

INQUÉRITO SOROLÓGICO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO CHAGÁSICA NO BRASIL, 1975/1980

Mario E. CAMARGO (1), Guilherme Rodrigues da SILVA (2), Euclides Ayres de CASTILHO (2) e
Antônio Carlos SILVEIRA (3)

Para obter subsídios quanto às dimensões do problema da infecção chagásica no país, foi realizado no Brasil, de 1975 a 1981, inquérito sorológico de prevalência da doença de Chagas, sob os auspícios do CNPq e com decisiva colaboração da SUCAM do Ministério da Saúde (4).

O objetivo proposto foi o de se determinar a frequência de resultados sorológicos positivos em cada município do país, com exceção do Estado de São Paulo e Distrito Federal, para os quais já há dados satisfatórios.

Tendo em vista dificuldades operacionais e o objetivo principal da pesquisa, foram excluídas as regiões urbanas, o estudo restringindo-se a localidades com até o máximo de 500 casas, como adiante referido.

O inquérito se fazia necessário pois, apesar do grande volume de informações existentes sobre a distribuição da doença e do grande número de estudos sorológicos realizados, não se tem um quadro muito preciso da situação. Isto decorre de que os dados são fragmentários e nem sempre podem ser coligidos ou confrontados, na medida em que foram colhidos em diferentes momentos, por métodos e técnicas diversas.

Foi a partir dos trabalhos iniciais de GUERREIRO & MACHADO em 1913³¹, aplicando a reação de Bordet e Gengou ao diagnóstico da doença de Chagas, e das pesquisas subsequentes de VILLELA & BICALHO³⁵, KELLER³⁵, LACORTE^{36,37,38}, MUNIZ & FREITAS^{41,42}, entre outros, que foram possíveis estudos epidemiológicos através de "reações de imunidade".

Um primeiro inquérito, foi o realizado em hospitais de Belo Horizonte em 1930, por VIL-

LELA³⁶. Das amostras de sangue colhidas, processadas pela reação de fixação do complemento, 28,4% foram positivas.

A seguir, sucederam-se investigações como as de DIAS, LARANJA & PELLEGRINO¹⁹ em Bambuí (1948), onde encontraram positividade de 38,4% nos soros examinados; mais tarde, de 481 reações de soros não selecionados ao acaso, colhidos também em Bambuí e nos Municípios de Iguatemi, Córrego Danta e Campos Altos em Minas Gerais (1948) 219 resultaram positivos (45,5%)²⁰.

Pedreira de Freitas obteve, com material colhido nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, em 1947, 51,3% de soros reagentes²⁶.

Com esses resultados, E. Dias afirmava então (1948) que "a pesquisa sistemática da etiologia chagásica, em todas as zonas de triatoma, quando vier a ser empreendida, revelará uma terrível incidência da moléstia"²¹.

A área de ocorrência da doença de Chagas foi sendo assim conhecida e delimitada através de inquéritos sorológicos realizados em diferentes regiões do país, e que vieram, em grande medida, confirmar o que fora previsto por DIAS.

Em Goiás, FREITAS & FIGUEIREDO (1951)²⁷, estudando 148 casos suspeitos de cardiopatia chagásica colheram 52,7% de resultados positivos e, em amostra determinada sem critério seletivo, de população dos Municípios de Hidrolândia e Trindade, 13,3% e 27,5%, respectivamente.

BRANT e colaboradores, em quatro municípios do Rio Grande do Sul obtiveram, em 1957, aproximadamente 23,9% de infecção en-

(1) Laboratório de Imunologia e Soroepidemiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

(2) Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina da USP

(3) Diretor da Divisão de Doença de Chagas, SUCAM/Ministério da Saúde

(4) Com auxílio parcial para o processamento de dados, do UNDP/World Bank/WHO — Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases

tre os 2.172 indivíduos examinados, sem que tenham podido demonstrar uma relação estatisticamente significativa entre sorologia positiva e alterações de traçado eletrocardiográfico¹³. Ainda no Rio Grande do Sul, SALGADO & col. (1964)⁴⁷ determinaram para vários municípios, um índice médio de positividade de 3,13% e, mais recentemente (1977), BARUFFA & ALCANTARA FILHO¹⁰ para 17 municípios do centro sul do Estado verificaram um índice médio de 17,6% de infecção humana por doença de Chagas¹⁰.

Em Santa Catarina, pelos dados apresentados por SALGADO & PELLEGRINO (1968), não foi comprovada a transmissão da enfermidade em nível endêmico, em três municípios estudados⁴⁷. Até aqui foi descrito um único caso comprovadamente autóctone, no Município de Gaspar⁴³. Alguns dados de entomologia, colhidos por FERREIRA NETO & col., confirmaram no entanto a presença, mesmo que em baixa densidade, de vetores importantes como *T. infestans* em alguns municípios do oeste e *P. megistus*. Estudos de reservatórios silvestres na ilha de Santa Catarina, revelaram a possível transmissão enzoótica da enfermidade na área. Foram na ocasião encontrados três exemplares de *Didelphis azarae azarae* infectados por *T. cruzi*²⁴.

No Paraná, SIMÕES (1943)⁵², ALMEIDA (1948)³, LOBO (1953)³⁹ e ARAUJO (1954)⁶, faziam já referência à localização de vetores domiciliados da doença de Chagas ao norte do Estado; para onde PINOTTI⁴⁴, em 1958, refere um índice de infecção da ordem de 12,9%, em quatro municípios.

Em São Paulo, muitos foram os estudos feitos como referido por BARRETTO⁷, desde aqueles de FREITAS (1947) em Itaporanga, entre escolares, onde verificou 42,7% de soros positivos, e de SILVA (1964), reportando dados do Serviço de Erradicação da Malária e Profilaxia da Doença de Chagas, que apresenta uma positividade de 13,93% para 34.710 exames, com amostras coletadas em 285 municípios.

O Rio de Janeiro e Espírito Santo tem sido considerados livres de transmissão domiciliar da doença, ou ela se faz aí em níveis muito pouco expressivos sob o ponto de vista epidemiológico. A existência de triatomíneos é no entanto desde há muito conhecida, mesmo de espécies quase que estritamente domiciliárias

como é o caso de *T. infestans* nos Municípios de Rezende e Itaverá¹⁴ e de Caxias e Nova Iguaçu⁵. No Rio de Janeiro, COURA & col.¹⁸ em 1971, estudando o foco da Baixada Fluminense, determinaram a autoctonia de alguns casos, sendo que nas 110 reações feitas, 5,4% de soros foram positivos. Antes disso, resultados colhidos por DIAS & col., em Araruama e Magé (1953), como referido por SALGADO & PELLEGRINO⁴⁷, e por PINOTTI (1958), como referido por BARRETTO⁷, pareciam já indicar ser o problema de alguma relevância no Estado.

