

## SD BIOLINE Chagas Ab Rapid 키트의 평가

지미정<sup>1,2</sup> · 노재상<sup>2</sup> · 조병기<sup>2</sup> · 조영식<sup>2</sup> · 김선주<sup>3</sup> · 윤병수<sup>1</sup>

경기대학교 자연과학대학 생명과학과, 에스디 바이오텍 연구소<sup>2</sup>, 경상대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>3</sup>

### Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab Rapid Kit

Mi Jung Ji<sup>1,2</sup>, Jae Sang Noh<sup>2</sup>, Byung Ki Cho, Ph.D.<sup>2</sup>, Young Shik Cho, Ph.D.<sup>2</sup>, Sun Joo Kim, M.D.<sup>3</sup>, and Byoung Su Yoon, Ph.D.<sup>1</sup>

Department of Life Science<sup>1</sup>, College of Natural Science, Kyonggi University, Suwon; Biotech Laboratory<sup>2</sup>, Standard Diagnostics Inc., Yongin; Department of Laboratory Medicine<sup>3</sup>, Gyeongsang National University, School of Medicine, Jinju, Korea

**Background :** Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite, which is transmitted by blood-sucking bugs or through blood transfusion or organ transplantation. It is endemic in Central and South America. The objective of this study was to compare the performance of immunochromatographic SD Bioline Chagas Ab Rapid (Standard Diagnostics, Korea) with three immunochromatographic kits for the detection of antibodies to *T. cruzi*.

**Methods :** A total of 320 serum specimens (140 positive and 180 negative) from National Reference Laboratory for Chagas and Leishmaniasis (NRLCL, Honduras) were used for the evaluation of four different test kits: SD Bioline Chagas Ab Rapid, Chagas Stat-Pak Assay (Chembio Diagnostic Systems, USA), OnSite Chagas Ab Rapid test-Cassette (CTK Biotech, USA), and Trypanosoma Detect Rapid Test (InBios International, USA). The results of four kits were compared with those of NRLCL. Cross-reactivity with other parasites was also evaluated.

**Results :** Compared with the results of NRLCL, sensitivity and specificity were 99.3% and 100% for both of SD and Chembio kits, 97.2% and 100% for InBios kit, and 97.9% and 98.8% for CTK kit. None of other parasites showed cross-reactivity.

**Conclusions :** SD Bioline Chagas Ab Rapid kit showed test results highly correlating with those of National Reference Laboratory for Chagas and Leishmaniasis. It can be used for a rapid detection of Chagas' disease in endemic region and monitoring the disease among overseas travelers in Korea. (*Korean J Lab Med* 2009;29:48-52)

**Key Words :** Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, Immunochromatography

## 서 론

샤가스병은 아메리칸 트리파노소마증이라고도 하는데 병원체

는 크루스 파동편모충(*Trypanosoma cruzi*)으로[1-3], 주로 야생 동물과 빈대 사이에서 생활사를 이어가며[4], 빈대 같은 절지동물에 물림으로써 감염된다[5]. 감염 증세는 급성형과 만성형이 있으며, 급성형은 크루스 파동편모충 감염 후 2-3주안에 나타나고 심장을 침범하여 심근염, 심부전을 일으키거나 충추신경계를 침범하여 뇌수막염을 일으켜 사망할 수도 있다. 만성형은 1-2개월 동안 유지되며 심장과 관련된 증상이 제일 흔하고 심계항진, 어지러움, 실신 등과 같은 증상이 나타난다[6]. 샤가스병은 미국 남부부터 멕시코, 아르헨티나, 칠레에 이르는 중남미 지역에 널리 분포하고[7], 중남미 인구의 25%가 샤가스병의 감염 위

Received : October 27, 2008

Manuscript No : KJLM2185

Revision received : December 8, 2008

Accepted : December 12, 2008

Corresponding author : Byoung Su Yoon, Ph.D.

Department of Life Science, College of Natural Science, Kyonggi University, San 94-6, Yui-dong, Suwon 443-760, Korea  
Tel : +82-31-249-9645, Fax : +82-31-243-1707  
E-mail : bsyoon@kyonggi.ac.kr

\*This study was performed by the research fund from Standard Diagnostic Inc.

