

## EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS Y COMPLEJOS INMUNES CIRCULANTES DE *Trypanosoma cruzi* A TRAVÉS DE UN ESTUDIO DE CAMPO EN UNA ZONA ENDÉMICA DE ARGENTINA.

Patricia PETRAY (1), Nelsa BONARDELLO (2), Roberto CLARK (3), Mercedes AGRANATTI (1), Ricardo CORRAL (1) & Saúl GRINSTEIN (1).

### RESUMEN

En una zona endémica de la República Argentina se llevó a cabo un ensayo de campo de la prueba inmunoenzimática ELISA para la detección de antígenos (cAg) y complejos inmunes circulantes (CIC) en sueros de pacientes chagásicos crónicos.

Del total de 215 muestras de sangre analizadas, 51 fueron positivas para ELISA-CIC y 45 lo fueron para ELISA-cAg. De los 74 (34,32% de la población) sujetos considerados infectados con dos reacciones serológicas positivas, 49 (66,21%) presentaron CIC en suero, en tanto que en 43 (58,11%) de ellos se encontró cAg por ELISA. Solo en 2 casos serológicamente no reactivos, se detectaron inespecíficamente CIC y cAg.

Dentro del grupo considerado no infectado, se observó reactividad inespecífica de bajo título por una de las pruebas serológicas en 16 (11,35%) de 141 individuos. Estos sueros arrojaron resultados consistentemente negativos por ELISA-CIC y cAg demostrando la utilidad de estos métodos de diagnóstico antigénico en casos de serología conflictiva.

La determinación de fracciones antigénicas circulantes por ELISA en individuos chagásicos crónicos permite evidenciar la infección por *T. cruzi* de manera más directa que midiendo la respuesta inmune humoral en el huésped, presentando además mayor sensibilidad que el diagnóstico parasitológico clásico.

**UNITERMOS:** *Trypanosoma cruzi*; Antígenos circulantes; Inmunocomplejos; ELISA.

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* constituye uno de los problemas sanitarios más importantes de América Latina<sup>5</sup>. En la República Argentina esta infección endémica afecta aproximadamente a tres millones de personas<sup>9</sup>. La enfermedad presenta un estadio inicial agudo que evoluciona hacia una etapa crónica en la cual puede verificarse sintomatología o desarrollarse en la mayoría de los casos como una fase asintomática.

Durante la etapa aguda es posible certificar la presencia del parásito en el huésped infectado, ya

que los elevados niveles de parasitemia característicos de este estadio, permiten visualizar al *T. cruzi* en sangre, de manera relativamente sencilla.

En cambio, en la etapa crónica el número de parásitos circulantes disminuye marcadamente, y aún los métodos directos de alta sensibilidad como el xenodiagnóstico resultan poco eficaces para la demostración del *T. cruzi*<sup>19</sup>.

Frente a la dificultad para evidenciar la presencia del agente etiológico entero en pacientes chagásicos crónicos, la detección de fracciones

(1) Laboratorio de Virología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.

(2) Laboratorio de Salud Pública, San Luis, Argentina.

(3) Hospital Nogolí, Nogolí, San Luis, Argentina.

Dirección: Laboratório de Virología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Gallo 1330. (1425) Buenos Aires. Argentina.

antigénicas del parásito en fluidos biológicos, ya sea en forma libre (cAg) o unidas a anticuerpos específicos formando complejos inmunes circulantes (CIC), surge como una alternativa valiosa para el diagnóstico directo de esta parasitosis.

La existencia de cAg y CIC en suero ha sido demostrada en la infección humana y experimental por *T. cruzi*<sup>3,11,14</sup>.

Utilizando una técnica inmunoenzimática (ELISA), hemos encontrado estos marcadores antigénicos de infección en sueros de pacientes de diferentes edades con enfermedad de Chagas aguda y crónica<sup>14,10</sup>.

