensibilidad de 91% y una especificidad de 100% en el diagnóstico de las muestras colectadas en papel de filtro a través de las tres técnicas inmunológicas. Al compararlo con los resultados de las muestras colectadas en tubo se encontró un índice de kappa 0,91 ($P < 0,001$), lo que indica una alta concordancia entre las dos técnicas de recolección de muestras y la confiabilidad de los resultados.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, diagnóstico, papel de filtro.

ABSTRACT

Immunological diagnosis of Chagas disease from samples collected on filter paper.

Chagas disease is produced by the parasite *Trypanosoma cruzi*. Immunological diagnosis methods are the most used, but they present problems of cross reactions with Leishmaniasis and Rangeliosis. For this reason, the World-Health-Organization (WHO) suggests the use of three different immunological tests. In Venezuela, the three tests are only available in research centers and laboratories of reference. Consequently, many samples must be transported under strict conditions of conservation, and despite

this, they may become spoiled before arriving at the mentioned centers. The use of the filter paper could be an alternative for the collection and transportation of the samples. The aim of the present work was to compare the results of ELISA, HAI and IFI techniques using blood samples collected in tubes and in filter paper. The samples collected in tubes and filter paper were processed by ELISA, HAI and IFI techniques. For the filter paper samples elutions of 1/50 were done at various times for ELISA and IFI, and of 1/25 for HAI. Was obtained a sensibility of 91 % and specificity of 100 % in the final diagnosis of the samples collected in filter paper using the three techniques before mentioned, finding a kappa index of 0.91 ($P < 0.001$) in both types of samples, indicating a high concordance between the two sample collection techniques and thus the reliability of the results obtained by means of three immunological techniques.

Key words: Chagas Disease, diagnosis, filter paper.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (triatominos) (1-3). Sin embargo, también existen otros mecanismos de transmisión, tales como: transfusión sanguínea, transmisión congénita, por trasplantes de órganos, transmisión accidental (4-6) y transmisión oral (7).

La enfermedad de Chagas comprende una fase aguda caracterizada por una abundante parasitemia seguida de una recuperación completa o de la instauración de la fase crónica de la enfermedad, con una parasitemia escasa y un curso clínico impredecible que va desde la ausencia de síntomas hasta una enfermedad severa con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que puede ocasionar la muerte (8).

La Organización Mundial de la Salud señala que 90 millones de personas en

América Latina están expuestas al riesgo de contraer la enfermedad y entre 16 y 18 millones de personas están infectadas en los 21 países endémicos (5).

En Venezuela se ha detectado una seroprevalencia de 11,7 %; con 8,5 % de infantes seropositivos menores de 10 años. Ello es indicativo de una transmisión activa y sugiere la re-emergencia de la enfermedad (9-12). Por otro lado, durante los últimos años se han presentado brotes epidémicos de la Enfermedad de Chagas, tales como el del municipio Chacao y el de Chichiriviche de la Costa, donde se observó miocarditis y varias muertes (7,13).

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas es difícil de realizar; la identificación parasitológica pocas veces se logra, sobre todo en la fase crónica de la enfermedad, donde la parasitemia es escasa. El diagnóstico inmunológico tiene problemas en cuanto a reacciones cruzadas con varias especies de *Leishmania sp.* y *Trypanosoma rangeli* (14-15). Por otro lado, la mayoría de las zonas donde se encuentra *T. cruzi* son coendémicas para *Leishmania sp.* y *T. rangeli*, lo que complica el diagnóstico (9, 16). Por esta razón, la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere la ejecución de tres pruebas inmunológicas diferentes, con la coincidencia de al menos de dos para el correcto diagnóstico de la Enfermedad de Chagas (17).

Para cualquier técnica de diagnóstico es muy importante la adecuada recolección de la muestra. Para garantizar la calidad de las muestras se deben tomar en cuenta la manipulación, conservación y transporte de las mismas (18). La recolección de muestras de sangre en tubo es la más común. El análisis debe hacerse antes de las 4 horas de su recolección, ya que podrían producirse modificaciones de importancia diagnóstica (19).