험에 노출되어 있어 매년 1,800만 명이 감염되고 그 중 45,000명 이상이 사망한다고 알려져 있다[8]. 국내의 경우 아직까지 샤가스병 환자가 보고된 사례는 없으나 중남미 지역 등의 해외여행자 수가 늘어남에 따라 질병관리본부에서는 2000년 샤가스병을 지정전염병으로 고시하여 관리하고 있다.

샤가스병의 진단에는 현미경 관찰법, 기생충 배양법, Polymerase Chain Reaction (PCR), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), 간접면역형광법 등이 있으며, 이 중 현미경 관찰법과 기생충 배양법은 기생충을 직접 확인할 수 있어 샤가스병의 진단에는 용이할 수 있으나 감염된 기생충의 수가 적을 경우 위음성의 결과를 초래할 수 있다[9]. PCR을 기반으로 하는 진단법은 급성인 경우에 높은 감도를 보이나 만성인 경우에는 위음성의 결과를 보이기도 한다. 또한 급성의 경우 혈중에 기생충 농도가 높아 방금 채혈한 혈액에서는 현미경으로도 관찰이 가능하지만 수혈, 장기 이식, 모자 감염 등으로 인한 만성 감염인 경우에는 원충의 농도가 낮아 현미경으로는 관찰할 수 없어 혈청학적 검사만이 유효하다[1]. 혈청학적인 검사로는 ELISA, 간접면역형광법 등이 사용되고 있다[8, 10-13]. 하지만 현재 사용되고 있는 진단 방법 중에서 한 종류의 항원이나 방법으로만 검사하는 것은 민감도 및 특이도가 떨어지므로, 두 종류 이상의 항원을 이용하여 검사를 하거나 두 종류 이상의 혈청학적 검사를 해야 그 정확도를 높일 수 있다고 알려져 있다[9, 14-16]. 면역크로마토그래피법은 민감도와 특이도 면에서 효소면역법만큼 우수하며 더 짧은 시간 안에 검사할 수 있으며, 기기와 장소가 필요하지 않고 실온에서 검사가 가능한 장점이 있다[11].

따라서 본 연구에서는 샤가스병이 풍토병인 유행지역에서 혈액 은행 또는 응급실에서 수혈에 의한 샤가스병 감염 전파를 막고, 국내의 경우 중남미 해외여행자를 통한 샤가스병 감염을 막고자 면역크로마토그래피법을 이용하여 SD Biotline Chagas Ab Rapid를 개발하게 되었다. 또한 면역크로마토그래피법을 이용한 샤가스병 진단 제품들은 이미 개발되어 기존 검사 방법들과 비교하여 임상적 유용성이 있음이 확인된 바 있다[8, 11]. 본 연구에서는 국내에서 개발된 샤가스 항체 검사용 SD Biotline Chagas Ab Rapid의 평가를 시행하고자 하였고, 기존에 개발된 세 가지 검사 제품과 비교하여 민감도, 특이도, 일치율, 검출 한계, 교차 반응 등의 성능을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

온두라스 국립 샤가스 연구 기관에서 2007년 8월부터 2008년

5월까지 효소면역법(Chagastest ELISA recombinante 3.0, Wiener lab, Rosario, Argentina와 ImmunoComb II Chagas Ab, Origenics, Yavne, Israel), 현미경법과 PCR로 샤가스 양성으로 확인된 검체 140건, 음성으로 확인된 검체 180건을 연구용으로 제공받아 총 320건의 검체를 대상으로 본 연구를 수행하였다. 네 가지 제품의 면역크로마토그래피법으로는 Chagas Stat-Pak Assay (ChemBio Diagnostic Systems, Medford, USA; Stat-Pak), OnSite Chagas Ab Rapid test-Cassette (CTK Biotech, San Diego, USA; OnSite), Trypanosoma Detect Rapid Test (InBios International, Seattle, USA; Detect), 그리고 SD Biotline Chagas Ab Rapid (SD, Yongin, Korea; Biotline)를 사용하였다(Table 1).

