

Identificación de componentes inmunodominantes de un aislado de *Trypanosoma cruzi* por inmunoblot y su estandarización con fines diagnósticos

Elia Torres-Gutiérrez¹, Dalia Barrios-Palacios², Adela Luisa Ruiz-Hernández¹, Margarita Cabrera-Bravo¹, Yolanda Guevara-Gómez¹, Gloria Rojas-Wastavino¹, Paz María Salazar-Schettino¹ y Martha Irene Bucio-Torres^{1*}

¹Laboratorio de Biología de Parásitos, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D.F.; ²Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Resumen

Introducción: La serología convencional se utiliza para la detección de la infección por *T. cruzi*, con una sensibilidad y especificidad variables, pues gran cantidad de muestras presentan resultados dudosos o discordantes; para su confirmación diagnóstica es necesario desarrollar pruebas complementarias, como el inmunoblot. **Objetivo:** Identificar las principales proteínas inmunogénicas de un aislado de *T. cruzi* y establecer el criterio de positividad para el sistema de inmunoblot. **Material y métodos:** Se realizó la extracción y caracterización antigénica, y se estandarizó el inmunoblot. Se utilizó un panel de 35 sueros reactivos y 30 no reactivos (NR) a *T. cruzi*. Se aplicaron tres metodologías estadísticas para determinar los criterios de positividad. **Resultados:** Los sueros positivos compartieron un patrón con pesos moleculares (PM) de entre 10 y 250 kDa. Doce componentes presentaron una frecuencia de reconocimiento superior al 50%, de los cuales los de 27, 32, 34 y 38 kDa mostraron frecuencias cercanas al 100%. Entre los criterios de positividad evaluados, los componentes de 27 y 32 kDa mostraron una sensibilidad y especificidad del 100%. **Discusión:** El inmunoblot es adecuado para la confirmación de la infección por *T. cruzi*, por lo que se propone como un criterio de positividad altamente específico, especialmente en los casos discordantes.

PALABRAS CLAVE: *Trypanosoma cruzi*. Inmunoblot. Enfermedad de Chagas. Inmunodiagnóstico. Western blot.

Abstract

Introduction: Conventional serology was used for the detection of *Trypanosoma cruzi* infection, with diverse sensitivity and specificity results. Due to the number of samples with doubtful results, it is necessary to develop additional confirmation tests such as the immunoblot. **Objective:** The aim of this study was identify major immunogenic proteins of *T. cruzi* isolate and establish criteria for immunoblot positivity with diagnostic purposes. **Methods:** Immunoblot initial standardization was performed, determining optimal concentrations of antigen, serum, and second antibody. Thirty-five positive and thirty negative sera were assayed to evaluate different criteria of positivity and determine which provides greater sensitivity and specificity. **Results:** Immunoblot of *T. cruzi* positive sera shared a rich pattern of components with molecular weights between 10-250 kDa. Twelve components had a recognition rate higher than 50%, of which the polypeptides of 27, 32, 34, and 38 kDa were close to 100%. Of the positivity criteria evaluated, the recognition of the components of 27 and 32 kDa provided sensitivity and

Correspondencia:

*Martha Irene Bucio Torres
Facultad de Medicina, UNAM
Edificio A, 2.º piso, Laboratorio de Biología de Parásitos
Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México, D.F.
E-mail: marbu@unam.mx

Fecha de recepción: 26-09-2013
Fecha de aceptación: 07-02-2014

specificity of 100%. **Discussion:** The Immunoblot is suitable for confirmation of infection by *T. cruzi*, so it is strongly recommended for confirmation and discrimination of discordant cases. (Gac Med Mex. 2015;151:6-13)

Corresponding author: Martha Irene Bucio Torres, marbu@unam.mx

KEY WORDS: Trypanosoma cruzi. Immunoblotting. Chagas disease. Immunodiagnostic. Western blot.

