

OBSERVAÇÕES SÔBRE OS TESTES DE FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO E IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA EM DOENÇA DE CHAGAS

Fausto Gonçalves de ARAUJO⁽¹⁾ e Sebastião Mariano BATISTA⁽²⁾

RESUMO

Testes de Fixação de Complemento (FC') e de Imunofluorescência indireta (IF) foram realizados em 1019 amostras de sôro colhidas no banco de sangue e enfermarias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da U.F.M.G., com a finalidade de comparar a eficácia das duas reações no diagnóstico auxiliar da Doença de Chagas, fase crônica. Entre os doadores de sangue o percentual de reativos foi de 2,8%. O teste de IF foi mais eficiente, tendo revelado todos os positivos geralmente com apenas uma reação, ao passo que a reação de FC' necessitou ser repetida em muitos casos. Todos os soros impeditores ou duvidosos à reação de FC' definiram-se em positivos ou negativos já na primeira reação de IF, mostrando que tal problema não existe nesta última. A reação de IF também mostrou-se mais sensível desde que foi capaz de evidenciar títulos positivos em diluições bem mais altas que os observados no teste de FC'.

INTRODUÇÃO

Sendo a Doença de Chagas uma endemia das mais importantes em nosso país, o estudo de meios que facilitem o reconhecimento rápido e eficiente de indivíduos infetados é de grande valor, não só para um melhor conhecimento da doença como também para estabelecer melhores meios de prevenção. Isto se torna particularmente relevante quando se considera dados relativos à transmissão do *Trypanosoma cruzi* através de transfusões de sangue^{2, 14, 17, 19, 20, 21}.

Desde o trabalho inicial de GUERREIRO & MACHADO¹⁶ tem sido a reação de fixação de complemento (RFC') de utilidade incontestável no diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas¹³. Todavia, mesmo com a grande variedade de antígenos utilizados^{1, 4, 9, 11} e técnicas desenvolvidas^{12, 18}, a reação de fixação de complemento ainda deixa a desejar, principalmente em decorrência da instabilidade e da facilidade na alteração de al-

guns de seus componentes. Estas dificuldades atingem tais proporções que impedem a realização da RFC' em laboratórios de recursos limitados em regiões onde a sua necessidade é mais premente, como, por exemplo, em bancos de sangue localizados em zonas endêmicas remotas².

Um dos primeiros trabalhos empregando a reação de Imunofluorescência (RIF) ao diagnóstico da moléstia de Chagas foi realizado por FIFE & MUSCHEL¹⁰ que obtiveram resultados muito promissores embora utilizassem o chamado método úmido, atualmente não mais usado. A seguir com a introdução de técnicas mais precisas, vários estudos relativos ao emprêgo desta reação foram surgindo. Assim temos os trabalhos de SADUN & col.²³, VOLLER²⁵, ROMAÑA²² e BIAGI & col.⁵. Com referência aos Autores nacionais cumpre salientar os trabalhos de CAMARGO⁶ e VIEIRA²⁴. CAMARGO introduziu

Trabalho da Cadeira de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Catedrático: Prof. Amílcar Vianna Martins

(1) Assistente da Cadeira de Parasitologia

(2) Assistente da Cadeira de Parasitologia e Centro de Pesquisas "René Rachou", Instituto Nacional de Endemias Rurais, Belo Horizonte, Brasil

modificações técnicas no preparo do antígeno e na realização do teste tornando-o mais prático. Em aproximadamente 1.000 reações obteve resultados plenamente satisfatórios com referência à concordância da RIF com a RFC'. VIEIRA, em uma de suas conclusões, estabeleceu que: "no que se refere a antígenos periféricos (de membrana) do *T. cruzi*, os resultados mostraram que a reação indireta de fluorescência é mais sensível e mais específica para o diagnóstico da moléstia de Chagas do que a reação de fixação de complemento com antígeno benzeno-cloroforado".

GIROLA & col.¹⁵, em trabalho recente, encontraram concordância ao redor de 98% entre a RIF e a RFC'.