### 2. 방법

네 종류의 제품들은 각기 제조사에 의해 제시된 방법에 따라 검사를 시행하였고, 발색 반응 결과는 육안으로 2명이 각기 독립적으로 판정하였다. 발색이 강하거나 약한 경우 양성으로 판단하고, 발색이 없는 경우에는 음성으로 판단하였다. 각 신속 항체 검사의 결과는 온두라스 국립 샤가스 연구원의 결과와 비교 분석하였다.

검출 한계 평가는 양성 검체 140건을 동량으로 혼합한 혈청을 샤가스 항체 음성인 혈청으로 최종 256배까지 희석하여 제조한 후, 각각의 시약으로 측정하였다. 교차 반응 평가에는 기생충 관련 질병인 리슈만편모충증(Leishmaniasis), 필라리아증(Filariasis), 말라리아(Malaria), 톡소플라스마증(Toxoplasmosis), 트리파노소마 랑겔(*Trypanosoma rangeli*)과 주혈흡충증(Schistosomiasis)에 대한 양성 검체 3건을 각각 사용하였다. 이들 검체는 Laboratoire Marcel Merieux (Lyon, France)에서 구입한 것이다.

**Table 1.** Characteristics of the four different test kits for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*

Methods	SD BIOLINE Chagas Ab Rapid	CTK Onsite Chagas Ab Rapid	InBios Trypanosoma Detect Rapid Test	CHEMBIO Chagas Stat-Pak Assay
Type	Device	Device	Strip	Device
Specimen volume	Serum, plasma 5 $\mu$ L Whole Blood 10 $\mu$ L	Serum, plasma 5 $\mu$ L	Serum 10 $\mu$ L Whole Blood 20 $\mu$ L	Serum, plasma 5 $\mu$ L Whole Blood 10 $\mu$ L
Diluent volume	3 drops (90-120 $\mu$ L)	2 drops (70-100 $\mu$ L)	4 drops (150-200 $\mu$ L)	6 drops (-240 $\mu$ L)
Analysis time	15 min	15 min	10 min	15 min

**Table 2.** Performance of four test kits in comparison with the results of National Reference Laboratory for Chagas and Leishmaniasis (Tegucigalpa, Honduras)

Parameter	SD BIOLINE Chagas Ab Rapid	CTK Onsite Cha- gas Ab Rapid	InBios Trypanoso- ma Detect Rapid Test	CHEMBIO Chagas Stat-Pack Assay
Positive (N=140)	139	137	136	139
Negative (N=180)	180	178	180	180
Sensitivity (%)	99.3	97.9	97.2	99.3
Specificity (%)	100	98.8	100	100
Kappa agreement (95% CI)	0.997 (0.981-1)	0.984 (0.941-0.996)	0.988 (0.95-0.999)	0.997 (0.981-1)

Abbreviation: CI, confidence interval.

## 결 과

본 연구에서 네 가지 샤가스 항체 검사 제품 중 Bioline과 Stat-Pak은 민감도 99.3%, 특이도 100%로 민감도, 특이도가 가장 높았고, Detect는 민감도 97.2%, 특이도 100%, OnSite는 민감도 97.9%, 특이도 98.8%이었다. 온두라스 국립 샤가스 연구원의 결과와 비교한 결과, 네 가지 샤가스 항체 검사 제품 중 Bioline와 Stat-Pak의 일치율이 99.7%로 가장 높았으며, Detect는 98.8%, OnSite는 98.4%였다(Table 2).

샤가스병 항체 양성 검체 140건 중 네 가지 면역크로마토그래피법을 이용한 제품 모두에서 동일하게 양성으로 나온 경우는 134건(95.7%)이었으며, Bioline와 Stat-Pak 1건(0.7%), Detect 4건(2.8%), OnSite 3건(2.1%)이 음성이었다(Table 3). 음성 검체 180건 중 모두에서 동일하게 음성으로 나온 경우는 178건(98.8%)으로 Bioline, Stat-Pak와 Detect는 180건 모두에서 음성 결과를 나타내어 100% 일치율을 보였고, OnSite는 2건(1.1%)이 양성이었다. 총 320건의 샤가스 음성, 양성 검체 중 검사 결과가 일치하는 경우가 312건으로 일치율은 97.5%, 카파 일치율은 0.975 (95% 신뢰구간: 0.914-0.984)이었고, 제품간 결과가 일치하지 않는 것은 모두 8건(2.5%)으로 Table 3에 정리하였다. 희미한 발색이 나타난 경우는 Bioline, Stat-Pak, Detect 3건, OnSite 4건으로 모두 약양성으로 간주하였다.

