

LABORATORIO

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Rodrigo Siqueira-Baista *
Luis Eduardo Meneses Quintas **
Rubén Alberto Storino ***

SUMMARY

In the present paper it was intended to establish the most important aspects on the Chagas' Disease diagnosis, characterizing its laboratory stage. Were observed the major assays, their indications, contra-indications and sensibility in the different phases of the disease (acute, indeterminded and chronic phases). We hope to be contributing this way to widen the knowledge on this so severe and prevalent disease.

Key Words: Chagas's Disease. Laboratory Diagnosis.

*Entrenamiento del Departamento de Cirugía Cardíaca del Hospital Universitario Pedro Ernesto (HUPE) y del Departamento de Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas - UERJ.

** Estudiante de Maestría en Farmacología por el Departamento de Farmacología Básica y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ).

*** Doctor en Medicina y profesor de la Universidad Nacional de La Plata.

1- Trabajo realizado en la Facultad de Ciencias Médicas -UERJ, y en el Instituto Cardiovascular de La Plata - INCALP (Argentina).

INTRODUCCION

Podemos tener clara noción de la importancia del diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas, si tenemos en cuenta que solamente 5,0% de los individuos infectados presentan los síntomas y señales característicos de la patología ^{4,31}. Veremos ahora los aspectos generales de los principales métodos de diagnóstico de laboratorio (Cuadro 1)

1- MÉTODOS DE DIAGNOSTICO PARASITOLÓGICO

1a) METODOS DIRECTOS:

Utilizados preferentemente en la investigación de la enfermedad de Chagas (EC) aguda, por cuenta de la alta parasitemia característica de esta fase.

- Examen a fresco ^{4,27}:

Es un método sencillo y sensible, en situaciones donde la parasitemia es elevada (fase aguda). Para realización del examen, se coge una gota de sangre del paciente (por ejemplo a través de punción digital), poniéndola en la lámina y cubriéndola con una laminilla. Se lleva al microscopio en busca de formas tripomastigotas.

CUADRO 1 METODOS DE LABORATORIO UTILIZADOS EN LA INVESTIGACION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	
Diagnóstico Parasitológico	Diagnóstico Inmunológico
DIRECTO	
<ul style="list-style-type: none"> • Examen en fresco • Gota gruesa • Método de Deane e Kirchner • Método de Silicones 	<ul style="list-style-type: none"> • Fijación del Complemento • Hemaglutinación • Inmunofluorescencia • Reacciones Inmunoenzimáticas • Aglutinación de látex
<ul style="list-style-type: none"> • Tripla centrifugación de Martín-Leubouef-Rouband • Método de Strout • Punción biopsia de nódulos linfáticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Flocculación rápida
INDIRECTO	
<ul style="list-style-type: none"> • Inoculación en animales sensibles • Xenodiagnóstico • Hemocultivos 	

- Gota gruesa ^{27,22}:

Método preconizado por Salvador Mazza, consiste en colocar 2 o 3 gotas de sangre sobre una lámina, reuniéndolas para confeccionar una única mancha circular de 1cm de diámetro. Después de la sangre secar, métese la lámina en agua destilada, para que ocurra hemolisis (y así se torne más transparente), se obtiene la coloración por el GIEMSA. Se examina al microscopio, averiguando la presencia de parásitos.

- Distensión Sanguínea ²⁷:

Se coloca una pequeña porción de sangre sobre una lámina (completamente desengrasada), próxima a una de sus extremidades. Se apoya otra lámina sobre la primera, en un ángulo de 45° y a seguir, se distiende la gota a lo largo de la lámina, de modo de moverla del

punto inicial. Secar la lámina, fijarla y colorearla por el método de GIEMSA.

- Método de Deane y Kishner¹³:

Básase en el hecho de la lisis de eritrocitos puede ocurrir más rápidamente que la de los tripomastigotas sanguíneas. A 1ml de sangre añádase 9 ml de agua destilada, póngase inmediatamente después 1ml de solución de NaCl a 17%, para mantener la osmolaridad del medio y consecuentemente mantener los tripanosomas intactos. Se centrifuga a 2000 rpm por 15 minutos, llévase el sedimento obtenido al examen microscópico.