Introducción

Debido a la importancia para la salud pública que representa la enfermedad de Chagas en México, América Latina y actualmente en países no endémicos, la confiabilidad en el serodiagnóstico es de gran valor. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la técnica del inmunoensayo enzimático (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay* [ELISA]) indirecto por su alta sensibilidad, así como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI), para la confirmación del diagnóstico. El criterio establecido por la OMS señala que para confirmar la seropositividad se debe demostrar reactividad en dos pruebas convencionales. La serología convencional ha sido ampliamente utilizada para el tamizaje, con resultados de sensibilidad y especificidad variables; sin embargo, debido a que gran cantidad de muestras, especialmente de bancos de sangre, presentan resultados dudosos o discordantes y quedan sin confirmación, la OMS sugiere promover el desarrollo de pruebas complementarias para su confirmación, como el inmunoblot (*western blot*)¹⁻³.

En México se han reportado trabajos en los que se realiza *western blot* con extractos de aislados nacionales y sueros de pacientes mexicanos^{4,5}. Nuestro grupo de trabajo caracterizó un extracto semipurificado de un aislado procedente del estado de Morelos (ITRI/MX/1991/TQ) que mostró alta sensibilidad y especificidad en la prueba de ELISA y en *western blot* reveló cinco componentes específicos para *T. cruzi* de 74, 44, 31, 25 y 18 kDa, todos ellos sin cruce inmunológico con *Leishmania mexicana*⁶.

El objetivo del presente trabajo fue identificar las principales proteínas inmunogénicas de un aislado de *T. cruzi* procedente del estado de Morelos y establecer el criterio de positividad para el sistema de inmunoblot con fines diagnósticos.

Material y métodos

Obtención del extracto proteico

El extracto proteico se obtuvo de la fase de epimastigote a partir del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*,

obtenido de *Meccus pallidipennis* del estado de Morelos y que formaba parte del cepario de nuestro laboratorio. La expansión parasitaria se realizó en medio de cultivo *liver infusion tryptose* (LIT) con un 5% de suero fetal de bovino. La cosecha se hizo al final de la fase de crecimiento exponencial. La obtención del extracto antigénico se realizó siguiendo, en términos generales, la metodología descrita por Bucio, et al. en 1999⁶. Después de la cosecha parasitaria, se realizaron cinco lavados con amortiguador de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 2,500 g/20 min/4 °C; se cuantificó la masa parasitaria, se suspendió en una solución de Tris ácido clorhídrico (HCL) 50 mM pH 7.4 en dilución 1:4 y se agregaron inhibidores de proteasas (Complete mini Roche®). La lisis parasitaria se realizó por sonicación con un procesador ultrasónico Vibra Cell VC 50 (Sonics); se aplicaron pulsos de 60 s a 40 W en baño frío y se centrifugó a 43,000 g/60 min/4 °C; finalmente se separó el sobrenadante y se conservó en tubos con tapón de rosca de 1.5 ml a -40 °C hasta su empleo posterior. Se cuantificaron las proteínas por el método del ácido bicinonínico con un reactivo comercial (Pierce® BCA ProteinAssay Kit, Thermo Scientific).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación por PM de los componentes del extracto antigénico se realizó en condiciones reductoras por electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida con gel concentrador al 5% y gel separador al 12.5%. Se siguió, en términos generales, la metodología descrita por Laemmli en 1970⁷, en un equipo Mini Protean III Cell (Bio Rad®) a una diferencia de potencial constante de 150 V, con una fuente de poder modelo 200/2.0 (Bio Rad®). Las muestras fueron preparadas con un amortiguador comercial (Laemmli Sample Buffer, Bio Rad®) y β-mercaptoethanol, y se sometieron a ebullición durante 5 min. Se emplearon marcadores de PM comerciales con un rango de 10 a 250 kDa (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Bio Rad®).