Los objetivos del presente trabajo son confirmar la validez de estos métodos de diagnóstico antigénico a través de un estudio de campo en una zona de nuestro país con alta endemicidad para la enfermedad de Chagas, y conocer la presencia de marcadores antigénicos de la infección chagásica en habitantes de zona endémica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características de la zona estudiada:

El estudio fue realizado sobre dos localidades, Nogolí y La Quebrada, ubicadas en la provincia de San Luis, Argentina, a 800 Km de la ciudad de Buenos Aires. (figura 1).

Ambas están situadas en la región centro-occidental del país, próximas a la precordillera andina, en una zona endémica conocida. Están caracterizadas por el tipo de vivienda precaria ("rancho"), construido con piedra, adobe y techo de paja; el cual constituye un habitat adecuado para el *Triatoma infestans* (vinchuca), vector natural de la

enfermedad de Chagas. Asimismo, es de destacar la convivencia del hombre con animales, que pueden constituir reservorios naturales del agente infeccioso<sup>23</sup> (figura 2).

### Población incluida en el ensayo:

La población estudiada comprendió 215 individuos seleccionados voluntariamente de un área de 2.500 habitantes (figura 1) cuya condición sanitaria y nutricional era buena, tanto en adultos como en niños.

El grupo incluyó: a) miembros de 32 familias, b) empleados públicos y c) alumnos de dos escue-

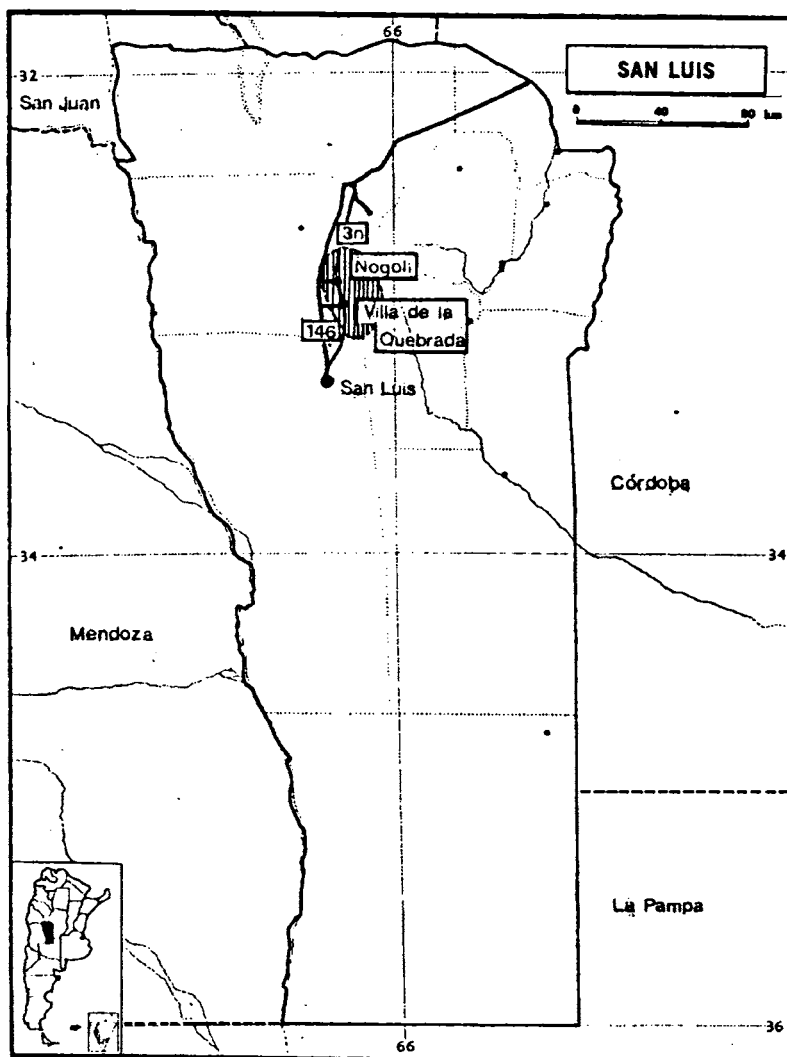


Figura 1 - Mapa de la Provincia de San Luis, Argentina, que muestra la región de donde provenía la población estudiada. Abajo, izq.: ubicación de la Provincia de San Luis en el mapa de la República Argentina.