- Método de Silicones ²⁸:

Se coloca la sangre sobre aceite de silicone de densidad 1075, el cual actúa como filtro. Después de centrifugada, los glóbulos rojos ("más pesados") se depositan en el fondo de los parásitos, los leucocitos y las plaquetas quedan en el sobrante y es observado al microscopio.

- Método de la triple centrifugación de Martín-Leubouef-Rouboud ⁷:

Se deposita 10 ml de sangre venoso en un tubo de ensayo conteniendo 1ml de solución a 20% de citrato sódico. Se procede entonces tres centrifugaciones -la primera a 1800 rpm/7min.; la segunda a 2000 rpm/10 min.; utilizando el sobrante de la anterior; y por fin a 2000 rpm/20 min. con el residuo de la segunda centrifugación. De este último centrifugado se retira el sobrante y analiza el sedimento al microscopio.

- Método de Strout ^{32,7}:

Se coge 5ml de sangre, se dejan en reposo a temperatura ambiente, para que la coagulación y retracción espontánea del coágulo ocurra. Se centrifuga el suero obtenido a 160g/5 min., para la separación de los eritrocitos aún en suspensión, y enseguida se hace nueva centrifugación a 350g/10 min., para obtención del sedimento que será observado en el microscopio. Este método tiene alta sensibilidad, pudiendo alcanzar 95% de éxito en la fase

aguda^{33,15}.

- Punción Biopsia de Nódulos Linfáticos³⁰:

Por su gran afinidad a las células del Sistema Retículo-Histiocitario^{11,12}, el T. cruzi desde temprano puede ser encontrado en nódulos linfáticos, parasitando macrófagos, dispersos en exudato inflamatorio (especialmente en casos de adenitis satélite y chagoma de inoculación). Así, se hacen del material biopsiado, se puede investigar una posible infección por T. cruzi.

IB) MÉTODOS INDIRECTOS

Utilizados tanto en la fase aguda como en la fase crónica, pero por tratarse de ensayos que pretenden encontrar parásitos, su sensibilidad en la fase crónica no es muy alta.

- Inoculación en animales sensibles³³:

Es un método preferentemente utilizado en el aislamiento de parásitos, teniendo algunas restricciones para su diagnóstico de rutina - (1) El desarrollo de los parásitos en el animal dependerá de las características del T. cruzi; (2) Mantenimiento de animales para su investigación es dispendiosa y también muy laboriosa; (3). Tiempo prolongado para obtención de resultados (entre 7 y 20 días⁶). No obstante, la inoculación aún se utiliza para el diagnóstico en algunos Centros de Pesquisas.

- Xenodiagnóstico:

Lo fundamental de este método es la simulación en el laboratorio de condiciones naturales para ciclo evolutivo del T. cruzi en los Triatomíneos, hasta entonces exento de infección²⁷. Se utilizan 4 cajas con 10 ninfas de tercer grado (alimentadas durante toda la vida en aves, para garantizar la "virgindad" de infección de las ninfas), con una fase abierta, cubierta solamente por una cepa delgada de tul. Se aplica esta fase en el antebrazo del paciente por 30 min., y después de este período, se guardan las cajas en condiciones adecuadas (local oscuro a 27°C), para desarrollo del insecto. La lectura se realiza por la observación del contenido intesti-

nal del insecto, 30 y 60 días tras de la aplicación^{33,16}. Durante la realización de examen, pueden ocurrir reacciones alérgicas, siendo necesario en tales casos, la prescripción de pomadas con corticoides³³. La sensibilidad aceptada para el xenodiagnóstico es alrededor de 100% para la fase aguda³³ y 5,3¹⁷ hasta 50%²⁶ de positividad para la fase crónica, para pacientes conocidos como chagásicos. El xenodiagnóstico está siendo motivo de numerosos estudios^{17,12}, con el propósito de mejorar la técnica e incrementar la sensibilidad en la fase crónica (por ejemplo, se utiliza solamente en Triatomíneos hembras²⁵).