No Espírito Santo, em nenhum momento foram detectados índices importantes de infecção. SANTOS e colaboradores (1969) (apud BARRETTO)⁷, em oito municípios, obtiveram 1,04% de amostras positivas em 6.583 examinadas por fixação do complemento. BARROS & col., em 1975⁸, verificaram apenas dois soros positivos em 3.000 colhidos de crianças de idade escolar (0,066%); e, em 1980⁹, em material do banco de sangue do Hospital da Universidade Federal do Espírito Santo, foram observados apenas 14 casos de sorologia positiva, nos 4.108 doadores examinados pelas reações de fixação do complemento e imunofluorescência indireta (0,36%).

Em Minas Gerais foram reiteradamente comprovados altos índices de infecção chagásica, em especial na região do Triângulo, nos municípios à margem esquerda do Rio Grande e ao norte do Estado. A rigor, apenas no extremo sul e na região limítrofe ao Espírito Santo e ao Rio de Janeiro não se verificaram taxas altas de prevalência. O mais extenso dos inquéritos aí promovidos abrangeu 82 municípios, com 28.615 amostras de sangue tomadas em população escolar e, mesmo com grupos etários jovens, a positividade esteve em 6,2%. Afóra esse trabalho de SALGADO & PELLEGRINO⁴³, realizado em 1963, é ainda de fazer referência àquele de PORTO & PORTO (1962) na região do Triângulo, em que a positividade foi da ordem de 47,32%⁴⁶.

PONDÉ, em 1946, foi o primeiro a fazer um estudo sorológico na Bahia, em pacientes suspeitos de doença de Chagas⁴⁵. O mesmo Pondé, em 1960, obteve 25,0% de soros positivos em 8.411 colhidos em Salvador, como referido por SALGADO & PELLEGRINO⁴⁷.

Nos Estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte, Lucena fez amplos estudos, no período de 1957 a 1962. Foram ao todo coletadas 15.774 amostras, das quais 15.448 foram examinadas pela reação de GUERREIRO-MACHADO⁴⁰. Em Alagoas, o índice de positividade foi de 19,1%, em Pernambuco 17,0%, na Paraíba 20,7% e no Rio Grande do Norte 12,2%.

É também de mencionar que, na Paraíba, SILVA, CARVALHO & CARNEIRO, em 1956, com 1468 amostras colhidas nas quatro diferentes regiões fisiográficas do Estado, obtiveram 4,4% de reações sorológicas positivas⁵¹. E, em Pernambuco, BORBA & col. encontraram, para o Município de Nazaré da Mata, em 1954, 20,9% de positividade¹².

No Ceará, JUCÁ em 1949³³ e JUCÁ & CUNHA em 1950³⁴, apresentam resultados sugestivos da ocorrência da enfermidade na população humana. Na ocasião, em 200 reações sorológicas, por fixação do complemento, foram positivas 8,5%. ALENCAR & col., em 1963¹, obtiveram, para as regiões do Cariri e Baturité, 22,63% de soros reagentes e, em 1977, é descrito inquérito sorológico realizado no período de 1970 a 1974 em 11 municípios de áreas irrigadas do Estado sendo, das 7.757 amostras examinadas por fixação do complemento, 2,9% positivas, com um grau de morbidade ou "adoecimento" em torno de 39%².

Os dados disponíveis para as demais regiões do país, incluindo a Amazônia, parte do centro-oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Maranhão e Piauí, são muito pobres. Apenas os primeiros casos começam a ser relatados, como foi feito por FIGUEIREDO & col., para o Piauí²⁵, SHAW & col., no Pará⁵⁰ e FERRARONI, NUNES & CAMARGO para a Amazônia²³. A domiciliação de triatomíneos relatada em alguns casos, é maciça no Piauí, onde os índices de infestação são dos mais altos¹⁶.

METODOLOGIA

No sentido de fazer os dados comparáveis, foi definido um modelo de operação o mais uniforme possível. Este abrangeu desde os procedimentos a serem seguidos na colheita do material e no treinamento do pessoal envolvido nas diferentes etapas do trabalho, até a téc-

nica de leitura dos testes e ao tratamento estatístico das informações.

Amostragem — O esquema de amostragem do inquérito foi delineado pela equipe técnica da SUCAM, sob orientação do Dr. Glauco Correa Leibovitch.

A população alvo constituiu-se de todos os residentes em localidades com 10 a 500 casas (com 1 a 200 para a região Amazônica) de cada um dos municípios brasileiros, excetuando-se o Estado de São Paulo e Distrito Federal. Os municípios foram divididos em 5 estratos, segundo o número de casas das suas localidades e de cada estrato sorteavam-se, aleatoriamente, cerca de 15% das localidades. Dessas localidades sorteadas, selecionavam-se aproximadamente 15% das casas. A coleta de sangue foi feita para a totalidade dos moradores das casas selecionadas.

Testes sorológicos

Amostras de sangue — Diante da previsão de um total de mais de 1 milhão de amostras de sangue, optamos pela colheita de sangue digital em papel de filtro^{4,53}.

A coleta de sangue venoso foi descartada não só pelo custo do material necessário, como também por não se dispor de suficiente pessoal habilitado, nem de condições adequadas para separação de soros e seu acondicionamento e transporte sob refrigeração.

As amostras de sangue, obtidas por punção digital com lancetas descartáveis, foram colhidas sobre folhas de papel de filtro, de 12,5 cm de comprimento e 5 cm de largura, suficientes para conter 8 amostras cada, e dispostas em pequenos cadernos de 5 folhas, bastantes para amostras em duplicatas de 20 pacientes. Intercalavam-se folhas de papel impermeável e o conjunto recebia uma capa de papel comum, para anotações de identificação geográfica.

Por meio de carimbo, assinalavam-se nas folhas de papel de filtro 4 colunas de 2,8 cm de largura, destinadas cada uma às amostras de um paciente. Dois círculos de 1,5 cm de diâmetro eram delimitados nas colunas, colhendo-se duas amostras de cada pessoa. Para esse fim, depositava-se uma gota grande de sangue sobre cada círculo, de modo que impreg-

nasse de uma só vez toda a espessura do papel na área correspondente ao círculo.