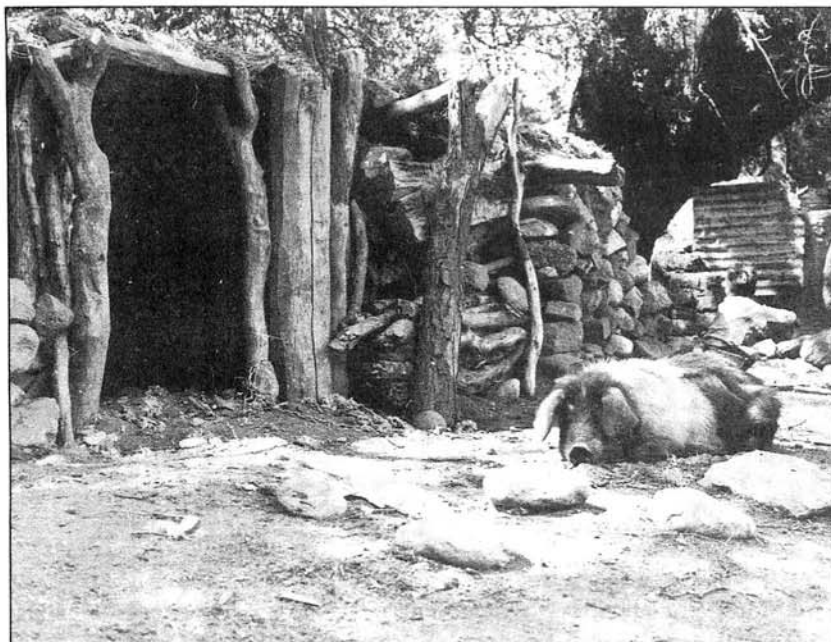


Figura 2: Vivienda precaria ("rancho"), hábitat del insecto vector de la enfermedad de Chagas, y sitio de convivencia permanente del hombre y sus animales, reservorios de *T. cruzi*. Nogolí, Provincia de San Luis.

las locales. La relación de hombres-mujeres fue 114/101, mientras que la distribución de edades osciló entre los 8 meses y los 84 años.

Se obtuvo una muestra de sangre de cada individuo. Los sueros fueron separados del paquete globular y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su examen. Además se recolectaron datos de todos los individuos analizados sobre vivienda, ocupación y antecedentes clínicos relacionados con la infección chagásica. El proceso de obtención y procesamiento de muestras se llevó a cabo durante 10 días corridos.

#### Técnicas serológicas:

En cada muestra de suero se practicaron las técnicas de aglutinación directa (AD)<sup>22</sup>, hemoaglutinación indirecta (HAI)<sup>8</sup> e inmunofluorescencia indirecta (IFI)<sup>6</sup> para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi*. Se consideró como infectada a aquella persona que presentara reactividad serológica (títulos  $\geq 1:16$ ) por al menos dos de las técnicas mencionadas.

#### Técnicas inmunoenzimáticas:

En todas las muestras de suero se utilizó la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA), para la detección de antígenos circulantes (cAg) y complejos inmunes circulantes (CIC).

ELISA-cAg: se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Immulon 2, Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, Va) con  $100\ \mu\text{l}$  por pocillo de inmunoglobulinas de conejo anti-*T. cruzi*, previamente purificadas por cromatografía de afinidad<sup>13</sup>. Se incubó toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavó 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH: 7,2; conteniendo 0,05% de Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Se bloquearon los sitios en la placa, incubando con PBS-Tween 20 0,05%-seroalbúmina bovina 1%, durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego de lavar 3 veces con PBS-Tween 20, se incubaron los sueros diluidos 1:50 en PBS-Tween 20 ( $100\ \mu\text{l}$ ) durante una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se lavó nuevamente y se agregaron  $100\ \mu\text{l}$  de inmunoglobulinas humanas anti-*T. cruzi*, también purificadas por cromatografía de afinidad. Después de la incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora y posterior lavado, se adicionaron  $100\ \mu\text{l}$  de inmunoglobulinas de conejo anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind.) diluidas 1:1000 en PBS-Tween 20. Luego de una hora de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , se lavó nuevamente y se agregaron  $100\ \mu\text{l}$  de sustrato (0,1% p-nitro-fenil fosfato, Sigma; en buffer dietanolamina con 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ). Se detuvo la reacción con  $50\ \mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$  3 N al cabo de 10 min y se midió la absorbancia a 410 nm en un aparato lector de microELISA (Dynatech Lab., modelo MR-590). Los valores positivos y negati-