Si las muestras deben ser trasladadas, éstas deben ser transportadas en envases apropiados entre 4 a 8 °C para preservar la muestra y evitar la contaminación. El transporte debe realizarse de manera cuidadosa, pues el movimiento brusco puede causar la hemólisis e interferir con el análisis de las muestras (20).

En la recolección de muestras en papel de filtro la sangre puede tomarse por punción capilar. Ésta permite tomar poca cantidad de sangre, haciendo una punción en el dedo en los adultos o en el talón en recién nacidos (21). La cantidad de sangre que se deposita en el papel es aproximadamente de cuatro a cinco gotas, y se debe dejar secar. La conservación se realiza en un sobre o en una bolsa en un lugar fresco, seco y en oscuridad, donde las muestras pueden conservarse durante varios años (19).

La utilización de esta técnica trae numerosas ventajas, tales como procedimiento de recolección sencillo, tomar pequeños volúmenes de sangre, posibilidad de almacenamiento a temperatura ambiente por períodos prolongados, posibilidad de transporte a costos reducidos, reducción de los riesgos de contaminación por manipulación del material, y es más económica que la recolección en tubo, además de que es muy útil en el caso de recién nacidos (21).

Por otro lado, la recolección de las muestras en papel de filtro es una técnica que ha sido utilizada en distintas investigaciones para la detección de anticuerpos, no obteniéndose diferencias significativas entre las diferentes muestras, lo que demuestra que la técnica puede ser de gran utilidad para los estudios clínicos y epidemiológicos (22-24).

A pesar de la existencia de diversos métodos para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, en Venezuela

la disponibilidad de las tres pruebas confirmatorias sólo se halla en centros de investigación y en laboratorios de referencia (24-25). Por otro lado, la Enfermedad de Chagas se localiza mayormente en zonas rurales alejadas de la ciudad, donde se torna difícil el transporte de las muestras a los laboratorios de referencia (10).

La recolección, transporte y conservación de las muestras de sangre desde sitios remotos generan problemas para los estudios epidemiológicos; el deterioro de las muestras colectadas puede causar errores al momento del análisis de las técnicas (26). Por tal razón, la recolección y transporte de las muestras a través del papel de filtro podría ser una alternativa sencilla que no requiere de cuidados extremos para su envío al laboratorio de referencia. En Venezuela, aunque esta técnica de recolección de muestras se ha utilizado, la misma no ha sido evaluada ni comparada con la recolección convencional. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar la "técnica de papel filtro" con respecto a la técnica de "colecta de sangre en tubo" para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, mediante las técnicas inmunológicas ELISA, HAI e IFI, determinando los índices diagnósticos y la concordancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra biológica. Se utilizaron muestras de suero y de sangre en papel de filtro de:

- 20 pacientes con Enfermedad de Chagas confirmada mediante diagnóstico clínico, inmunodiagnóstico y métodos parasitológicos (controles positivos).
- 30 individuos sanos, negativos a las técnicas inmunológicas y sin síntomas ni historia de contacto con la enfermedad (controles negativos).
- 20 individuos con otras parasitosis relacionadas (Leishmaniasis visceral y

cutánea, toxoplasmosis, malaria, y helmintiasis), diagnosticadas por técnicas inmunológicas y parasitológicas (controles heterólogos).

Preparación del antígeno. Se preparó el antígeno de Maeckelt de *T. cruzi*, a partir de los cultivos del parásito, los cuales se sometieron a congelación-descongelación. Se hizo la deslipidación con benceno y se almacenó hasta su uso (27).