- Hemocultivos:

Esta es una técnica diagnóstica que requiere menos infraestructura que el xenodiagnóstico³³. La técnica empleada para la realización de hemocultivos es demostrada en el cuadro II.

CUADRO II TECNICA PARA LA REALIZACION DE HEMOCULTIVO
1- Se procede la colecta de 30 ml de sangre del paciente a ser investigado, se utiliza como anticoagulante la Heparina o la EDTA;
2- Centrifugar la sangre a 300g/10 min., a temperatura ambiente;
3- Dejar en reposo por una hora (también a temperatura ambiente);
4- Separar el sobrelíquido (plasma) del sedimento (fundamentalmente eritrocitos), centrifuga el primer a 900 g/30 min., a temperatura de 4°C, adicionando 5ml de LIT al sedimento obtenido durante esta centrifugación;
5- Centrifúguese y lávese el sedimento de eritrocitos con 10ml de medio LIT, y dividirlo a 6 tubos conteniendo 3ml de medio LIT cada;
6- Incubar los tubos a 27°C, procédase a la suave homogeneización bisemanal;
7- Hacer lecturas tras 30, 60, 90, y 120 días, recójase 1 gota del medio de cultivo, póngase sobre lámina de vidrio limpia y posteriormente cúbrase con laminula. Llévase al microscopio y examine toda la lámina en busca de parásitos.

A lo largo de los años, muchos Grupos Científicos se han esmerado en busca de mejores técnicas de hemocultivo. Tanto para aumentar la sensibilidad, como para el xenodiagnóstico, es baja en la fase crónica (positividad máxima aceptada alrededor de 50%^{33,24}).

La mayoría de los trabajos¹²⁻²³ utilizando el medio LIT, han variado la positividad de 25,7%³³ hasta 71,4%²³, dependiendo del número de repeticiones del examen (cuanto mayor el número de repeticiones, mayores son las tasas de positividad¹¹). Vale la pena resaltar un relato descrito en la literatura¹, en la cual la positividad del método fue de 100%, en tal eventualidad se utilizaron dos series de exámenes. Actualmente, se está estudiando la interferencia de diversos factores, que pueden responder por la baja de positividad del método en la fase crónica, como por ejemplo diferencias en cuanto al anticoagulante empleado¹⁸. Con la progresión de éstos y otros trabajos, esperamos en breve, una mayor eficacia de la técnica de hemocultivo y tener resultados más animadores.

2) Métodos de diagnóstico Inmunológico

El Inmunodiagnóstico de la EC, hasta el presente momento, se pronostica la detección de anticuerpos generados en el desenvolvimiento de la evolución de la infección. Teniendo en cuenta los mecanismos inmunológicos de esta enfermedad¹⁹, las técnicas inmunológicas son de destacada relevancia para el diagnóstico de la etapa crónica, llevando gran ventaja sobre los métodos parasitológicos ya descritos. Es interesante resaltar que el inmunodiagnóstico solamente preconizará la enfermedad propiamente³³ que deberá ser identificada también, por hallazgos clínicos. Trataremos ahora las principales reacciones suerológicas utilizadas en el diagnóstico de la EC. Reacción de Fijación del Complemento (RFC): Las reacciones diagnósticas que utilizan la Fijación del Complemento, tiene como principio el agotamiento del Complemento existente en una determinada porción de suero, por inmunocomplejos formados por reacción inmunológica previa²⁷. En la sangre de chagásicos existen anticuerpos anti *T. cruzi*, capaces de ligarse a un antígeno adicionado al medio (derivado del parásito). Este complejo antígeno-anticuerpo es ligado por el Complemento (en la región-Fc de

la Inmunoglobulina), agotando este complejo del medio de la reacción. Tras este adicionado un "Sistema hemolítico"²¹, constituido por glóbulos rojos de carnero ligados a las hemolisinas (anticuerpo anti-eritrocito de carnero), se puede tener los siguientes resultados - (1) Hemolisis, significando reacción negativa, pues en este caso el complemento no fue agotador por el complejo Ag-Ac, teniendo libertad para actuar sobre el complejo eritrocito de carnero-hemolisina; y (2) la ausencia de hemolisis, significa positividad del test, pues el complemento no actuó sobre el complejo eritrocito de carnero-hemolisina, originado de haber sido agotado en la reacción Ag-Ac de la EC. La sensibilidad varía de 84,5%²⁰ hasta 100,0%²⁷, en cuanto a la relación de especificidad, pueden ocurrir reacciones positivas para enfermos con Calazar o Leishmaniosis Tegumentaria Americana²⁷.