Tabla 1

Distribución etaria de los 74 individuos infectados por *T. cruzi* y su correlación con la detección de CIC y cAg en suero.

Grupos de edad (en años)	Serología	ELISA	
	Nº de indiv. positivos/ Nº de indiv. estudiados.	CIC posit.	cAg posit.
0-10	9/72 (12,5%)	7/9 (77,78%)	6/9 (66,66%)
11-20	14/32 (43,75%)	9/14 (64,28%)	8/14 (57,14%)
21-30	4/25 (16%)	3/4 (64,28%)	0/4 (0%)
31-40	18/42 (42,86%)	10/18 (55,55%)	10/18 (55,55%)
41-50	13/19 (68,42%)	8/13 (61,54%)	8/13 (61,54%)
51-60	7/12 (58,33%)	5/7 (71,43%)	5/7 (71,43%)
61-70	7/10 (70%)	5/7 (71,43%)	4/7 (57,14%)
71-80	2/2 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)
81-90	0/1 (0%)	0/0 (0%)	0/0 (0%)
Total	74	49/74 (66,22%)	43/74 (58,11%)

Tabla 2

Determinación de CIC y cAg por ELISA en individuos de la Provincia de San Luis, Argentina, con y sin infección crónica por *T. cruzi*.

	CIC positivos	CIC negativos
	infectados n = 74	49 (66,21%)
no infectados n = 141	2 (1,42%)	139 (98,58%)
	cAg positivos	cAg negativos
	infectados n = 74	43 (58,11%)
no infectados n = 141	2 (1,42%)	139 (98,58%)

vos fueron asignados sumando dos desviaciones estándar al valor medio de absorbancia de los controles negativos (suero de individuos no infectados). Todas las lecturas se realizaron contra un blanco constituido por una serie de pocillos en los cuales se colocaban todos los reactivos de acuerdo a lo descrito anteriormente, excepto que las muestras de suero fueron reemplazadas por PBS-Tween 20. Los controles positivos estaban constituidos por antígenos solubles de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) y por complejos inmunes preparados artificialmente con dichos antígenos e IgG anti-*T. cruzi* diluidos en suero humano normal<sup>10</sup>.

ELISA-CIC: el procedimiento realizado fue el mismo que para ELISA-cAg, pero con la diferencia de que para la demostración de CIC no resulta necesaria la utilización de las inmunoglobulinas humanas anti-*T. cruzi*, siendo este paso suprimido en el ensayo.

## RESULTADOS

La tasa de infección por *T. cruzi* en la población analizada, determinada por técnicas serológicas fue de 34,42%, demostrando el elevado grado de endemidad en la zona estudiada.

El porcentaje de individuos infectados en cada grupo etario se detalla en la tabla 1, siendo variable el porcentaje de sujetos infectados dentro de cada familia.

Sobre un total de 215 muestras de sangre examinadas, 51 fueron positivas para ELISA-CIC, en tanto que 45 lo fueron para ELISA-cAg. Considerando como sujetos infectados por *T. cruzi* a 74 individuos que se ajustaban al criterio serológico pre-establecido, 49 (66,21%) presentaron CIC en suero, mientras que en 43 (58,11%) se halló cAg por ensayos inmunoenzimáticos (tabla 2).

El análisis estadístico de estos datos utilizando el test de G<sup>21</sup> no evidenció una relación entre las edades de los pacientes y la detección de CIC y cAg en los sueros (p < 0,01).