Estandarización de la elución de la sangre a partir de papel de filtro. Se colocó un disco de papel de filtro impregnado de 6 mm de diámetro, en un microtubo con 1 mL de buffer fosfato salino (PBS), incubándolo a temperatura ambiente. Se realizaron pruebas con 2 horas de elución de muestras, y toda la noche. El disco de papel equivale a 50µL de sangre, aproximadamente 20µL de suero (24), diluidos en 1 mL de PBS (dilución 1/50), la cual se utilizó directamente para los ensayos y se hicieron diluciones seriadas a partir de allí; en el caso de HAI se obtuvo una dilución 1/25 añadiendo 500µL de PBS.

Hemaglutinación Indirecta. Se trataron glóbulos rojos de carnero con ácido tánico y se sensibilizaron con el antígeno de Maeckelt de *T. cruzi*. La prueba se aplicó en placa realizando diluciones (1/25, 1/50, 1/100) del suero o eluido con PBS, a las cuales se les agregaron los glóbulos rojos sensibilizados. Se incubó a temperatura ambiente de 2-3 horas y se observó como resultado positivo la formación de hemaglutinación (28).

Inmunofluorescencia Indirecta. Epimastigotas de *T. cruzi* se colocaron en una solución de formaldehído al 2%. Se fijaron en láminas para inmunofluorescencia y se dejaron secar. Posteriormente se colocaron los sueros o eluidos, a la dilución 1/50 y se incubó a 37°C por una hora en cámara húmeda. Posteriormente, se lavó con PBS-Tween 20 y se le agregó anti-IgG humana marcada con fluoresceína (Sigma). Se

incubó por una hora a 37°C en cámara húmeda y se observó al microscopio de fluorescencia (29).

ELISA. Se sensibilizaron placas (Immulon 2HB) con antígeno de Maeckelt de *T. cruzi* (5µg/mL) y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) al 1%. Posteriormente, se colocaron 100 µl de cada suero o eluido (dilución 1/50) y se incubó 1h a 37 °C. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween20 al 0,05%. Luego se añadió 100 µl de conjugado anti-IgG humana acoplado a peroxidasa (Pierce) (diluido 1/25000 en PBS) y se incubó a 37 °C 1 h. Después, se lavaron las placas con PBS-Tween20 al 0,05% y se añadió 100 µl de sustrato ácido 2,2' azo bis 3-etil-benzotioasoico (ABTS) (Sigma). Se incubó a 37°C durante 20 minutos y se midió la densidad óptica (DO 405 nm) (30).

Análisis de resultados. Se determinaron los índices diagnósticos de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos y se compararon los resultados obtenidos empleando las muestras colectadas en tubos y en papel de filtro. Se determinó el índice de *kappa* de Cohen's calculado mediante el programa Stat Xact 8.0 para Windows, para evaluar la concordancia entre los resultados.

RESULTADOS

Determinación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante ELISA, HAI e IFI con muestras de sangre colectadas en tubo. En primer lugar, se realizó la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de sangre colectadas en tubo por las técnicas de ELISA, HAI e IFI, según la metodología descrita. En la Tabla 1 se observan los resultados de las diferentes muestras.

Tabla 1. Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante ELISA, HAI e IFI utilizando muestras colectadas en tubo de controles positivos, negativos y heterólogos.

Controles	N° de sueros	TÉCNICAS					
		ELISA		HAI		IFI	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivos	20	19	1	20	0	20	0
Negativos	30	0	30	0	30	0	30
Heterólogos	20	0	20	0	20	0	20

En la tabla anterior se evidencia por la técnica de ELISA una sensibilidad de 95%, ya que sólo uno de estos controles resultó negativo. Sin embargo, al analizar los resultados de dicho suero por la técnica de HAI e IFI se demuestra la positividad del mismo, al igual que los demás controles positivos, por lo que esta diferencia se debe a la técnica y no a una baja reactividad del suero. Por otro lado, las tres técnicas inmunológicas presentaron resultados negativos en un 100% con los sueros controles negativos y sueros heterólogos.

Estandarización de la elución de muestras de sangre a partir de papel de filtro. Se realizaron las técnicas de ELISA, HAI e IFI como se describieron anteriormente, pero empleando diferentes tiempos de elución de las muestras colectadas en papel de filtro (2 horas y toda la noche) (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante ELISA, HAI e IFI utilizando muestras colectadas en papel de filtro (2 horas de elución) de controles positivos y negativos.