Sueros humanos

Para realizar la titulación inicial del sistema se utilizaron tres sueros testigo con reactividades previamente

Tabla 1. Tabla de contingencia básica y determinación de sensibilidad y especificidad

Inmunoblot	Paneles de sueros	
	Positivo	Negativo
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN
Sensibilidad		Especificidad
$S = \frac{VP}{VP + FN} (100)$		$E = \frac{VN}{VN + FP} (100)$

VP: verdadero positivo; FP: falso positivo; FN: falso negativo; VN: verdadero negativo.

determinadas como reactivo alto (R++), reactivo bajo (R+) y NR. La evaluación estadística del procedimiento se determinó con 35 sueros positivos a *T. cruzi* (+) y 30 sueros negativos (–) pertenecientes a la seroteca del laboratorio y procedentes de diferentes áreas geográficas del país, con una reactividad determinada inicialmente con las técnicas de ELISA, HAI, IFI empleando «antígenos caseros» y el reactivo comercial CHAGATEK ELISA (Biomérieux, Argentina), con una reactividad concordante al ser evaluados en el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben de Argentina.

Inmunoblot (western blot)

En términos generales, se siguió el procedimiento descrito por Towbin, et al.⁸. Después del corrimiento electroforético, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.45 µm en un equipo Trans-Blot Semy-Dry Transfer cell (Bio-Rad®) a una diferencia de potencial de 15 V/30 min. La titulación antigénica se había realizado en la electroforesis con las siguientes cantidades de proteína por pozo: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 µg. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS pH 7.2/Tween 20 al 0.3% en leche semidescremada al 5% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación ligera. Se realizaron

tres lavados con PBS pH 7.2/Tween 20 0.3% y se incubó el suero humano control (+) en diluciones 1:100, 1:200, 1:300 y 1:500, y el suero humano control (–) en dilución 1:100 PBS/Tween 20 0.3%/leche 5%/4 °C en agitación ligera durante la noche. Se realizaron tres lavados y posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa (Invitrogen) en dilución 1:20,000 con PBS/Tween 20 0.3% durante 2 h en agitación ligera a temperatura ambiente. Se realizaron cinco lavados y la reacción se reveló con una solución de peróxido de hidrógeno y 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Bio-Rad®) en PBS pH 7.2 manteniéndola en la oscuridad durante 15 min. La reacción se frenó con agua destilada. Posteriormente se analizó la reactividad de los paneles con 20 µg de proteína por pozo y sueros en dilución 1:100.

Análisis estadístico

Con los resultados del *western blot*, se cuantificaron los componentes detectados por suero, separando positivos y negativos, con lo que se calcularon los valores de media, moda y desviación estándar (DE); por otro lado, se determinó el PM de los componentes y se calculó el porcentaje de presencia de cada uno en el inmunoblot. Con base en lo anterior, se establecieron tres criterios de positividad: el primero fue determinar la cantidad de componentes, la presencia de un componente inmunogénico específico y, en tercer lugar, la presencia de las combinaciones de componentes específicos^{2,4,5,9}. La evaluación de la validez de los criterios se determinó con tablas de contingencia para el cálculo de valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos (Tabla 1). Finalmente, por medio de curvas de características operador-receptor (ROC), se determinaron los criterios de positividad, que proporcionaron más poder de discriminación.

Resultados

Se determinó el rendimiento parasitario y proteico (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento parasitario y proteico

Cultivo (ml)	Masa parasitaria (g)	Antígeno (ml)	Concentración (mg/ml)	Rendimiento proteico (mg)
2,000	3.76	18.8	11.5	216.2