- Hemaglutinación:

Las reacciones están basadas en los trabajos de Boyden⁴, que muestran la posibilidad de cambiar las membranas de eritrocitos utilizando ácido tánico, de manera que permitan que éstas sean capaces de incorporar Acs de los parásitos, pudiendo entonces utilizarse los eritrocitos sensibilizados en la detección de Acs del suero-problema. Se coloca una muestra de eritrocitos sensibilizados en una placa tipo Kline³³, y enseguida añádase en suero a ser averiguado, así queda homogenizada la mixtura resultante. Se aguardan 10 min. y enseguida se procede a la lectura. Por corto tiempo de reacción, la facilidad de la técnica y los bajos costos³³, la hemaglutinación es ideal para la regulación en bancos de sangre y averiguaciones epidemiológicas²⁷. Su único inconveniente es la necesidad de la preparación de los eritrocitos sensibilizados, casi que diariamente⁸. La sensibilidad varía de 50%³³ (fase aguda) hasta 100% (fase crónica)²⁰.

- Reacción de Inmunofluorescencia:

Es una de las técnicas más sensibles en

la serología de la EC, se puede utilizar tanto en la fase aguda (detección de IGM), como en la crónica (detección de IGG). Podemos subdividir la Inmunofluorescencia en directa e indirecta, siendo esta última la más utilizada en la detección de la EC. La técnica se resume en la marcación de un anticuerpo anti-inmunoglobulina, con la sustancia fluorescente, siendo este Ac anti-Ac capaz de ligarlo a un complejo Ag (*T.cruzi*) -Ac del paciente chagásico, la fluorescencia aparece, cuando es llevado al microscopio adecuado (equipado con luz ultravioleta). El resumen de la técnica es demostrada en el Cuadro III.

CUADRO III
1) Se coloca una muestra de eritrocitos sensibilizados en una placa tipo Kline; 2) A continuación añádese el suero a ser investigado, luego se homogeniza la mistura resultante; 3) Se espera 10 min., y enseguida se procede la lectura.

Estudios han indicado que la sensibilidad varía de 93%²⁰ hasta valores próximos a 100%²⁷. La especificidad es del orden de 99,7% pudiendo, en raros casos, ocurrir reacciones de falso positivo para Leishmaniosis³³.

-Reacciones Inmunoenzimáticas (ELISA):

Así como la Inmunofluorescencia, estos tests se basan en el uso de Ac anti-Ac. En cambio, al contrario de las sustancias fluorescentes, los Acs utilizados serán marcados con enzimas³⁵. En el ensayo conocido por ELISA (Enzyme linked Inmunosorbent Assay), la reacción se hace en tubos o placas de material plástico con excavaciones, en las cuales la superficie interna es cubierta por Acs (tripanosomas); luego, adiciónese el suero a ser investigado, incúbase el sistema por 2 horas a temperatura ambiente²⁷. Enseguida se lava y adiciónese el Ac anti-Ac enzimáticamente marcado (fosfatasa alcalina o peroxidasa)³³, incubando nuevamente por 3 horas a temperatura ambiente. Se lava de

nuevo, se incluye el respectivo substrato para la actuación enzimática, y una vez más se incuba a temperatura ambiente de 30 min. hasta 1 hora, tiempo al final del cual se adiciona NaOH 3N²⁷, para la interrupción de la reacción enzimática. Leer en espectrofotómetro a 440nm o 400nm (para substratos de fosfatasa alcalina). Por su fácil ejecución, y por su bajo costo²⁷, es indicado para la investigación de la EC en gran escala. Estudios apuntan una sensibilidad de 98,0%²⁰, para ELISA.