Controles	N° de sueros	TÉCNICAS					
		ELISA		HAI		IFI	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivos	10	5	5	4	6	5	5
Negativos	10	0	10	0	10	0	10

Tabla 3. Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante ELISA, HAI e IFI utilizando muestras colectadas en papel de filtro (Toda la noche elución) de controles positivos y negativos.

Controles	N° de sueros	TÉCNICAS					
		ELISA		HAI		IFI	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivos	10	9	1	8	2	9	1
Negativos	10	0	10	1	9	0	10

Los resultados demuestran que en el caso de elución por 2 horas, de 10 muestras controles positivas ensayadas por los tres métodos, la mitad de ellos reportaron un resultado negativo; sin embargo, al dejar eluir dichos controles durante toda la noche se encontró un 90% de positivos.

Determinación anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante ELISA, HAI e IFI con muestras de sangre colectadas en papel de filtro. En la determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de sangre colectadas en papel de filtro se realizó la técnica ELISA de la misma manera que para muestras colectadas en tubo, la técnica de IFI y HAI fueron realizadas según lo descrito anteriormente en la metodología (Tabla 4).

Tabla 4. Muestras de sangre en papel de filtro de controles positivos, negativos y heterólogos evaluados por ELISA, HAI e IFI.

		TÉCNICAS					
Controles	Nº de	ELISA		HAI		IFI	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Referenciales	sueros						
Positivos	20	18	2	17	3	18	2
Negativos	30	0	30	3	27	0	30
Heterólogos	20	0	20	0	20	0	20

La mayoría de los controles positivos ensayados por las técnicas de ELISA e IFI dieron resultados positivos denotando una sensibilidad de 90%. Las dos muestras negativas para ELISA fueron también negativas para IFI. En cuanto a los controles negativos y heterólogos para el ensayo de ELISA e IFI se obtuvo una especificidad del 100%. Por otra parte, en la técnica HAI la sensibilidad fue 85%; sin embargo, las tres muestras negativas para HAI dieron resultados positivos para ELISA e IFI indicando la positividad de las mismas. En el caso de los controles negativos, la especificidad fue de 90% ya que 27 muestras fueron correctamente diagnosticadas como negativas de 30 evaluadas. Las tres muestras que dieron resultado positivo para HAI reportaron ser negativos por los otros dos métodos (ELISA e IFI) por lo que se asegura la negatividad de dichas muestras. Con respecto a los controles heterólogos ensayados, se obtuvo una especificidad de 100% con todas las técnicas.

Comparación de los índices diagnósticos de las tres pruebas inmunológicas en función de las dos técnicas de colecta de muestra sanguínea. Para el cálculo de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos se usaron las formulas respectivas para cada una de ellas obteniendo los resultados expresados en la Tabla 5.

Tabla 5. Índices diagnósticos de ELISA, HAI e IFI con muestras de suero y en papel de filtro.

Índices diagnósticos	ELISA		HAI		IFI	
	Suero	Papel de filtro	Suero	Papel de filtro	Suero	Papel de filtro
Sensibilidad	95%	91%	100%	85%	100%	91%
Especificidad	100%	100%	100%	94%	100%	100%
VPP*	100%	100%	100%	87%	100%	100%
VPN*	98%	96%	100%	94%	100%	96%

*VPP: valor predictivo positivo. *VPN: valor predictivo negativo.

Aún cuando para las técnicas de ELISA e IFI se observa una pequeña variabilidad en la sensibilidad con respecto a los dos tipos de muestras, la misma no fue estadísticamente significativa, ya que se obtuvo un índice de *kappa* de 0,95 y un valor de $P < 0,001$, lo que indica que existe una buena concordancia entre los resultados de estas técnicas con los dos tipos de muestras. En cuanto a los valores predictivos, se tiene que para el ELISA se observó una pequeña diferencia en el VPN, aunque la misma tampoco fue estadísticamente significativa.