As amostras eram identificadas assinalando-se, nas colunas, o número respectivo de cada paciente.

O papel de filtro utilizado foi o "Klabin-80" (Cia. Fabricadora de Papel, São Paulo, Brasil), de partida especialmente produzida, isenta de produtos químicos que representavam contaminação freqüente nas partidas comerciais, e previamente testada quanto a ausência de atividade interferente na conservação e eluição das amostras.

A cada caderno correspondia uma planilha, ou "Boletim Diário de Colheita de Sangue", folhas em que se registravam dados para identificar a região geográfica, Estado, Município, Localidade, além das respectivas siglas digitais para fins de computação. Seguiu-se a lista das pessoas incluídas, numeradas em seqüência, e com dados referentes a idade, sexo e se autóctones ou procedentes de outros municípios, bem como colunas para anotação dos resultados dos testes sorológicos, respectivamente positivos, negativos, duvidosos ou não obtidos.

Após secagem do sangue à temperatura ambiente, os cadernos eram embrulhados nas respectivas planilhas, colocados em sacos plásticos e estocados em caixas de isopor para proteção contra umidade e acentuadas variações de temperatura. Transportadas às sedes regionais da SUCAM, as amostras eram aí conferidas quanto à identificação e encaminhadas por via aérea aos laboratórios, onde chegavam geralmente dentro de 2 a 4 semanas da colheita. Até o processamento ficavam conservadas a -20°C, geralmente por períodos de até 3 meses. As duplicatas das amostras já processadas eram então enviadas ao laboratório central, para controle de qualidade.

Técnica sorológica

Teste sorológico — Para o processamento das amostras escolheu-se o teste de imunofluorescência indireta¹³, considerando-se não apenas as suas características, como também as limitações impostas a outros testes possíveis. A coleta em papel de filtro e a maior complexidade operacional descartaram a utilização do teste de fixação do complemento. Quanto ao teste de hemaglutinação passiva, verificou-se não ha-

ver, na época, condições para produção do reagente em quantidade suficiente e de reprodutibilidade satisfatória para sucessivas partidas. Optou-se, então, pelo teste de imunofluorescência, tendo-se em vista a simplicidade técnica, baixo custo e facilidade de padronização. Esta se traduz especialmente pela possibilidade de produção de grandes lotes de antígeno, altamente reprodutíveis e suficientes, cada um, para milhares de testes. Acresce também que os conjugados fluorescentes podem ser estandardizados sob o aspecto imunoquímico. Além disto os resultados dos testes podem ser uniformizados, entre diferentes laboratórios através, de soros padrão de referência.

A existência, no país, de laboratórios de Universidades e de Serviços de Saúde Pública, aptos a realizar testes de imunofluorescência, foi também fator decisivo para sua escolha.

Para maior especificidade do teste procuramos afastar reações devidas a anticorpos "naturais", IgM⁵⁴, pela utilização de conjugado fluorescente antiglobulínico, reagente apenas com anticorpos IgG nas diluições de uso.

Por outro lado, a conservação relativamente precária de anticorpos IgM em sangue dessecado em papel de filtro³², parece minimizar sua interferência nos testes.

Reagentes — Para o preparo do antígeno cultivou-se o *Trypanosoma cruzi*, cepa Y, em meio líquido LIT²² por 7 dias, com agitação ocasional. As formas parasitárias, predominantemente epimastigotas, eram recolhidas por centrifugação e lavadas por três vezes em grandes volumes de solução salina tamponada com fosfatos a 0,01 M, de pH 7,2 (SSTF). O sedimento era então ressuspensão em solução de NaCl 0,15 M com formalina a 2%, à temperatura ambiente, por 24 horas. Depois de lavados, suspendiam-se os parasitas em solução de dextran a 6%, para liofilização. Partidas ulteriores foram liofilizadas em solução de leite desnatado, a 0,9% em SSTF. Neste caso, o antígeno reconstituído com água destilada devia ser centrifugado por alguns minutos e os parasitas ressuspensos em solução de NaCl 0,15 M, para uso.

Com a suspensão de parasitas preparavam-se lâminas de microscopia para os testes. Utilizaram-se lâminas com 1 mm de espessura e

apresentando 10 áreas delimitadas por traços impressos (Perfecta, Indústria e Comércio de lâminas de Vidro Ltda, São Paulo, Brasil). Ocasionalmente, esses traços não eram suficientes para impedir a confluência e mistura das amostras e precisavam ser previamente reforçados com esmalte de unhas. O esmalte era depositado sobre os traços a reforçar, com o auxílio de agulha sem bisel, adaptada a pipeta ou a pequeno frasco plástico.

Depois de reconstituído o antígeno liofilizado, pela adição de água destilada, este era deixado em repouso por cerca de 1 hora, em geladeira, para rehidratação satisfatória dos parasitas. Se necessário, a suspensão era diluída com solução salina, para se obter de 5 a 20 tripanosomas por campo microscópico de 400 x, nos preparados. Para a distribuição do antígeno nas lâminas de microscopia, depositavam-se gotas em cada área, com pipeta e agulha sem bisel. Aspirava-se a gota, de volta para pipeta, deixando-se apenas uma película de líquido, que devia se estender por toda a área. Depois de secas a 37°C por 1 hora, as lâminas eram embrulhadas individualmente e conservadas a -20°C até utilização.

Para o preparo do conjugado fluorescente, imunizaram-se carneiros com a fração IgG de soros humanos (fornecida pelo Prof. R.G. Ferri, Centro de Pesquisas Imunoquímicas do Instituto de Ciências Biomédicas, USP). Os soros imunes eram adequadamente absorvidos, para apresentarem reação apenas com IgG, nas diluições de uso nos testes de imunofluorescência.

Procedeu-se à marcação com isotiocianato de fluoresceína (isomero I, cristalino, 99% de pureza, International Biological Supplies, Inc., USA) por técnica de diálise¹⁷, com remoção de fluorocromo livre por gel-filtração em Sephadex G-50. Os conjugados resultantes apresentaram, em sucessivas partidas, relação ponderal fluoresceína/proteína de cerca de 6,5. Eram conservados pela adição de igual volume de glicerina (p.a. Merck) e mantidos a -20°C. Assim preservados, mostravam títulos de 1:80 a 1:100, nos testes de imunofluorescência¹¹.