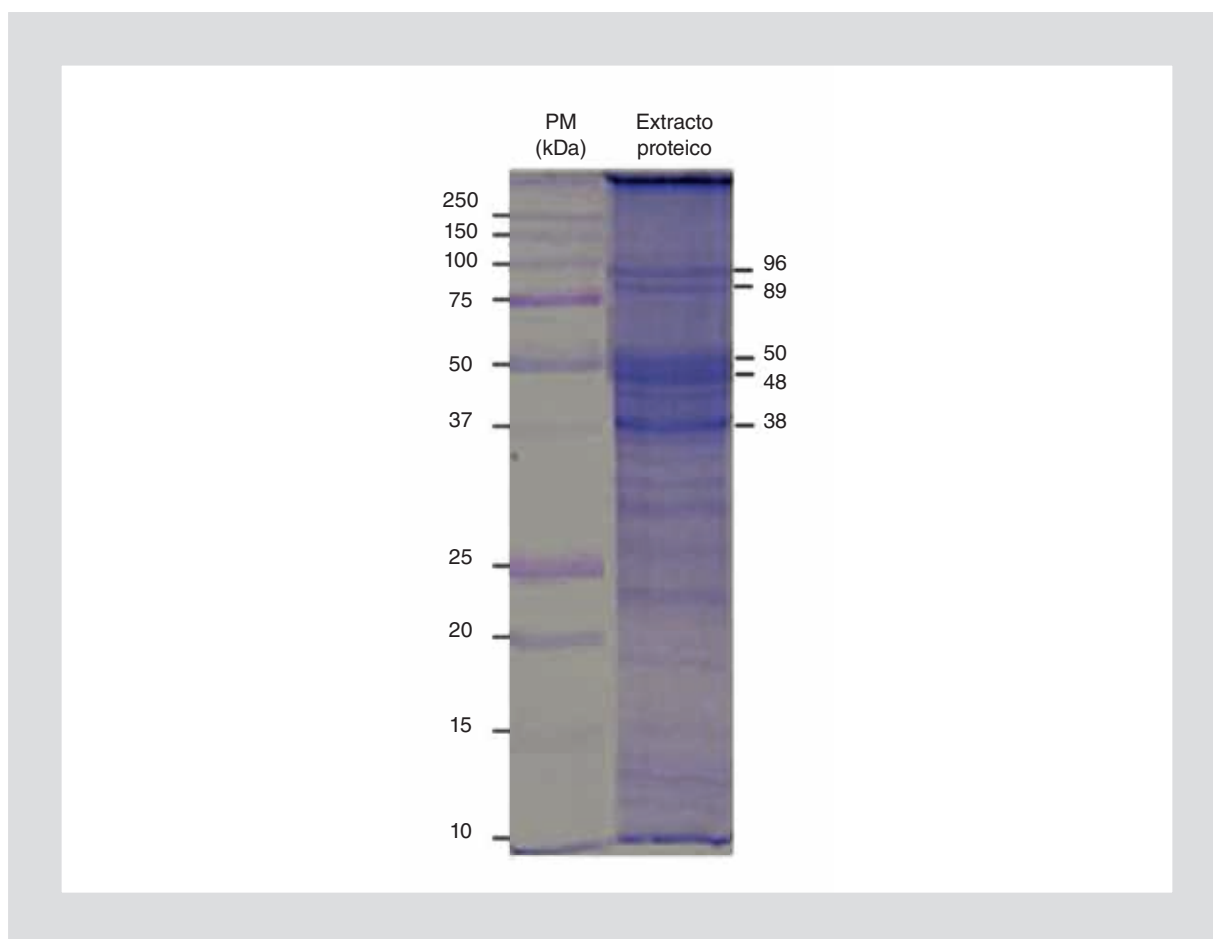


Figura 1. Componentes del extracto proteico del aislado ITRI/MX/1991/TQ de *T. cruzi*. Separación de los componentes mediante SDS-PAGE (tinción con azul de Coomassie).