각 제품의 검출 한계 검사 결과 Bioline와 Stat-Pak는 1:128, Detect 1:32, OnSite 1:64까지 검출 가능하였다. 또한 네 가지 제품에 대한 기생충 관련 질병과의 교차 반응 검사 결과 리슈만편모충증, 필라리아증, 말라리아(삼일열 말라리아 2건, 열대열 말라리아 1건, 농도 200 parasite/ $\mu$ L 이상), 톡소플라스마증, 트리파노소마 랑겔과 주혈흡충증 각각의 양성 검체 3건에 대해 모두 음성의 결과를 나타내었다.

**Table 3.** Results of 8 discordant cases of four test kits for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in comparison with the results of NRLCL

Specimen No. (onset day)	Result of NRLCL	SD BIOLINE Chagas Ab Rapid	CTK Onsite Cha- gas Ab Rapid	InBios Trypanoso- ma Detect Rapid Test	CHEMBIO Chagas Stat-Pack Assay
1 (3)	+	-	-	+	+
2 (2)	+	+	-	-	+
3 (6)	+	+	+	-	+
4 (4)	+	+	-	+	+
5 (2)	+	+	+	-	-
6 (5)	+	+	+	-	+
7	-	-	+	-	-
8	-	-	+	-	-

Abbreviation: NRLCL, National Reference Laboratory for Chagas and Leishmaniasis (Tegucigalpa, Honduras).

네 가지 제품의 용법, 용량을 비교해 보면 Bioline, Stat-Pak와 Detect 제품은 혈청, 혈장 및 전혈 사용이 가능하나 OnSite 제품은 혈청, 혈장만 사용 가능하였다. 검사에 소요되는 시간과 검체량은 Bioline, Stat-Pak와 OnSite가 모두 15분, 혈장, 혈청 5  $\mu$ L 또는 전혈 10  $\mu$ L였으며, Detect 제품이 10분으로 가장 짧았으나 사용 검체량은 혈장, 혈청 10  $\mu$ L 또는 전혈 20  $\mu$ L로 가장 많았다.

## 고 찰

본 연구에서 샤가스병을 진단하기 위해 네 가지 면역크로마토그래피법 제품을 온두라스 국립 샤가스 연구원의 결과와 비교해 본 결과 시약에 따라 음성 검체 180건에서 양성으로 나오는 비율이 0-1.1%, 양성 검체 140건에서 음성으로 나오는 비율이 0.7-2.8%, 민감도 97.2-99.3%, 특이도 98.8-100%의 결과를 보였다. 이는 네 가지 다른 방법 즉, 면역크로마토그래피법, 효소면역법, 간접형광항체법 및 간접응집법으로 검사한 결과 면역크로마토그래피법의 민감도와 특이도가 100%와 98.6%로 다른 방법들과 동등하다고 보고한 Luquetti 등[17]의 결과와 비슷하였다. 또한 Ponce 등[11]이 효소면역법과 면역크로마토그래피법의 비교 결과에서 면역크로마토그래피법의 민감도 99.8%, 특이도 100%로 보고한 결과와도 일치하였다.