Soros padrão de referência — Foram preparados soros padrão, positivo e negativo e, para esse fim, coletaram-se "pools" de soros

reagentes, de pacientes chagásicos, e de soros não reagentes.

Clarificaram-se 57 os "pools" por tratamento com Freon, distribuíram-se em alíquotas de 1,0 ml e liofilizaram-se.

Para uso, depois de reconstituído o material liofilizado pela adição de 1,0 ml de água destilada, acrescentava-se à solução 1 ml de glicerina p.a. Depois de homogeneizada, esta mistura era conservada no congelador da geladeira e, diariamente, preparavam-se as diluições de uso a serem incluídas como padrão em cada teste.

Processamento das amostras — Para eluição das amostras, cortavam-se discos de 12 mm de diâmetro, com auxílio de vazador metálico, das áreas de papel impregnadas de sangue. Os discos eram depositados individualmente em pequenos batoques de plástico, receptáculos côncavos com capacidade para conter 1 ml de líquido (batoques n.º 14, Frascolex Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brasil), dispostos em séries de 10 em suporte adequado. A cada disco adicionava-se 0,2 ml de SSTF (solução salina tamponada com fosfatos de 0,01 M, de pH 7,2), deixando-se em geladeira até o dia seguinte, ou pelo prazo mínimo de 3 horas.

Para o teste, transferia-se com tubo capilar 1 gota de cada eluato, cerca de 20 microlitros, para uma área demarcada na lâmina. Depois de incubar a 37°C por 30 minutos, lavavam-se as lâminas por três vezes de 15 minutos em SSTF, secavam-se com papel absorvente e adicionava-se 1 gota de conjugado a cada área, diluído segundo o título, em SSTF com azul de Evans a 2 mg%. Após nova incubação por 30 minutos a 37°C, lavavam-se e enxugavam-se as lâminas como anteriormente, e montavam-se com laminula e glicerina alcalina (1 vol. tampão carbonato de sódio-bicarbonato de sódio 0,5 M, pH 9,5, e 9 vols. glicerina). Em cada teste incluíam-se diluições a 1:20 do soro padrão negativo e de 1:20 a 1:320 em razão dupla, do soro padrão positivo.

Para leitura dos testes, os preparados eram observados à microscopia de fluorescência, de preferência sob objetivas de 40 x a 60 x, atribuindo-se resultado positivo quando os parasitas mostravam evidente coloração fluorescente, geralmente mais intensa nas paredes celulares e nos flagelos. Referiam-se como negati-

vos os testes com parasitas não corados pelo fluorocromo, ou apresentando apenas coloração esverdeada, pouco intensa e sem brilho, difusa no citoplasma.

Tanto eventuais resultados duvidosos, como ausência de resultados por material insuficiente ou inadequado eram assinalados nas planilhas em colunas respectivas. Para fins de computação, os resultados duvidosos foram tomados como negativos.

Completados os testes para cada partida de amostras, as planilhas correspondentes eram copiadas (xerox), para o arquivo do laboratório processador, e os originais e respectivos cadernos com as duplicatas das amostras enviadas ao laboratório central. Neste, as planilhas eram imediatamente enviadas, para computação dos dados, ao Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e as duplicatas das amostras utilizadas para o controle de qualidade.

Rede de laboratórios

Para o processamento das amostras, foi articulada uma rede de laboratórios distribuídos pelo território nacional, pertencentes a Universidades ou Serviços de Saúde Pública. Esses laboratórios dispuseram-se a cooperar graciosamente para o trabalho, colocando instalações e pessoal à disposição da tarefa a ser realizada. No mais das vezes foi-lhes fornecida a complementação de equipamento que se fizesse necessário, como refrigerador, congelador, estufa bacteriológica, e o material de consumo, incluindo reagentes, lâmpadas para microscopia de fluorescência, lâminas de vidro etc. Além disso, o laboratório recebia recursos para reforço de mão de obra, quando necessário.

Os laboratórios participantes foram selecionados de acordo com localização geográfica, posse de equipamento para microscopia de fluorescência e disponibilidade para o trabalho.

Além do Laboratório de Imunologia e Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, que desempenhou as funções de Laboratório Central, outros 14 Laboratórios regionais participaram dos trabalhos do Inquérito. Segundo a localização, são os seguintes:

1. **BELÉM, PARÁ** — Instituto Evandro Chagas (Fundação Serviços de Saúde Pública);
2. **BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS** — Centro de Pesquisas René Rachou (Instituto de Endemias Rurais, Fundação Oswaldo Cruz);
3. **BRASÍLIA, D.F.** — Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Ciências da Saúde (Universidade de Brasília);
4. **CURITIBA, PARANÁ** — Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas (Universidade Federal do Paraná);
5. **FORTALEZA, CEARÁ** — Núcleo de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde (Universidade Federal do Ceará);
6. **GOIÂNIA, GOIÁS** — Departamento de Imunologia do Instituto de Patologia Tropical (Universidade Federal de Goiás);
7. **PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL** — Laboratório de Parasitoses Sistêmicas do Instituto de Pesquisas Biológicas "Dr. Jandyr Maria Faillace" (Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul);
8. **RECIFE, PERNAMBUCO** — Laboratório Central da Fundação de Saúde "Amaury de Medeiros" (Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco);
9. **RIO DE JANEIRO, R.J.** — Instituto Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz);
10. **RIO DE JANEIRO, R. J.** — Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina (Universidade Federal do Rio de Janeiro);
11. **SALVADOR, BAHIA** — Laboratório de Saúde Pública "Prof. Gonçalo Moniz" (Secretaria de Saúde do Estado da Bahia);
12. **TEREZINA, PIAUÍ** — Laboratório de Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde (Universidade Federal do Piauí);
13. **UBERABA, MINAS GERAIS** — Departamento de Patologia (Faculdade Federal de Medicina do Triângulo Mineiro);
14. **VITÓRIA, ESPÍRITO SANTO** — Disciplina de Parasitologia do Departamento de Biologia (Universidade Federal do Espírito Santo).

A cada um dos 14 laboratórios integrantes da rede foi atribuído o processamento dos lotes de amostras, progressivamente encaminhadas a partir das sedes regionais da SUCAM. Em seguida os laboratórios deveriam encaminhar as planilhas correspondentes já com os resultados dos testes, ao Laboratório Central, conservando cópias em seus arquivos. Em anexo, o Laboratório enviava também duplicatas das amostras processadas, para controle de qualidade.