En el caso de la técnica de HAI, la variabilidad entre los diferentes tipos de muestras fue mayor comparándola con los resultados de las otras técnicas. Sin embargo, se obtuvo un índice de *kappa* de 0,75 y un valor de $P < 0,001$, lo que demuestra que son valores aceptables para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En cuanto a los valores predictivos, se mantuvo la misma variabilidad.

Por otro lado, tomando en conjunto las tres pruebas para la detección de la Enfermedad de Chagas, se obtuvo una sensibilidad de 91% con una especificidad de 100% en las muestras colectadas en papel de filtro. Al comparar estadísticamente el

diagnóstico de la Enfermedad de Chagas mediante estas técnicas con el uso de ambos tipos de muestra, se obtuvo un índice de *kappa* 0,91 y un valor de $P < 0,001$, lo que indica una alta concordancia de los resultados con respecto a los diferentes tipos de muestras.

DISCUSIÓN

Para cualquier método de diagnóstico es muy importante la adecuada recolección, manipulación, conservación y transporte de la muestra. La Enfermedad de Chagas se localiza mayormente en zonas rurales o urbanas marginadas alejadas de la ciudad, donde se vuelve difícil la adecuada conservación y transporte de las muestras a los laboratorios de referencia (10). Se han realizado varios estudios que reflejan que la colección de sangre en papel de filtro puede ser una alternativa sencilla para la recolección, transporte y almacenamiento de las muestras (18-24, 26).

Se evidenció por la técnica de ELISA una sensibilidad menor en los controles positivos. Sin embargo, al analizar los resultados por las otras técnicas se demuestra la positividad de los mismos, por lo que esta diferencia es inherente a la técnica y no se debe a una baja reactividad de las muestras como tal. Resultados similares fueron los encontrados por Cannova y cols. en el 2002 (25) donde observaron una sensibilidad de 97% y 99% para ELISA y HAI, respectivamente. En otro trabajo, Salazar y cols. en el 2007 (31), emplearon ELISA, HAI e IFI con sueros controles positivos y negativos pero, a diferencia de los resultados del presente estudio, obtuvieron mayor sensibilidad con las técnicas de ELISA e IFI y menor sensibilidad en la HAI. De la misma manera, una valoración de dichas técnicas realizada por Añez y cols. en el 2010 (32), revelaron una mayor sensibilidad para el ELISA e IFI

(100%) y menor sensibilidad para HAI (77%). Por otro lado, las tres técnicas inmunológicas presentaron resultados negativos en todos los sueros controles negativos y heterólogos. De esta manera, se confirmó que las condiciones de trabajo eran apropiadas y que las muestras utilizadas como controles fueron los adecuados para el desarrollo de la investigación.

En el caso de elución por 2 horas, 50% de las muestras controles positivos ensayadas por los tres métodos reportaron un resultado positivo; sin embargo, al dejar eluir dichos controles durante toda la noche se encontró un 90% de resultados positivos. Este hallazgo sugiere que para una adecuada elución de la sangre contenida en el papel de filtro es necesaria la incubación por toda la noche. Es importante resaltar que durante los ensayos experimentales se evidenció que aspectos como la temperatura a 37 °C favorecen la elución de la muestra. Otro aspecto de gran relevancia es el tiempo de conservación de las muestras en papel de filtro.

Se ensayaron 10 muestras controles positivos que tenían más de un año de conservación y todas resultaron negativas (datos no mostrados). Esto puede deberse a que a mayor tiempo de conservación, mayor es la fijación de la sangre al papel de filtro y más difícil la elución, lo que conlleva a una disminución importante de la reactividad de las muestras. Resultados similares encontraron Vázquez y cols. en 1991 (21) con la determinación de anticuerpos contra el virus del dengue en sangre contenida en papel de filtro conservada por 6 meses, donde observó una disminución del 50% en los títulos de anticuerpos en dichas muestras.