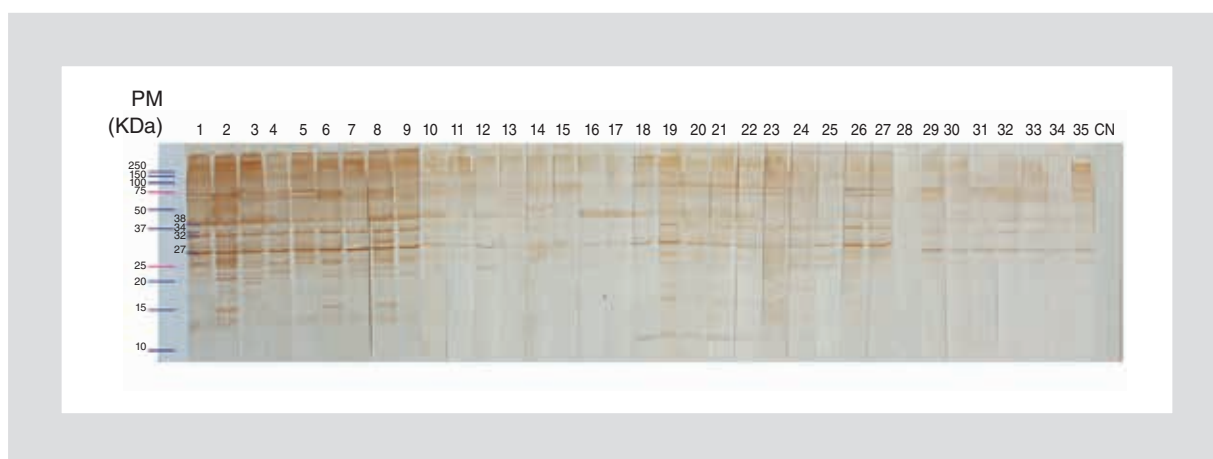


Figura 2. Western blot de 35 sueros reactivos a *T. cruzi*. CN: control negativo.

Patrón electroforético

En el patrón electroforético del extracto se observaron 33 componentes; los de mayor relevancia fueron los de 38, 48, 50, 89 y 96 kDa (Fig. 1).

Inmunoblot con sueros humanos

Al observar la reactividad de los sueros positivos a *T. cruzi*, se observa un patrón rico en componentes con un amplio rango de PM (Fig. 2), cuyo patrón de



Figura 3. Western blot de 30 sueros NR a *T. cruzi*. CP: control positivo.

bando se resume en la tabla 3. El inmunoblot de los sueros negativos se muestra en la figura 3.

Al analizar estas reactividades, se aprecia que los sueros positivos a *T. cruzi* presentan un patrón de reactividad muy diverso, que abarca un amplio rango de PM, que oscilan entre los 10 kDa y más de 250 kDa, y reconocen en promedio 13.7 componentes; sin embargo, se observa un patrón de bandeo compartido en todos los sueros positivos (Tabla 4).

Análisis estadístico

El primer criterio de positividad, respecto al número de componentes reconocidos, fue evaluado mediante el análisis de verdaderos y falsos positivos y negativos (Tabla 5); con base en este criterio, se calcularon los parámetros de sensibilidad y especificidad (Fig. 4), y se observó que a partir de 10 componentes se presentaba una elevada especificidad, en detrimento de la sensibilidad.

Para la evaluación del segundo criterio mediante la presencia de un componente inmunogénico relevante en los sueros positivos, los componentes de 250, 140, 75, 64, 38, 34, 32, 27, 22, 21 y 18 kDa presentaron una frecuencia de reconocimiento superior al 50% (Tabla 3). Cuando se determinó la positividad en el inmunoblot por la presencia de estos componentes específicamente, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad superiores al 70%, y se consiguió un punto de máxima certeza con el componente de 32 kDa (Tabla 6).

Finalmente, con el objetivo de determinar el punto de corte que permite obtener mayor sensibilidad y especificidad, se consideraron como criterio las combinaciones de los componentes con mayor porcentaje de reconocimiento, análisis que determina que para la

muestra empleada se obtienen porcentajes mayores de sensibilidad y especificidad con la presencia conjunta de los componentes de 27 y 32 kDa (Tabla 7).