-Aglutinación de látex (directa):

Desarrollada en 1971³⁴, teniendo origen similar a la HA (hemaglutinación), pero utilizando partículas de látex adsorbidas con Ag, a la inversa de eritrocitos sensibilizados. La técnica es la misma de la HA, siendo la lectura realizada más rápida (5-7 min.)²⁷. Tanto para la fase aguda³, como para la fase crónica²⁰, la positividad se sitúa en la escala de 94,0%.

- Test de Floculación Rápida²⁹:

En este ensayo, se utilizan Tripanosomas fijados por formol, posteriormente rotos por el ultrason y liofilizados. Para realizar el examen, añádese sobre una lámina de vidrio 1 gota de reactivo ya descrito arriba y una gota del suero-problema, agítese por 8 min. Procédase al final de este intervalo de tiempo a la lectura. La sensibilidad de este método es similar a los ensayos descritos anteriormente.

PERSPECTIVAS^{33,5}

No se cuenta hasta el momento con métodos que permitan pronosticar la evolución de los enfermos, aunque numerosos estudios han sido dirigidos a buscar parámetros que permitan identificar este grupo de pacientes. Hay algunas alternativas para correlacionar el perfil de anticuerpos con la sintomatología clínica. Estos trabajos parecen promisorios pero es necesario realizar un estudio en un gran número de pacientes, a fin de confirmar los resultados.

RESUMEN

Este tipo pretendió establecer los más importantes aspectos del diagnóstico de la enfermedad de Chagas, en su estudio de laboratorio. Fueron observados los mejores ensayos, sus indicaciones, contraindicaciones y sensibilidad en las diferentes etapas (aguda, indeterminada, crónica). Se espera haber contribuido en algo para el conocimiento de esta enfermedad tan importante.