Se observó una mayor sensibilidad entre los resultados de los ensayos por ELISA e IFI. Resultados similares obtuvieron Palacios y cols. en el 2000 (24), donde evidenciaron una alta sensibilidad para las técnicas de ELISA e IFI, con una concordancia elevada entre ambas técnicas.

Aún cuando, para la técnica de ELISA e IFI se observó una pequeña variabilidad en la

sensibilidad y el VPN con respecto a los dos tipos de muestras, ésta no fue estadísticamente significativa, y se obtuvo una buena concordancia entre los dos tipos de muestras. Resultados similares observaron Gascón y cols. en 1989 (22), en un trabajo para detección de anticuerpos para el diagnóstico de Toxoplasmosis en donde no observaron diferencias entre los resultados de ELISA utilizando muestras en papel de filtro y suero. Además, en un estudio realizado por Palacios y cols. en el 2000 (24) tampoco se encontraron diferencias significativas entre los resultados en suero y en sangre desecada en papel de filtro ni por ELISA, ni por IFI.

En el caso de la técnica de HAI, la variabilidad entre los diferentes tipos de muestras fue mayor comparándola con los resultados de las otras técnicas. Sin embargo, se obtuvo un índice de $kappa$ de 0,75 y un valor de $P < 0,001$, lo que demuestra que siguen siendo valores aceptables para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. En cuanto a los valores predictivos, se mantuvo la misma variabilidad, conservando de igual manera aceptable la capacidad de discriminar positivos y negativos con ambos tipos de muestras.

Tomando en conjunto las tres pruebas para la detección de la Enfermedad de Chagas, se obtuvo una sensibilidad y especificidad elevadas en las muestras colectadas en papel de filtro y una alta concordancia con los resultados de las muestras colectadas en tubo. Aunque resulta muy difícil conseguir las muestras controles adecuadas y la disponibilidad de las mismas es una limitante, sería recomendable realizar estudios con mayor número de muestras.

En conclusión, los resultados sugieren que la técnica de colecta de sangre en papel de filtro permite la obtención de resultados confiables mediante las técnicas inmunológicas ELISA, HAI e IFI, sin diferencias significativas con respecto a las muestras colectadas en tubo.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo fue financiado por Ayuda Menor CDCH-UC 0440-10 y Ayuda Menor CDCH-UC-0450-10. Universidad de Carabobo.

REFERENCIAS

1. Atias A. Enfermedad de Chagas. Parasitología Médica. Segunda edición. Publicaciones técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago 1998. p251-64.
2. Becerril M. y Romero C. Enfermedad de Chagas y otras Tripanosomosis. Parasitología Médica. Segunda edición, McGraw-Hill Interamericana Editores S.A. México 2008. p125-37.
3. Botero D, Restrepo M. Tripanosomiasis Americana. Parasitosis Humana. Cuarta edición. Corporación para Investigaciones Biológica. Bogotá 2005. p210-29.
4. Schmunis G., Zicker F., Pinheiro F., Brandling-Bennett D. Risk for Transfusion-Transmitted Infectious Diseases in Central and South America. Emer Infect Dis 1998; 4: 5-11.
5. WHO. (2002). Control of Chagas Disease [Documento en línea]. Disponible: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf [Consulta: Abril 25, 2010].
6. Carlier Y. y Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36: 767-71.
7. Alarcón de Noya B., Díaz-Bello Z., Colmenares C., Ruiz-Guevara R., Mauriello L., Zavala-Jaspe R. y cols. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. J Infect Dis 2010; 201: 1308-15.
8. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2001; 1: 92-100.
9. Añez N., Carrasco H., Parada H., Crisante G., Rojas A., González N. y cols. Acute chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. Am J Trop Med Hyg 1999; 60: 215-22.
10. Añez N., Crisante G., Rojas, A. Update on Chagas Disease in Venezuela. A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99: 781-7.