O presente trabalho teve por finalidade apresentar uma contribuição ao estudo da eficácia do teste de IF em relação à RFC'; verificar o comportamento na RIF de soros duvidosos e anticomplementares à RFC' e, como elementos adicionais, apresentar dados relativos à sensibilidade dos testes e resultados referentes ao percentual de indivíduos portadores da infecção chagásica, evidenciada pela sorologia, entre os doadores de sangue do banco de sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros — Foram empregados neste estudo 1.019 amostras de soro, sendo 557 provenientes do Banco de Sangue e 462 de diversas enfermarias, as quais eram encaminhadas ao Departamento de Parasitologia para a realização do teste de GUERREIRO & MACHADO como auxiliar de rotina para o diagnóstico da doença de Chagas. Todos os soros foram utilizados no mesmo dia de seu recebimento ou, no máximo, 24 horas após, sendo que neste caso eram mantidos congelados a -20°C . Todas as amostras foram inativadas a 56°C durante 30 minutos pouco antes de serem submetidas aos testes.

Antígeno para a RIF — Utilizamos uma cepa de *Trypanosoma cruzi* mantida em temperatura ambiente em meio de "Liver infusion Tryptose" modificado. Este meio é líquido e proporciona abundante crescimento.

Culturas jovens de até uma semana eram centrifugadas a 1.400 rpm, 10 minutos e o sobrenadante separado. O sedimento contendo as formas culturais era resuspenso em solução salina a 0,87% de NaCl adicionada de 0,1% de formol. Em continuação o material era lavado por centrifugação e o sedimento final resuspenso em salina a 0,85%. Em lâminas de pequena espessura previamente lavadas marcávamos 4 círculos de um centímetro de diâmetro cada, com auxílio de esmalte de unhas. Em cada círculo era colocada uma gota da suspensão de critídias diluída em salina de maneira a fornecer aproximadamente 200 formas culturais por campo microscópico de ocular $15\times$ e objetiva $10\times$. A seguir as lâminas eram postas a secar sob ventilador, enroladas em papel alumínio e colocadas em frasco fechado mantido à temperatura de -20°C . Pudemos observar que o antígeno assim conservado permanece em boas condições até 3-4 meses após o seu preparo, todavia, para este trabalho a cada 10 dias preparávamos nova partida.

Conjugado antiglobulina humana — Este reagente foi preparado através de imunização de coelho e de acordo com a técnica estabelecida por CHERRY & col.⁸. O excesso de isotiocianato de fluoresceína foi retirado através de diálise em salina tamponada com fosfatos de pH 7,2. O conjugado obtido foi conservado em temperatura de -20°C e antes de seu uso foi absorvido em pó de fígado de suíno. A titulação final mostrou-se ativo na diluição de 1:15.

Equipamento de microscopia fluorescente — Foi utilizado durante todo o trabalho um microscópio monocular Zeiss Jena munido de ocular $15\times$ e objetivas $10\times$ e $40\times$ e condensador de campo escuro. Como fonte de luz ultravioleta utilizou-se equipo Zeiss Jena provido de lâmpada Osram HB0200. Como filtros excitadores e de barreira foram utilizados BG12/2 g e OG1 Zeiss, respectivamente.

Técnica da RIF — Todos os soros foram submetidos à RIF a partir da diluição de 1:45. Esta diluição inicial é necessária e suficiente para que se evite fenômenos de reações cruzadas com outras afecções, prin-

cialmente as causadas por outros protozoários flagelados, de acordo com nossas observações³ e de CERISOLA⁷. Alguns soros que apresentaram-se positivos nesta diluição inicial foram, posteriormente, diluídos a partir de 1:64 até 1:1.024 para comparação de sensibilidade com o teste de FC'.

A seqüência da RIF foi a seguinte:

1) Tratar o antígeno pelo soro diluído durante 30 minutos, em câmara úmida a 37°C.

2) Lavar as lâminas com salina tamponada pH 7,2 durante 5 minutos e a seguir com água destilada.

3) Secar as lâminas sob ventilador e tratá-las pelo conjugado antiglobulina humana diluído na proporção adequada em salina tamponada de pH 7,2 adicionada de 2% de "Tween 80".

4) Conservar as lâminas em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

5) Repetir as lavagens segundo o item 2.

6) Secar as lâminas e tratá-las pelo Azul de Evans diluído a 1:5.000 em salina tamponada, durante 10 minutos em temperatura ambiente.

7) Lavar as lâminas rapidamente em água corrente, secar e montar, tendo como líquido de montagem uma solução de 9 partes de glicerina e uma parte de salina tamponada de pH 8.

8) Examinar as lâminas ao microscópio de fluorescência o qual tenha sido previamente ligado e deixado pelo menos 10 minutos até que a radiação ultravioleta tenha atingido o ponto ideal para observação.