Discusión

En el análisis proteico en SDS-PAGE (Fig. 2), se observaron 33 bandas proteicas en un rango de 10 a más de 250 kDa, destacando las de 38, 48, 50, 89 y 96 kDa, aunque también se observaron bandas de bajo PM. Este patrón concuerda con los observados en trabajos previos^{6,10,11}.

Al evaluar mediante inmunoblot la reactividad del panel de sueros positivos a *T. cruzi* se encontró reactividad con 37 componentes, de los cuales 12 presentaron una frecuencia de reconocimiento superior al 50%. En este análisis resalta la presencia de tres componentes con un reconocimiento del 100% y uno con el 97%, con pesos de 27, 32, 34 y 38 kDa, respectivamente. Algunos de los componentes encontrados coinciden con proteínas inmunogénicas referidas en la literatura, como los antígenos de 25, 27, 34, 38, 40, 68, 75 y 84 kDa^{4,6,10-14}.

Respecto a los estudios previos realizados con *western blot* con fines diagnósticos, se ha observado que sólo se presentan algunos componentes en común en los diferentes trabajos; estas diferencias en los perfiles antigénicos probablemente se deban, no sólo al aislado de *T. cruzi* utilizado, sino también a otros factores relacionados con las metodologías de extracción y de estandarización de los procedimientos y técnicas utilizados².

Con el aislado de *T. cruzi* y la metodología empleada en el presente trabajo se obtuvo una gran cantidad de componentes inmunodominantes, de los cuales 12 fueron reconocidos por más del 50% de los sueros positivos, a diferencia de otros trabajos en que sólo se reconocieron 5-8 bandas inmunodominantes^{2,4,10}.

Tabla 3. Componentes que mostraron un reconocimiento superior al 50%

Componente (kDa)	% de sueros que reconocen el componente (n = 35)
> 250	82.4*
250	71.4*
166	2.9
140	65.7*
128	34.3
100	2.9
95	5.7
90	2.9
75	80*
68	28.6
65	2.9
64	74.3*
56	2.9
52	11.4
50	5.7
46	5.7
42	22.9
38	94.3*
34	94.3*
32	97.1*
30	5.7
29	11.4
28	45.7
27	100*
23	8.6
22	62.9*
21	74.3*
20	11.43
19	48.6
18	51.4*
17	8.6
16	40
15	2.9
14	37.1
13.5	20
13	17.1
12	22.9

*Componentes con reconocimiento > 50%.

Tabla 4. Estadísticos básicos

	Sueros positivos (n = 35)	Sueros negativos (n = 30)
Media	13.7 ± 4.7	4.5 ± 2.1
Moda	13	3

Para determinar el criterio de positividad, se realizó el análisis estadístico de resultados mediante tres criterios: presencia de componentes, presencia de un componente inmunogénico específico y presencia de una combinación de componentes específicos.

Con el primer criterio, se obtuvo una especificidad del 100% con la presencia de 10 o más componentes; sin embargo, la sensibilidad fue disminuyendo conforme aumentaba la cantidad de componentes, como se puede observar en la curva ROC (Fig. 4). Previamente se ha reportado la cantidad de componentes como un criterio de positividad, incluso considerando como reactivo la presencia de un solo componente⁵; en este estudio, se estableció que el número de componentes en este caso no podía ser un criterio suficiente para determinar seropositividad, debido a que la sensibilidad era muy baja.

En cuanto al criterio de la presencia de un componente específico, se observó que el análisis de los componentes de 32 y 38 kDa, aun cuando mostraron parámetros de sensibilidad y especificidad de entre el 93 y el 97%, de forma independiente, tampoco podía ser útil para determinar seropositividad.