11. Aché A., Matos A. Interrupting Chagas disease transmission in Venezuela. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; 43: 37-43
12. OPS/OMS. (2002). Análisis preliminar de la situación de salud en Venezuela [Documento en línea]. Disponible: <http://www.ops-oms.org.ve/site/venezuela/ven-sit-salud-nuevo.htm> [Consulta: Marzo, 2007].
13. Rísquez A. Mortalidad por enfermedad de Chagas. A propósito de los brotes de Chagas agudo como enfermedad reemergente de transmisión alimentaria. *Gac Med Caracas* 2009; 117: 319-21.
14. Saldana A., Sousa O. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: Crossreaction among their Immunogenic Components. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 82-3.
15. Vexenat A., Santana J., Teixeira A. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1996; 38: 177-85.
16. Campos Y., Briceño L., Reina K., Figarella K., Pérez J., Mosca W. Serological diagnosis of Chagas disease: evaluation and characterisation of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2009; 104: 914-17.
17. Organización Mundial de la Salud (OMS). Control de la Enfermedad de Chagas, Comité de expertos. Serie de Informes Técnicos nº 811. Ginebra 1991. p. 1-95.
18. García M., Cabezas C., Martos L., González A., Acosta R. Determinación de anticuerpos IgM contra el virus dengue a partir de sangre absorbida en papel filtro: un método alternativo y sencillo. *Rev Med Exp* 2000; 17: 21-5.
19. Rodríguez L., Ribas M., Díaz B., Roque A., Aragón U., Martínez R. Toma de muestra en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM antiviral de la hepatitis A. *Rev Cubana Med Trop* 1998; 50: 42-7.
20. Suardiá J. *Laboratorio Clínico*. (1era edición).: Editorial Ciencias Médicas La Habana Cuba 2001. p. 11-8.
21. Vázquez, S., Fernández, R. y Llorente, C. Utilidad de sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1991; 33: 309-11.
22. Gascón J., Torres J., González C. Utilidad de las muestras de sangre total desecada en papel de filtro en la detección de anticuerpos antitoxoplasma. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1989; 31: 100-2.
23. Bonfante G., Cárdenas E., Amaro A. Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en zonas rurales del estado Lara. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México. 1999; 14: 1.
24. Palacios X., Belli A., Espino A. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. *Rev Panam Salud Pública* 2000; 8: 411-17.
25. Cannova D., Aguilar M., Pacheco M., Simons M., Medina, M. Validación del Inmuno Ensayo Enzimático (ELISA) y Hemoaglutinación Indirecta (HAI) para el Serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Salus*, 2002; 6: 4-9.
26. Bencomo J., Castro A., Martí J., Prates S., Appolinário M., Oliveira A. Comparación de calidad del papel de filtro Hahnemuehle 2992 con el Schleicher & Schuell 903 en la conservación de la sangre seca para el estudio poblacional de anticuerpos IgM e IgG de la sífilis. *Rev Bras Enf Trans Sex* 2009; 21: 34-7.
27. Maekelt A. Diagnóstico de laboratorio de la Tripanosomiasis Americana. *Rev Venez Sanid Asist Soc*, 1964; 29: 1-18.
28. Camargo M., Hoshino S., Correa N., Peres B. Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extract. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1971; 13: 45-50.
29. Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification

- employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop S Paulo 1966; 8: 227-34.
30. Voller A., Bidwell D., Huldt G., Engvall A. Microplate enzyme-linked immunosorbed assay for Chagas disease. Lancet 1975; 1: 426-8.
 31. Salazar P., Rojas G., Bucio M., Cabrera M., García G., Ruiz, A. Guevara Y., Tapia R. Seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y su asociación con factores de riesgo en menores de 18 años de Veracruz, México. Rev Panam Salud Pública 2007; 22: 75-82.
 32. Añez N., Romero M., Crisante G., Bianchi G., Parada H. Valoración comparativa de pruebas serodiagnósticas utilizadas para detectar enfermedad de Chagas en Venezuela. Bol Mal Salud Amb. 2010; 50: 17-27.