Ao Laboratório Central foi atribuída a direção dos trabalhos da rede, com o treinamento das equipes, preparação e distribuição de rea-

gentes e contínuo controle de qualidade dos testes realizados.

Controle de qualidade

De cada lote de amostras processadas, sorteavam-se de 10% a 20% das duplicatas recebidas pelo Laboratório Central, para repetição dos testes. Os resultados comparativos eram expressos em índices de concordância, de co-positividade e de co-negatividade²⁹. Os índices de co-positividade só foram calculados quando significativo o número de amostras. A Fig. 1 é apresentada como exemplo do procedimento para controle de qualidade efetuada continuamente durante o inquérito.

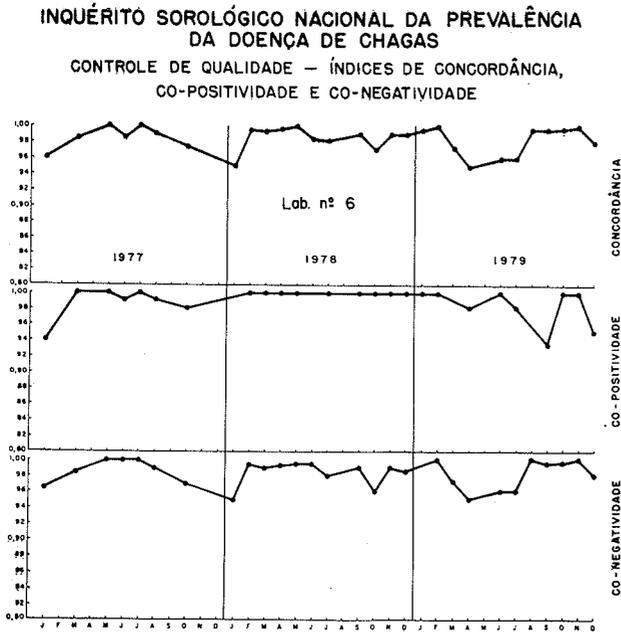


Fig. 1 — Gráficos de índices de confiabilidade dos testes realizados em um dos Laboratórios processadores, com relação ao ensaio de duplicatas pelo Laboratório Central, para controle de qualidade.

Processamento dos dados

Os dados contidos em cada folha do “Boletim Diário de Colheita de Sangue” (Estado, município, localidade, idade do indivíduo, se autóctone ou procedente de outro município, sexo e resultados da reação sorológica), após trabalho manual de verificação de correspondência entre localidade, município e Unidade da Federação com seus respectivos códigos, foram transcritos por digitação manual para fitas magnéticas que passavam a constituir nossos arquivos de informações. A partir destes

arquivos, e já usando equipamento de processamento eletrônico, (Centro de Computação Eletrônica da USP) seguiu-se uma fase de controle de qualidade de dados. Ao final desta fase foram feitas as seguintes tabulações para cada unidade federativa: distribuição dos dados amostrais por localidades de cada município segundo autoctonia, grupo etário, sexo e porcentagem de indivíduos positivos; distribuição das observações amostrais por estrato de cada município segundo autoctonia, grupo etário, sexo e porcentagem de reações positivas; distribuição amostral para cada localidade de ca-

da município em termos de frequências relativas de reações positivas segundo autoctonia, grupo etário e sexo; distribuição das observações amostrais segundo os mesmos critérios do item anterior para cada estrato de cada município; e, finalmente, a distribuição por município e por seus estratos segundo a fração amostral, números esperados de positivos, tamanho da população (estimada pela equipe da SUCAM) e a estimativa por ponto de prevalência de reações sorológicas positivas.

Estimativa de prevalência

Para o cálculo das estimativas de prevalências, as reações sorológicas duvidosas foram consideradas como negativas. As estimativas de prevalências foram feitas segundo o seguinte critério:

- 1) Cálculo da fração de amostragem (estrato i):

$$f_i = \frac{\text{N.º localidades selecionadas}}{\text{N.º total de localidades}} \times$$

$$\frac{\text{N.º casas selecionadas}}{\text{N.º casas existentes nas local. selecionadas}}$$

- 2) Cálculo do número esperado de positivos (estrato i):

$$\hat{T}_i = \frac{\text{N.º de positivos no estrato } i}{f_i}$$

- 3) Estimativa da prevalência no estrato i:

$$\hat{P}_i = \frac{\hat{T}_i}{N_i}; \text{ onde } N_i = \text{Tamanho da população do estrato } i$$

- 4) Estimativa da prevalência no município o:

$$\hat{P}_o = \frac{\sum_{i=1}^5 N_i P_i}{N};$$

$$i = 1, 2, 3, 4, 5$$

$$N = \sum_{i=1}^5 N_i = \text{Tamanho da população do município}$$

RESULTADOS

De um total de 1.626.745 amostras examinadas, foi possível computar dados de 1.352.197 observações provenientes de 3.026 municípios que, excetuando-se São Paulo e o Distrito Federal, permitem estimar para a população alvo, anteriormente definida, uma prevalência de reações sorológicas positivas de 4,22%.

A Tabela I apresenta as estimativas de prevalência segundo as unidades federativas. Pela análise desta tabela, podemos notar que as 5 maiores prevalências foram encontradas no Rio Grande do Sul (8,84%); Minas Gerais (8,83%); Goiás (7,40%); Sergipe (5,97%) e Bahia (5,44%). De todas as unidades federativas trabalhadas somente no Amapá é que não se encontrou um só caso de reação de imunofluorescência indireta para *T. cruzi* positiva. Prevalências inferiores a 1% foram encontradas em: Maranhão (0,12%); Roraima (0,31%); Espírito Santo (0,32%); Rondônia (0,41%); Pará (0,56%) e Ceará (0,84%).

Do total dos indivíduos examinados 46,06% eram do sexo masculino, sendo, portanto, 53,94% do sexo feminino. No sexo masculino, em termos amostrais, encontramos 2,36% de reações positivas e, 3,17% no sexo feminino.

As tabulações detalhadas, anteriormente referidas, estão sendo utilizadas pela SUCAM na programação do controle da doença e no planejamento de estudos operacionais. As Figs. 2 e 3 são exemplos, referentes aos Estados de Goiás e Rio Grande do Sul, do mapeamento das diversas Unidades da Federação, através dos dados do presente inquérito soroepidemiológico referentes às prevalências por município.