No se detectaron CIC y cAg en la mayoría de los individuos no infectados, excepto en dos casos serológicamente no reactivos que arrojaron resultados positivos para ELISA-CIC y cAg. En el grupo considerado como no infectado por *T. cruzi*, se observó reactividad inespecífica de bajo título por una de las técnicas serológicas en 16 (11,35%) de 141 sujetos.

## DISCUSIÓN

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede alcanzarse a través de métodos parasitológicos y serológicos tradicionales. La serología constituye un aporte valioso al diagnóstico mediante técnicas simples y relativamente sensibles, aunque presenta problemas de reactividad cruzada e inespecífica<sup>7</sup>. Los métodos parasitológicos directos resultan particularmente útiles en infecciones recientes y en pacientes inmunocomprometidos. Sin embargo, técnicas tales como el xenodiagnóstico y el hemocultivo son mucho menos eficaces durante la fase crónica de la infección por *T. cruzi*, cuando la detección de tripomastigotes se logra en un 20%-50% de los casos<sup>12</sup>. Si bien esta positividad puede mejorarse por repetición de las pruebas o aumentando el número de insectos o cultivos utilizados, esto requiere una infraestructura especial y también presenta el inconveniente de la demora en la obtención de los resultados.

El desarrollo de técnicas sensibles, específicas y reproducibles para demostrar la presencia de antígenos libres e inmunocomplejos en la tripanosomiasis americana, representa un avance diagnóstico y un medio de comprensión de la historia natural de esta enfermedad.

Mientras la determinación de anticuerpos proporciona una prueba indirecta de la infección, la detección de fracciones antigénicas del parásito en el huésped, puede considerarse equivalente como método de diagnóstico, al hallazgo del parásito entero. Además, la identificación de antígenos e inmunocomplejos circulantes posibilita un diagnóstico precoz en una etapa temprana de la infección, previamente a la producción de anticuerpos específicos en niveles detectables<sup>10</sup>.

La existencia de antígenos circulantes de *T. cruzi*, libres o unidos a anticuerpos específicos, ha sido confirmada por diversos investigadores utilizando procedimientos tales como difusión doble<sup>11</sup>, contrainmunolectroforesis<sup>18</sup>, ensayo de unión a Clq<sup>17</sup> y enzimoimmunoanálisis<sup>3</sup>. En pacientes con infección crónica la antigenemia varió entre un 28% y un 55,6% de los individuos estudiados según los diferentes autores<sup>4,1</sup>, mientras que el hallazgo de inmunocomplejos circulantes osciló entre un 40% y un 82,6%<sup>17,16</sup>. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método de ELISA en doble sandwich para determinar cAg y CIC, encontrando una

positividad de 100% en casos de infección aguda, que descendía hasta 65% para CIC y 55% para cAg utilizando sueros de chagásicos crónicos que concurren habitualmente a nuestro servicio<sup>14,10</sup>.

El presente estudio constituye la primera evaluación de marcadores antigénicos en la infección por *T. cruzi* para determinar su validez como metodología de diagnóstico y screening a través de un ensayo de campo en un área endémica de nuestro país.

Es importante señalar que los datos que aquí se presentan son válidos para el grupo estudiado pero no corresponde hacer inferencia alguna al total de la población.

El porcentaje de individuos infectados por *T. cruzi* (34,42%) en la población estudiada, determinado por pruebas serológicas, es representativo de la importancia que alcanza la enfermedad de Chagas en el área elegida. Los porcentajes de sueros positivos para ELISA-cAg (58,11%) y ELISA-CIC (66,22%) coinciden con nuestros datos previos en pacientes con infección crónica por *T. cruzi*. Si bien no se efectuó una búsqueda del parásito en la población estudiada, la detección antigénica en individuos chagásicos crónicos muestra una mayor sensibilidad que la normalmente reconocida para el diagnóstico parasitológico por métodos tradicionales. ARAUJO<sup>2</sup> demostró que 15 pacientes crónicos de un total de 30 estudiados, presentaron antigenemia determinada por ELISA. En solo 9 de estos individuos ELISA-cAg positivos fue evidenciada la presencia del parásito por hemocultivo.