본 연구에서 네 가지 면역크로마토그래피법 제품의 양성 검체에 대한 검사 결과가 비교적 일치하였고 시약에 따라 다른 결과를 보이는 경우가 모두 6건 있었는데, 양성 검체 중 음성의 결과를 나타낸 검체 번호는 Bioline는 1번, Stat-Pak는 5번, Detect는 2번, 3번, 5번과 6번이었으며, OnSite는 1번, 2번, 4번이었

다. 이들 검체들은 샤가스병 증상이 나타난 후 2일에서 6일 사이의 검체로 제품에 따라 검체의 음성, 양성 결과가 다르게 나타나는 것은 각 제품에 사용되고 있는 항원 및 각 제조사 제품의 특징에 기인한 것으로 판단되었다. Bioline 제품에는 두 가지 항원(H49, 1F8)이 사용되었고, Stat-Pak 제품에는 네 가지 항원(B13, 1F8, H49/JL7)[11]이 사용되고 있으며, Detect 제품에는 일곱 가지 항원(ITC-6, ITC-8.2, peptide 2, TcD, TcF, TcLo, SA-PA)[8]이 사용되고 있다. 샤가스병 진단에 있어서 Umezawa 등[2]의 연구 결과에 의하면 여섯 종류의 유전자 재조합 항원(H49, JL7, A13, B13, JL8, 1F8)이 효소면역법에서 각각의 민감도와 특이도가 H49 97.7%, 100%, JL7 97.4%, 99.5%, A13 87.1%, 100%, B13 93.4%, 99.5%, JL8 93.8%, 95.4%, 1F8 99%, 99.5%로 항원들간에 민감도와 특이도 차이가 있다고 보고하였고, 2004년 연구 결과에 따르면 유전자 재조합 항원을 두 개 이상 혼합하여 사용할 경우 단독 항원을 사용하는 것 보다 반응이 높다고 보고하였다. 또한 Marcipar 등[18]의 연구 결과에 의하면 크루스 파동편모충 감염 후 항체가 반응하는 항원의 수는 7일 1개, 15일 7개, 30일 5개, 60일 21개로 항원에 따라 항체가 반응하는 시기가 다르다고 보고하였다.

Ponce 등[11]은 면역크로마토그래피법이 민감도와 특이도 면에서 효소면역법만큼 우수하며 더 짧은 시간 안에 검사할 수 있고, 기기와 장소가 필요하지 않고 실온에서 검사가 가능한 장점이 있어 샤가스병이 풍토병인 유행지역의 혈액 은행 또는 응급실에서 수혈에 의한 샤가스병 감염을 막기 위한 검사로 면역크로마토그래피법이 유용할 것이라고 보고하였다. 국내의 경우 해외여행자를 통한 샤가스병 감염을 신속하게 관리할 수 있고, 효소면역법처럼 일정 검체가 수집되지 않더라도 검사가 가능하므로 의뢰 검체수가 적은 검사실에서 사용하기 적당하다고 할 수 있다. 본 연구에서 비교 평가된 네 가지 제품 모두 민감도와 특이도가 우수하였고, 그 중에서 Bioline와 Stat-Pak의 민감도와 특이도가 Detect와 OnSite 보다 우수한 결과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 에스디에서 개발된 면역크로마토그래피법인 SD Bioline Chagas Ab Rapid가 민감도와 특이도 면에서 다른 제품보다 우수하였고 검사 방법이 간단하고 검체는 혈장, 혈청 5  $\mu$ L 또는 전혈 10  $\mu$ L을 사용하여 15분 이내에 검사 결과가 육안으로 확인 가능하여 현혈자 검사뿐만 아니라 감염 진단에도 유용하며, 사용할 수 있는 검체가 혈청, 혈장뿐만 아니라 전혈도 가능하여 응급실에서 수혈을 요하는 경우에 신속하게 검사할 수 있다는 점에서 기존의 검사 방법보다 우수한 것으로 사료된다. 또한 외산 제품에 의존하지 않고 국산 제품을 개발하여 사용할 수 있다는 점도 이 연구의 큰 의의라고

사료된다.

## 요 약

**배경 :** 샤가스병은 크루스 파동편모충(*Trypanosoma cruzi*)이 원인으로 빈대에 물리거나 수혈과 장기 이식 등에 의해 감염되는 중남미 지역의 풍토병이다. 국내의 경우 감염된 사례는 없으나 중남미 지역의 해외여행자를 통한 샤가스병의 감염을 관리할 필요가 있다. 본 연구에서는 최근 국내에서 개발된 면역크로마토그래피법의 SD Bioline Chagas Ab Rapid (에스디, 대한민국)를 세 가지 면역크로마토그래피법시약과 비교 평가하고자 하였다.