El último criterio analizado fue la existencia de combinaciones de componentes con una sensibilidad y una especificidad superiores al 90% y que, al combinarse, presentaron una sensibilidad y especificidad del 100%; en este trabajo los polipéptidos de 27 y 32 kDa cumplieron con este criterio. Existen estudios que plantean como criterios de positividad la presencia de un componente dentro de un grupo de 12 específicos (25, 28, 30, 32, 40, 42, 65, 70, 83, 90, 100 y > 100 kDa)⁴, tres bandas de un grupo de siete específicas (14, 19, 27, 30, 34, 37 y 75 kDa)⁹ o de al menos cinco de un grupo de 10 (25, 30, 33, 37, 39, 45, 52, 70, 75 y 92 kDa)².

Con base en el análisis de los resultados de este trabajo, se propone establecer como criterio de positividad altamente específico para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* el mostrar reactividad ante los componentes de 27 y 32 kDa. Por otro lado, el inmunoblot, cuando ha sido estandarizado para su empleo con sueros humanos, es una herramienta útil para la confirmación diagnóstica. Sin embargo, es bien sabido

Tabla 5. Sensibilidad y especificidad basadas en el número de componentes reactivos

Número de componentes	VP	FN	FP	VN	Sensibilidad	Especificidad
1	35	0	30	0	100	0
2	35	0	28	2	100	6.7
3	35	0	26	4	100	13.3
4	35	0	18	12	100	40
5	33	2	14	16	94.3	53.3
6	33	2	9	21	94.3	70
7	32	3	5	25	91.4	83.3
8	32	3	3	27	91.4	90
9	31	4	1	29	88.6	96.7
10	31	4	0	30	88.6*	100*
11	27	8	0	30	77.1	100
12	25	10	0	30	71.4	100
13	20	15	0	30	57.1	100
14	15	20	0	30	42.9	100
15	14	21	0	30	40	100
16	11	24	0	35	31.4	100
17	9	26	0	35	25.7	100
18	8	27	0	35	22.9	100
19	6	29	0	35	17.1	100
20	6	29	0	35	17.1	100
21	3	32	0	35	8.6	100
22	2	33	0	35	5.7	100
23	1	34	0	35	2.9	100

VP: verdadero positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadero negativo.

*Valores máximos.

Tabla 6. Sensibilidad y especificidad basadas en la reactividad a un componente específico

Componente (kDa)	VP	FN	FP	VN	Sensibilidad	Especificidad
> 250	29	6	2	28	82.9	93.3
250	25	10	5	25	71.4	83.3
140	23	12	3	27	65.7	90
75	28	7	9	21	80	70
64	26	9	2	28	74.3	93.3
38	33	2	2	28	94.3	93.3
34	33	2	8	22	94.3	73.3
32	34	1	2	28	97.1*	93.3*
27	35	0	6	24	100	80
22	22	13	6	24	62.9	80
21	26	9	1	29	74.3	96.7
18	18	17	1	29	51.4	96.7

VP: verdadero positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadero negativo.

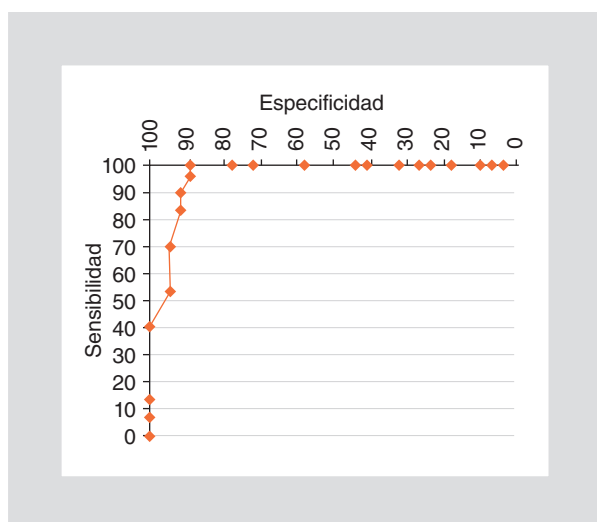
*Valores máximos.