Con respecto a la especificidad, se observó reactividad por ELISA-cAg y CIC en 2 individuos con serología negativa para Chagas. Estos datos sugieren la posibilidad de un hecho biológico imprevisto como la ocurrencia de infección sin respuesta inmune humoral en el huésped<sup>15</sup>, o también que la técnica evidencia ciertas reacciones inespecíficas que no se habían observado cuando se analizaron sueros de individuos chagásicos no residentes en zona endémica desde hace largo tiempo. Cabe destacar que 16 sujetos (11,35%) del grupo considerado como no infectado, presentaron una prueba serológica positiva a título bajo, pero la inexistencia de infección fue confirmada mediante las restantes técnicas serológicas y las pruebas antigénicas que arrojaron resultados consistentemente negativos. Esto ejemplifica la

utilidad del ELISA-cAg y CIC en casos de datos serológicos conflictivos. Confirmando nuestros datos previos<sup>14</sup>, no se observó correlación entre los títulos de anticuerpos séricos y la presencia de cAg y CIC en los individuos infectados.

A partir de la verificación de antigenemia o inmunocomplejos circulantes en un porcentaje relevante de los individuos con infección chagásica, surge el interrogante acerca del significado biológico de este hallazgo. Una posible relación de estos marcadores antigenicos de infección con el desarrollo de patología característica de la enfermedad de Chagas<sup>20</sup>, constituye una hipótesis interesante para evaluar mediante seguimiento longitudinal de estos pacientes.

Otro aspecto a considerar en futuras investigaciones, es la optimización de la metodología de detección antigénica. Si fuera posible purificar cAgs de *T. cruzi* y obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra los mismos, se podría desarrollar una técnica de gran simpleza y sensibilidad, como una aglutinación de partículas de látex recubiertas por dichos anticuerpos o un ensayo de dot-immunoblotting, que permita mejorar la determinación de antígenos en materiales biológicos y ampliar así las posibilidades de diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

### SUMMARY

#### ELISA technique for detection of *Trypanosoma cruzi* circulating antigens and immune complexes in San Luis, Argentina.

The ELISA technique for detection of *T. cruzi* circulating antigens (cAg) and immune complexes (CIC) in the sera of chronic chagasic patients was field-tested in a well-known endemic area of Argentina (San Luis province). Of 215 individuals screened, 51 were positive for ELISA-CIC and 45 for ELISA-cAg. Seventy four subjects were considered por *T. cruzi*-infected, as they showed serologic reactivity at least by two different techniques. In this group, 49 (66.21%) were ELISA-CIC positive, whereas in 43 (58.11%) of them cAg was found by ELISA. Unspecific reactions were observed in only 2 cases with reactive serology for Chagas disease. Within the group considered as noninfected, a false-positive outcome was obtained at low dilution by one of the serologic tests in 16 (11.35%) of 141 individuals. These sera yielded consistently negative results by ELISA-CIC and

cAg, showing the utility of antigen detection in situations of conflictive serology.

While antibody determination merely provides an indirect proof of infection, our ELISA tests for demonstration of *T. cruzi*-specific antigenic fractions in the host's circulation allow a parasitologic diagnosis in chronic patients, with higher sensitivity than that exhibited by traditional methods for detection of the whole parasite.

### AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado a través del subsidio N° 3-P-84-0267 de International Development Research Centre, Ottawa, Canadá. Los autores desean agradecer especialmente al Sr. Juan Carlos Ostanelli, Ministro de Salud Pública de la Provincia de San Luis, Argentina, y al Sr. José Luis Amieba, Intendente de Nogolí, Provincia de San Luis, sin cuyo apoyo y colaboración hubiera resultado imposible de concretar el presente trabajo.