**방법 :** 온두라스 국립 샤가스 연구원으로부터 수집한 검체 320건(샤가스 양성 검체 140건, 음성 검체 180건)을 대상으로, SD Bioline Chagas Ab Rapid 키트를 Chagas Stat-Pak Assay (Chembio Diagnostic Systems, USA), OnSite Chagas Ab Rapid test-Cassette (CTK Biotech, USA), Trypanosoma Detect Rapid Test (InBios International, USA) 등과 비교하였다. 온두라스 국립 샤가스 연구원의 결과에 대한 민감도와 특이도를 비교하였고, 다른 기생충 질환과의 교차반응을 평가하였다.

**결과 :** 온두라스 국립 샤가스 연구원 검사에 의한 결과와 비교 시 각 검사 키트의 민감도와 특이도는 SD 키트와 Chembio 키트는 99.3%, 100%이었고, InBios 키트는 97.2%, 100%, CTK 키트는 97.9%, 98.8%이었다. 다른 기생충 질환과의 교차반응은 없었다.

**결론 :** SD Bioline Chagas Ab Rapid 키트는 온두라스 국립 샤가스 연구원 결과와의 일치율이 우수하였다. 따라서 국내에서 개발된 SD Bioline Chagas Ab Rapid 키트는 샤가스병이 풍토병인 지역의 감염 진단과 해외여행자를 통한 국내 샤가스병 감염 관리에 유용할 것이다.

## 참고문헌

1. Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, et al. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Clin Vaccine Immunol 2007;14:355-61.
2. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, et al. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J Clin Micro-



- biol 1999;37:1554-60.
3. Oelemann WM, Teixeira MD, Verissimo Da Costa GC, Borges-Pereira J, De Castro JA, Coura JR, et al. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1998;36:2423-7.
4. Hoft DF, Kim KS, Otsu K, Moser DR, Yost WJ, Blumin JH, et al. Trypanosoma cruzi expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 1989;57:1959-67.
5. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to Trypanosoma cruzi in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis* 1999;179:1226-34.
6. Paranhos GS, Cotrim PC, Mortara RA, Rassi A, Corral R, Freilij HL, et al. Trypanosoma cruzi: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. *Exp Parasitol* 1990;71:284-93.
7. Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a Trypanosoma cruzi recombinant antigen that consists of four different peptides. *J Clin Microbiol* 2001;39:4390-5.
8. Cardinal MV, Reithinger R, G?rtler RE. Use of an immunochromatographic dipstick test for rapid detection of Trypanosoma cruzi in sera from animal reservoir hosts. *J Clin Microbiol* 2006;44:3005-7.
9. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 2007;298:2171-81.
10. Sánchez Negrette O, Sánchez Valdez FJ, Lacunza CD, García Bustos MF, Mora MC, Uncos AD, et al. Serological evaluation of specific-antibody levels in patients treated for chronic Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:297-302.
11. Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, de Aguilar V, Gonzalez A, et al. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of Trypanosoma cruzi-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *J Clin Microbiol* 2005;43:5065-8.
12. Saez-Alquézar A, Sabino EC, Salles N, Chamone DF, Hulstaert F, Pottel H, et al. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J Clin Microbiol* 2000;38:851-4.
13. Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for Trypanosoma cruzi: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol* 2000;38:639-42.
14. Sánchez-Guillén Mdel C, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gomez-Albino I, Ramos-Jimenez J, Torres-Rasgado E, et al. Clinical forms of Trypanosoma cruzi infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:733-40.
15. Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, et al. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with Trypanosoma cruzi recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol* 2004;42:449-52.
16. Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM Jr, Sleath PR, et al. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J Clin Microbiol* 1994;32:971-4.
17. Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of Trypanosoma cruzi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;46:265-71.
18. Marcipar IS, Risso MG, Silber AM, Revelli S, Marcipar AJ. Antibody maturation in Trypanosoma cruzi-infected rats. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:802-5.