Tabla 7. Sensibilidad y especificidad basadas en la reactividad de componentes específicos combinados

Componentes (kDa)	VP	FN	FP	VN	Sensibilidad	Especificidad
27 y 32	35	0	0	30	100*	100*
27 y 34	33	2	2	28	94.3	93.3
27 y 38	33	2	1	29	94.3	96.7
32 y 34	33	2	0	30	94.3	100
32 y 38	33	2	0	30	94.3	100
34 y 38	31	4	1	29	88.6	96.7
27, 32, 34	33	2	0	30	94.3*	100*
27, 32, 38	33	2	0	30	94.3*	100*
32, 34, 38	31	4	0	30	88.6	100
27, 32, 34, 38	31	4	0	30	88.6	100

VP: verdadero positivo; FN: falso negativo; FP: falso positivo; VN: verdadero negativo.

*Valores máximos.

Figura 4. Características de la curva ROC con sueros reactivos y NR a *T. cruzi* a diferente número de componentes.

que estos procedimientos tienen un alto costo, además de ser muy laboriosos y requerir personal y equipos especializados, lo cual dificulta su empleo con fines masivos. Por esta razón, estos antígenos se proponen como candidatos para ser utilizados en otros sistemas diagnósticos del tipo Dot-ELISA o inmunocromatográficos para tiras de diagnóstico rápido.

Agradecimientos

A Guadalupe Silvia García de la Torre, por el análisis estadístico. A Mariana Citlali de Alba Alvarado, por la confirmación serológica de los paneles usados en el estudio.

Con financiamiento de: DGAPA-PAPIIT: IN 204710 e IT 200913 de la UNAM.

Bibliografía

1. UNAM, Facultad de Medicina, OPS. Manual para el Diagnóstico de la Infección por *Trypanosoma cruzi*. México: OPS/OMS; 2006.
2. Reiche EM, Cavazzana M, Okamura H, Tagata EC, Jankevicius SI, Jankevicius JV. Evaluation of the western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(5):750-6.
3. World Health Organization. Reporte sobre la Enfermedad de Chagas. Argentina; 2007. [Internet] Disponible en: http://http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf.
4. Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, Espinoza B. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. *Arch Med Res*. 2001;32(5):382-8.
5. Rangel-Flores H, Sánchez B, Mendoza-Duarte J, et al. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(6):887-95.
6. Bucio MI, Cabrera M, Segura EL, Zenteno E, Salazar-Schettino PM. Identification of immunodominant antigens in Mexican strains of *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Invest*. 1999;28(4):257-68.
7. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
8. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76(9):4350-4.
9. Teixeira MG, Borges-Pereira J, Netizert E, Souza ML, Peralta JM. Development and evaluation of an enzyme linked immunotransfer blot technique for serodiagnosis of Chagas' disease. *Trop Med Parasitol*. 1994;45(4):308-12.
10. O'Daly JA, Carrasco H, Fernandez V, Rodríguez MB. Comparison of chagasic and non-chagasic myocardiopathies by ELISA and immunoblotting with antigens of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Acta Tropica*. 1994;56(4):265-87.
11. De Lima Rivero AR, Fariás Tamoy MN, Tortolero Leal E, Navarro Aguilera MC, Contreras Alvarez VT. Partial purification and use of *Trypanosoma cruzi* glycosidic fractions for Chagas disease diagnosis. *Acta Cient Venez*. 2001;52(4):235-47.
12. Nogueira N, Chaplan S, Tydings JD, Unkeless J, Cohn Z. *Trypanosoma cruzi*. Surface antigens of blood and culture forms. *J Exp Med*. 1981 Mar 1;153(3):629-39.
13. Scharfstein J, Rodrigues M, Alves C, de Souza W, Previato J. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J Immunol*. 1983;131(2):972-6.
14. Silber AM, Mancipar IS, Roodvelt C, Cabeza Meckert P, Laguens R, Mancipar AJ. *Trypanosoma cruzi*: identification of a galactose-binding protein that binds to cell surface of human erythrocytes and is involved in cell invasion by the parasite. *Exp Parasitol*. 2002;100(4):217-25.