DISCUSSÃO

Uma avaliação crítica do trabalho efetuado é sugestiva de confiabilidade dos resultados, pela qualidade e homogeneidade obtidas no processamento das amostras. Porém, os dados sorológicos levantados deverão ser confrontados com outros, de natureza epidemiológica,

T A B E L A I
Distribuição das estimativas de prevalência de reações sorológicas positivas segundo Unidades da Federação

Unidades da Federação	N.º total de municípios	N.º total de localidades	N.º de municípios com estimativas de prevalências acima de 0%	Estimativa de prevalência (por 100)
NORTE				
Rondônia	2	172	2	0,41
Acre	7	132	7	2,39
Amazonas	44	767	36	1,88
Roraima	2	151	2	0,31
Pará	83	2110	46	0,56
Amapá	5	177	—	—
NORDESTE				
Maranhão	130	2136	51	0,12
Piauí	114	1191	103	4,04
Ceará	141	2224	93	0,84
Rio Grande do Norte	140	1009	110	1,78
Paraíba	171	1466	150	3,48
Pernambuco	163	2003	144	2,79
Alagoas	94	915	70	2,48
Sergipe	74	600	60	5,97
Bahia	331	4778	301	5,44
SUDESTE(*)				
Minas Gerais	717	5344	574	8,83
Espírito Santo	52	629	27	0,32
Rio de Janeiro	61	587	35	1,75
SUL				
Paraná	290	3175	245	4,00
Santa Catarina	197	1130	130	1,39
Rio Grande do Sul	231	1895	189	8,84
CENTRO OESTE(**)				
Mato Grosso	34	1355	31	2,82
Mato Grosso do Sul	50	473	43	2,46
Goiás	219	2110	210	7,40

(*) Excluindo São Paulo

(**) Excluindo Distrito Federal

distribuição de vetores etc. Eventuais falhas podem resultar de problemas acidentais, ocasionalmente verificados na identificação de amostras, em desvios do plano de amostragem, na execução dos testes ou na digitação de resultados. Assim, de um total de 1.626.745 amostras examinadas nos laboratórios, somente 1.352.197 puderam ser processadas estatisticamente. Isto resultou, principalmente, de repetições da coleta de sangue em várias localidades, além de casos de dados originais ilegíveis ou incongruentes.

Outras incorreções poderão resultar das limitações do teste, especialmente quanto à especificidade, assinalando-se em particular as reações cruzadas com leishmanioses. Também não foi levado em conta o valor preditivo do teste de imunofluorescência indireta anti-T. cruzi, dadas as variações na sensibilidade e na especificidade constatadas ao longo do estudo pelos controles de qualidade. No entanto, sua tendenciosidade provavelmente não deve ser de grande magnitude pois, apesar das variações observadas, estas se mantiveram dentro de limites satisfatórios.

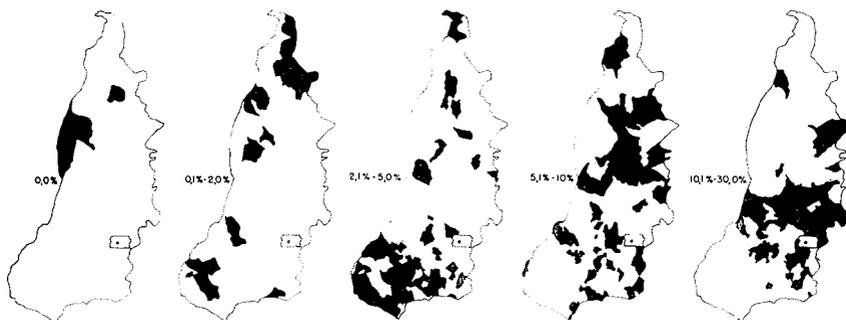


Fig. 2 — Distribuição dos índices de prevalência por Município no Estado de Goiás

Pela magnitude do trabalho, foram realizados apenas testes qualitativos, o que veio tornar relativamente constante para todas as regiões do país o grau de reatividade discriminante entre amostras reagentes e não reagentes. Tendo-se em vista a grande amplitude de variação da prevalência da infecção chagásica no país, a utilização de um teste qualitativo único poderá certamente resultar em incorreções. Pelas variações do valor preditivo do teste segundo os índices de prevalência, poderá ocorrer maior ou menor porcentagem de resulta-

dos falsos, especialmente dentre os resultados positivos observados nas populações com baixa prevalência^{28,29,30}.

São apresentadas apenas estimativas de prevalência por ponto porque o procedimento de coleta de dados não permitiu identificar os domicílios selecionados. Assim, não foi possível estimar a variância, necessária para o cálculo das estimativas de prevalência por intervalo.

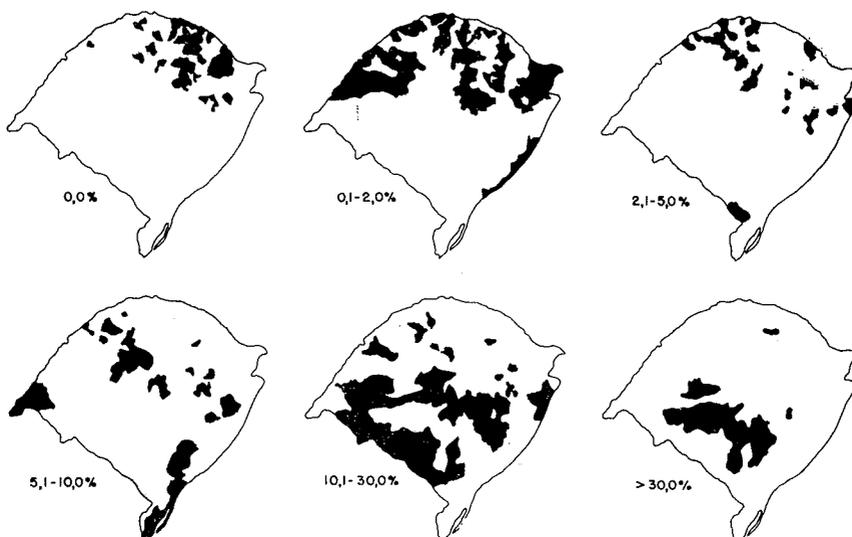


Fig. 3 — Distribuição dos índices de prevalência por Município, no Estado do Rio Grande do Sul

Mesmo levando-se em conta as diferenças metodológicas e temporais, os resultados encontrados para determinadas áreas diferem acentuadamente das informações anteriormente disponíveis. Alguns dados merecem comentários particulares. A prevalência estimada para Mato Grosso constituiu motivo para a implementação, nessa área, de atividades regulares de controle da doença de Chagas pela SUCAM. Tendendo a confirmar os achados soroepidemiológicos, os resultados agora colhidos no inquérito triatomíneo mostraram a presença na área, de triatomíneos domiciliados naturalmente infectados.