Ricardo Corral es becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALONSO, J.M.; PIVIDORI, S. & GUILLERÓN, C. - Antígenos circulantes de *Trypanosoma cruzi* en chagásicos de área endémica. *Medicina (B. Aires)*, 46:69-72, 1986.
2. ARAUJO, F.G.; CHIARI, E. & DIAS, J.C.P. - Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. *Lancet*, 31:246-249, 1981.
3. ARAUJO, F.G. - Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 76:25-36, 1982.
4. BONGERTZ, V.; HUNGERER, K.D. & GALVÃO-CASTRO, B. - *Trypanosoma cruzi*, circulating antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 76:71-82, 1981.
5. BRENER, Z. - Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Advanc. Parasit.*, 18:247-292, 1980.
6. CAMARGO, M.E. - Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8:227-234, 1966.
7. CAMARGO, M.E. & HOSHINO-SHIMIZU, S. - Metodologia sorológica na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. goiana Med.*, 20:47-65, 1974.

8. CERISOLA, J.; FATALA CHABEN, M. & LAZZARI, J. - Test de hemoaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Pren. méd. argent.*, 49:1751-1765, 1967.
9. CERISOLA, J.A.; RABINOVICH, A.; ÁLVAREZ, M.; CORLETO, C.A. & PRUMEDA, J. - Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 73:203-221, 1972.
10. CORRAL, R.; FREILIJ, H. & GRINSTEIN, S. - Specific circulating immune complexes in acute Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 29:26-32, 1987.
11. CHAVES, J.; FERRI, R.G.; KLIEMANN, T.A.; IRULEGUI, I. & SOUZA, H.B.W.T. - Complexos inmunes circulantes na doença de Chagas experimental. Identificação de antígenos parasitários nos complexos. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 21:77-81, 1979.
12. CHIARI, E.; DIAS, J.C.P.; LANA, M. & CHIARI, C.A. - Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DOENÇA DE CHAGAS, Rio de Janeiro, 1979. *Anais*. p. N1-N5.
13. GONYEA, L.M. - Purification and iodination of antibody for use in an immunoradiometric assay for serum ferritin. *Clin. Chem.*, 23: 234-236, 1977.
14. KAHN, T.; CORRAL, R.; FREILIJ, H. & GRINSTEIN, S. - Detection of circulating immune complexes, antigens and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in human *T. cruzi* infection. *IRCS Med. Sci.*, 12:949-950, 1984.
15. LUQUETTI, O.A.; REZENDE, J.M. de; STEFANI, M.M.A. & POTENSANO, O. - Electrophoresis of sera from patients with megaesophagus and negative serology for American trypanosomiasis, preliminary results. In: ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS'DISEASE, 12<sup>o</sup>, Caxambu, Brasil, 1986. *Proceedings*. p. IM-44
16. MARCIPAR, A.; BARNES, S.; LENTWOJT, E. & BROUN, G. - Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Appl. Biochem. Biotech.*, 7:459-462, 1982.
17. MARTIN, V.O.; AFCHAIN, D.; DE MARTELEUR, A.; LEDESMA, O. & CAPRON, A. - Complejos inmunes circulantes en los distintos estados evolutivos de la enfermedad de Chagas. *Medicina (B. Aires)*, 47:159-162, 1987.
18. MORETTI, E.R.A.; BASSO, B. & VOTTERO-CIMA, E. - Exoantigens of *Trypanosoma cruzi*. I. Conditions for their detection and immunogenic properties in experimental infections. *J. Protozool.*, 32:150-153, 1985.
19. SCHENONE, H.; ALFARO, E. & ROJAS, A. - Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. *Bol. chil. Parasit.*, 29:24-26, 1974.
20. SILVA, J.C.; PIRMEZ, C.; MORGADO, M.G. & GALVÃO-CASTRO, B. - Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infection. *Paras. Immunol.*, 7:457-466, 1985.
21. SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. - *Biometry*. San Francisco, W. H. Freeman & Co., 1969. p. 776.
22. VATTUONE, N.H. & YANOVSKY, J.F. - *Trypanosoma cruzi*: Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. *Exp. Parasit.*, 30:359-363, 1971.
23. WISNIVESKY-COLLI, C.; GURTLER, R.E.; SOLARZ, N.; SALOMÓN, D. & RUIZ, A. - Feeding patterns of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in relation to transmission of American trypanosomiasis in Argentina. *J. med. Entomol.*, 19: 645-654, 1982.

Recebido para publicação em 21/1/1991  
Aceito para publicação em 4/2/1992