UNITERMOS: Enfermedad de Chagas, Diagnóstico de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Albuquerque, R.D.R.; Fernández, L.A.R.; Funoyama, G.K.; Ferrioli, F.; Siqueira, A.E. - Hemoculturas seriadas con meio de Warren en pacientes con Reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 14(1):1-5, 1972.
- 2) Alcantara, L.M.; Alves, R.P. - Avaliação do emprego de *Diptelogaster maximus* em xenodiagnóstico, na cidade de Salvador, Bahia. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 33 (Supl. 1), 1991.
- 3) Allain, D.S.; Kagan, I.G. - An evaluation of the directed agglutination test for Chagas' Disease. *J. Parasitol.*, 60:179-185, 1974.
- 4) Boyden, S.V. - The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93:107-114, 1951.
- 5) Bracco, M.E.; Braun, M.; Cima, E.V.; Cossio, P.M.; González, S.M.; Laguens, R.M.; Segura, E.L. - *Trypanosoma cruzi* y respuesta inmune en la enfermedad de Chagas. *Prog. Naci. Invest. Enf. Endém.*, 1983.
- 6) Brener, Z.; Chiari, E.; Alvarenga, M.J. - Observación on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over 8 years period in experimental inoculated mice. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 16:32-36, 1974.
- 7) Castro, C.; Emanuel, A. - Comportamento da parasitemia avaliada pelo método de Strout modificado em chagásicos agudos em tratamento. *Rev. Soc. Med. Trop.*, 21(4):177-180, 1988.
- 8) Cerisola, J.A.; Fátala Chaben, M.; Lazzari, J. - Test de hemagglutination para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Proc. VII Inter. Congress Trop. Med. Malaria*, 2:252-260, 1964.
- 9) Criscuolo, R.; Trilla Cortes, E.; Paolasso, R.; Rocca, J. - Investigación de *Schizotrypanum cruzi* por la técnica de Martin-Leubouef-Rouboud. *Ira Conf. Nac. Enf. Chagas*, 1953.
- 10) Chiari, E.; Días, J.C.P. - Nota sobre una nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, maio-junho, 1975.
- 11) Chiari, E.; Días, J.C.P.; Chiari, C.A. - Hemoculturas for the parasitological diagnosis of human chronic chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 22(1):19-23, 1989.
- 12) Chiari, E.; Brener, Z. - Contribuição ao Diagnóstico parasitológico de doença de Chagas em sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 8(3):134-138, 1966.
- 13) Deane, N.P.; Kirchner, R. - Método simple de enriquecimiento para evidenciar tripanosomas no en sangre. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 4:407-412, 1962.
- 14) Días, J.C.P. - Doença de Chagas: Como diagnosticar e tratar. *RBM*, 48(4):136-154, 1991.
- 15) Días, J.C.P. - Doença de Chagas. *JBM* (6):51-82, 1989.
- 16) Días, E. - Técnica de Xenodiagnóstico na molestia de chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 35:335-342, 1942.
- 17) Días, E. - Xenodiagnóstico e algumas verificações epidemiológicas na moléstia de Chagas. Novena Reunión de la Soc. Arg. Patol. Regional, Mendoza, 1935. págs. 89-119.
- 18) Galvão, L.M.C.; Cançado, J.R.; Rezende, D.F.; Kretli, A.U. - Hemoculturas from chronic chagasic patients using EDTA or heparin as anticoagulants. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 22:841-843, 1989.
- 19) Kretli, A.U. - Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in experimental and human infections. *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.*, 3:327-333, 1982.
- 20) Luquetti, A.O.; Castro, A.M.; Nascimento, S.B.; H.J.; Brito, M.F.; Vaz, M.G.M. - Concordancia entre 05 técnicas sorológicas para tripanosomiasis Americana em soros de pacientes portadores da fase crônica da Doença de Chagas. XII Cong. Bras. Parasitol., *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 33 (supl.8), 1991.
- 21) Maeckelet, G.A. - Die komplement kindungsreaktion des chagasprankheit. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 11:152-159, 1960.
- 22) Mazza, S. - Casos crónicos de enfermedad de Chagas determinada en Jujuy. *MEPRA*, 1:1-12, 1934.
- 23) Mourão, O.G.; Mello, O.C. - Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, julho-agosto, 1975.
- 24) Neves, D.P. - Parasitología Humana. 7a. edição. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1988. ágs. 59-90.
- 25) Nunes, E.V.; Campos, R.; Guilherme, C.S.; Tolezano, J.E.; Moreira, A.A.B.; Amato Neto, V.; Pinto P.L.S.; Souza, H.B.W.T.; Matsubara, L. - Estudo sobre o diagnóstico de doença de chagas através de xenodiagnóstico: Influencia de sexo des Triatomíneos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 31 (supl. 7), 1989.
- 26) Pifano, F.C. - El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch. Venez. Patol. Trop. & Parasitol. Med.*, 2:146-151, 1954.
- 27) Rey, L. - Parasitología. 2a. edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992.
- 28) Rohweder, R.W. - Nuevo método de concentración de hemoparasitas extraeritrocitarios. Método de la silicones. *Bolet. Chil. Parasitol.*, 23:42-48, 1962.
- 29) Rose, N. R.; Friedman, H.; Fahey, J.L. - Manual of clinical laboratory immunology. Washington DC, American Society for Microbiology, 1986.
- 30) Rosebaum, M. - Historia natural de la enfermedad de Chagas. Congreso Argentino de Protozoología y reunión sobre enfermedad de chagas. *Acta VI Cong. Nac. Med.*, 3:150-156, 1939.
- 31) Segura, E.L.; González, Cappa, S.M. - Enfermedad de Chagas. *JANO*, 1:53-58, 1983.
- 32) Strout, R.G. - A method for concentrating hemoflagelates. *J. Paras.* 48:100-112, 1962.

- 33) Storino, R; Milei, J. - Miocardiopatía Chagásica crónica: Un enfoque para el clínico general. Buenos Aires, Editorial Club des Estudio, 1986. págs. 121-176.
- 34) Vattuone, M.H.; Yanovsky, J. F. - Trypanosoma cruzi: agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. Exp.

Parasitol., 30:349, 1971.

- 35) Voller, A.; Draper, C.C.; Bidwell, D. E.; Aertlett, A. - A microplate enzyme linked immunoadsorbent assay for Chagas' Disease. Lancet, 1:246, 1975.
-