Para o Ceará, não se encontrou nenhum município com as altas prevalências registradas por ALENCAR & col.². Aparentemente, a longa estocagem acidentalmente ocorrida para as amostras dessa área, no presente inquérito, poderá ser responsável ao menos em parte, pela baixa prevalência observada.

No Estado de Santa Catarina a elevada prevalência encontrada em alguns municípios não foi confirmada em verificação posterior (SCHLEMPER & col., 1983)⁴⁹, e parece devida a equívocos de registro de resultados nas planilhas.

Os resultados encontrados para o Acre e o Amazonas não deixam de chamar a atenção e estão merecendo confirmação, em estudo epidemiológico já em andamento.

Não é necessário insistir no fato de que, considerando-se a população alvo do estudo e o processo de amostragem adotado para se atingir os objetivos traçados, não é possível inferir qual a prevalência de infecção chagásica na população residente no Brasil no período em estudo.

Considerando-se a dinâmica de coleta de amostras e registro de dados, não parece de boa estratégia a "busca" ou "identificação de casos" a partir dos Boletins Diários de Coleta de Sangue.

OBS: Para sua realização, o Inquérito contou com recursos do Ministério da Saúde, acrescidos de auxílios do CNPq. Para a fase de processamento de dados foi recebido auxílio parcial do UNDP/World Bank/WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases.

SUMMARY

Chagas'disease serology in Brazil, 1975 — 1980

A nationwide seroepidemiologic survey of human *T. cruzi* infection was carried out in Brazil from 1975 to 1980 as a joint programme of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Superintendência de Campanhas (SUCAM), Ministry of Health, of Brazil.

Due to the marked heterogeneity of urban populations as result of wide migratory movements in the country and since triatomine transmission of the disease occurs mostly in rural areas, the survey was limited to rural populations. The survey was based on a large cluster sampling of complete households, from randomly selected localities comprised of 10 to 500 houses, or up to 200 houses in the Amazon region. Random selection of localities and houses was permitted by a detailed mapping of every locality in the country, as performed and continuously adjusted, by SUCAM. In the selected houses duplicate samples on filter paper were collected from every resident 1 year or older. Samples were tested in one of 14 laboratories scattered in the country by the indirect anti-IgG immunofluorescence test, with reagents produced and standardized by a central laboratory located at the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. A continuous quality control was performed at this laboratory, which tested duplicates of 10% to 15% of all samples examined by the collaborating laboratories.

Data regarding number of sera collected, patients'age, sex, place of residence, place of birth and test result were computerized at the Department of Preventive Medicine, Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Serologic prevalence indices were estimated for each Municipality and mapped according to States and Territories in Brazil. Since data were already available for the State of São Paulo and the Federal District, these unities were not included in the survey.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALENCAR, J. E. et al. — Estudos sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. II. Novos dados. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 15: 551-565, 1963.

2. ALENCAR, J. E. et al. — Estudos sobre a epidemiologia da doença de Chagas no Ceará. XII — Estudos da infecção humana pelo *T. cruzi* no Município de Morada Nova. Com. XIII Congr. Soc. Brasil. Med. Trop., Brasília, 1977.
3. ALMEIDA, A. S. de — Doença de Chagas no norte do Paraná. *An. paul. Med. cirurg.* 56: 29-36, 1948.
4. ALVAREZ, M. et al. — Recolección de sangre em papel para diagnóstico de infecção chagásica por imunofluorescência. *Bol. chil. Parasitol.* 26: 2-7, 1971.
5. ARAGÃO, M. B. & SOUZA, S. A. — *Triatoma infestans* colonizando domicílios na Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 5: 115-121, 1971.
6. ARAÚJO, H. C. S. — A doença de Carlos Chagas no Paraná. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 52: 477-485, 1954.
7. BARRETTO, M. P. — Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., pp. 89-151, 1979.
8. BARROS, G. C. et al. — Contribuição para o conhecimento da doença de Chagas autóctone no Estado do Espírito Santo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17: 319-329, 1975.
9. BARROS, G. C. et al. — Inquérito Sorológico sobre Doença de Chagas no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Espírito Santo. *Rev. Pat. Trop.* 9: 153-156, 1980.
10. BARUFFA, G. & ALCANTARA FILHO, A. — Prevalência sorológica da doença de Chagas na zona sul do Rio Grande do Sul (Brasil). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 117-123, 1977.
11. BEUTNER, E. H. et al. — Quantitative studies of immunofluorescence staining. II. Relationships of characteristics of unabsorbed antihuman IgG conjugates to their specific staining properties in an indirect test for antinuclear factors. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 39: 587-606, 1968.
12. BORBA, P. et al. — Aspectos epidemiológicos da moléstia de Chagas em Pernambuco. *Arq. Brasil. Card.* 3: 191-200, 1954.
13. BRANT, T. C. et al. — Dados sorológicos e eletrocardiográficos obtidos em populações não selecionadas de zonas endêmicas de doença de Chagas no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 9: 141-148, 1957.
14. BUSTAMANTE, F. M. & GUSMÃO, J. B. — Sobre um foco de *Triatoma infestans* nos municípios de Resende e Itaverá, Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 5: 23-28, 1953.
15. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Chagas' disease. Technical modification employing preserved cultural forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 227-234, 1966.
16. CASTRO FILHO, J. & SILVEIRA, A. C. — Distribuição da doença de Chagas no Brasil. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 31: 85-98, 1979.
17. CLARK, H. F. & SHEPARD, C. C. — A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology* 20: 642-644, 1963.
18. COURA, J. R. et al. — Um foco de doença de Chagas transmitida pelo *Triatoma infestans* na Baixada Fluminense, Município de Caxias, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 5: 123-128, 1971.
19. DIAS, E. et al. — Estudo sobre a importância social da doença de Chagas. I. Inquérito clínico epidemiológico feito nas vizinhanças de Bambuí, oeste de Minas. *Brasil. med.* 62: 412-413, 1948.
20. DIAS, E. — Considerações sobre a importância da moléstia de Chagas em Minas Gerais e Estados vizinhos. Necessidade urgente de ser desenvolvido o estudo dessa endemia e de serem tomadas medidas para combatê-la. *Brasil. med.* 63: 217-220, 1949.
21. DIAS, E. — Doença de Chagas: um grande problema de saúde pública. *Brasil. med.* 61: 162-164, 1947.
22. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 18: 195-202, 1966.
23. FERRARONI, J. J. et al. — Moléstia de Chagas na Amazonia. Ocorrência de seis casos suspeitos autóctones sorologicamente positivos. *Acta Amazônica* 7: 438-440, 1977.
24. FERREIRA NETO, J. A. et al. — Novos dados sobre a distribuição geográfica dos triatomíneos em Santa Catarina, Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 4: 175-181, 1971.
25. FIGUEIREDO, P. Z. et al. — Doença de Chagas: primeiros casos autóctones no Estado do Piauí. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 9: 105-107, 1975.
26. FREITAS, J. L. P. de — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. [Tese de doutoramento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1947].
27. FREITAS, J. L. P. de & FIGUEIREDO, C. — Resultados de investigações sorológicas sobre moléstia de Chagas realizadas no Estado de Goiás. *Arq. Hig. Saúde públ.* 16: 227-230, 1951.
28. GALEN, R. S. & GAMBINO, S. R. — Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses. New York, John Wiley & Sons, 1975.
29. GART, J. J. & BUCK, A. A. — Comparison of a screening test and a reference test in epidemiological

- studies. II — A probabilistic model for the comparison of diagnostic tests. *Amer. J. Epidemiol.* 83: 593-602, 1966.
30. GRINER, P. F. et al. — Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Int. Med.* 94: (part 2), 1981.
31. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. (Nota prévia). *Brasil. med.* 27: 225-226, 1913.
32. GUIMARAES, M. C. S. — Estabilidade das imunoglobulinas de classes G e M em amostras de sangue colhidas em papel de filtro. Comparação com outros modos de preservação de amostras. [Tese de Livre-docência, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1982].
33. JUCA, A. — Cardiopatia chagásica no Ceará. *Méd. Cirurg. Farm.* 159: 399-401, 1949.
34. JUCA, A. & CUNHA, R. V. — Contribuição ao estudo da doença de Chagas no Ceará. *Ceará med.* 29: 36-38, 1950.
35. KELSNER, R. A. — A complement-fixation test for Chagas'disease employing an artificial culture antigen. *Amer. J. Trop. Med.* 16: 405-415, 1936.
36. LACORTE, J. G. — A reação de desvio de complemento na moléstia de Chagas. Rio de Janeiro, Tip. do Inst. Oswaldo Cruz, 1926, 49 p. [Tese]. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 20: 197-224, 1927.
37. LACORTE, J. G. — A reação de Machado na moléstia de Chagas. *Acta méd.* 1: 264-274, 1938.
38. LACORTE, J. G. — A reação de fixação do complemento aplicada à moléstia de Chagas (reação de Machado ou Machado-Guerreiro). *Acta méd.* 10: 87-94, 1942.
39. LOBO, A. G. S. et al. — Contribuição ao conhecimento da distribuição geográfica dos triatomíneos domiciliários e seus índices de infecção natural pelo *S. cruzi* no Estado do Paraná. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 6: 571-587, 1954.
40. LUCENA, D. T. — Estudos sobre doença de Chagas no Nordeste do Brasil. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 22: 3-173, 1970.
41. MUNIZ, J. & FREITAS, G. L. de — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 41: 303-333, 1944.
42. MUNIZ, J. & FREITAS, G. de — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacarídeos de *Schistosoma cruzi* e de outros tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação de complemento e de hipersensibilidade. Os testes de floculação (sublimado e formol-gel). *Rev. bras. biol.* 4: 421-438, 1944.
43. OLIVEIRA, O. V. et al. — Apresentação do primeiro caso autóctone de doença de Chagas diagnosticado no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Saúde Públ. São Paulo* 4: 211-214, 1970.
44. PINOTTI, H. W., referido por MARTINS, A. V. — *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A., 1977, 986 p.
45. PONDÊ, A. et al. — A doença de Chagas na Bahia. *Arq. Univ. Bahia Fac. Méd.* 1: 333-456, 1946.
46. PORTO, C. C. & PORTO, C. — Doença de Chagas no Triângulo Mineiro. *Rev. Goiânia Med.* 8: 21-34, 1962.
47. SALGADO, A. A. & PELLEGRINO, J. — Distribuição geográfica: Inquérito sorológico. In: J. R. CANÇADO (Ed.). *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Impr. Of. Est. Minas Gerais, 1968, pp. 143-162.
48. SALGADO, A. A. & PELLEGRINO, J. — Inquérito Sorológico Escolar sobre a Doença de Chagas no Estado de Minas Gerais. *Proc. 7th Inter. Congr. Med. and Mal.* 2: 260, 1963.
49. SCHLEMPER Jr., B. R.; PIAZZA, R. M. F. & GARCIA, A. C. M. — Soroepidemiologia da doença de Chagas em Santa Catarina. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 16: 196-201, 1983.
50. SHAW, L. et al. — Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Rev. Saúde Públ.* 3: 153-157, 1969.
51. SILVA, L. H. P. da et al. — Doença de Chagas na Paraíba. Inquérito sorológico preliminar. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 8: 281-288, 1956.
52. SIMÕES, A. J. P. — Doença de Chagas no Estado do Paraná, Brasil. Esboço epidemiológico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 39: 279-290, 1943.
53. SOUZA, S. L. & CAMARGO, M. E. — The use of filter paper blood smears in a practical fluorescent test for American trypanosomiasis serodiagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8: 255-258, 1966.
54. STORNI, P. et al. — Reacción de aglutinación directa para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Utilización sistemática del 2-mercaptoethanol para la eliminación de las aglutininas inespecíficas. *Medicina (B. Aires)* 39: 244-248, 1979.
55. VILLELA, E. & BICALHO, J. C. — As pesquisas de laboratório no diagnóstico da moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 16: 13-29, 1923.
56. VILLELA, E. — A ocorrência da moléstia de Chagas nos hospitais de Belo Horizonte e na população de seus arredores. *An. Fac. Med. Univ. Minas Gerais* 1: 1-18, 1930.
57. UPDYKE, E. L. & CONROY, E. — Clarification of serum for storage in liquid or lyophilic state. *J. Bact.* 72: 277-278, 1956.

Recebido para publicação em 20/3/1984.