Antígeno para a RFC' — Empregamos o antígeno preparado por extração pelo álcool metílico, segundo técnica de BATISTA & SANTOS⁴.

Técnica da RFC' — Tanto nas reações qualitativas como nas quantitativas utilizamos a técnica de Kolmer modificada. Como a maneira de se avaliar a concentração de anticorpos na RIF foi a diluição do soro, julgamos que, para obter uma comparação

razoável entre os dois testes, a mesma manobra seria a mais indicada na RFC'. Nesta, era considerada a diluição final, ou seja, a diluição do soro após o acréscimo dos demais componentes.

RESULTADOS

Das 557 amostras de soro recebidas do Banco de Sangue, 16 mostraram-se positivas e das 462 obtidas nas diversas Clínicas o número de reativos foi de 117 (Quadro I).

QUADRO I

Número de soros examinados e percentual de positivos para doença de Chagas evidenciados pelas reações de FC' e IF

Banco de Sangue	N.º de soros examinados	N.º de soros positivos	%
	557	16	2,8
Clínicas	462	117	25,3
Total	1019	133	13,05

As reações de IF e FC' foram realizadas simultaneamente com a mesma amostra de soro. Em alguns casos houve divergência de resultados. Quando isto ocorria repetiamos as reações cuidadosamente, procurando evitar todo erro técnico possível, com a finalidade de se conseguir concordância de resultados.

Doze soros apresentaram resultados duvidosos na primeira RFC', tornando-se necessária a sua repetição com nova amostra de soro. Geralmente o resultado definiu-se na segunda reação embora em uma amostra tenha sido necessário um terceiro teste para esclarecimento definitivo, como é mostrado no Quadro II. Ainda neste quadro verificamos que, de uma maneira geral, tôdas as reações duvidosas na FC' apresentaram resultado definido já na primeira reação de IF. Duas amostras necessitaram um segundo teste de IF, isto decorrendo de um defeito técnico como comentaremos adiante.

Dez soros impedientes ao primeiro teste de FC' definiram-se em positivos e negativos

QUADRO II

Comportamento de alguns soros duvidosos ao 1.º teste de FC' em relação a um segundo teste e à reação de IF

Soro N.º	Reação de FC'		Reação de IF	
	1.º teste	2.º teste *	1.º teste	2.º teste *
6	D	P	P	P
19	D	P	P	P
36	D	P	P	P
65	D	N	N	N
67	N	N	D	N
90	D	P	P	P
93	D	P	P	P
167	D	N	N	N
178	D	N	N	N
407	D	N	N	N
413	D	N	N	N
605	D	N	D	N
827	D	N	N	N

* Testes realizados com amostras diferentes de soro
 D = Duvidoso
 P = Positivo
 N = Negativo

QUADRO III

Comportamento de alguns soros impeditentes ao 1.º teste de FC' em relação a um segundo teste e à reação de IF

Soro N.º	Reação de FC'		Reação de IF	
	1.º teste	2.º teste *	1.º teste	2.º teste *
281	I	P	P	P
357	I	P	P	P
402	I	N	N	N
415	I	P	P	P
664	I	P	P	P
739	I	P	P	P
874	I	P	P	P
876	I	P	P	P
895	I	P	P	P
980	I	P	P	P

* Realizado com amostra diferente de soro
 I = Impediente
 P = Positivo
 N = Negativo

após uma segunda reação realizada com nova amostra de soro. Entretanto, tôdas as amostras impeditentes já haviam se definido na primeira RIF (Quadro III).

Em cinco amostras discordantes realiza-se testes seriados com ambas as reações, bem como o xenodiagnóstico nos pacientes. Os resultados são mostrados no Quadro IV.

QUADRO IV

Seqüência de reações realizadas em amostras de soro de resultados discordantes no 1.º teste de FC' e IF, e xenodiagnóstico no respectivo paciente

Soro N.º	Reação de FC'			Reação de IF			Xenodiagnóstico
	1.ª	2.ª *	3.ª *	1.ª	2.ª *	3.ª *	
152	N	N	P	P	P	P	P
369	N	P	—	P	P	—	N
485	N	N	P	P	P	P	P
490	N	P	—	P	P	—	N
778	N	P	—	P	P	—	N

* Realizadas com amostras diferentes de soro
 N = Negativo
 P = Positivo
 — = Não realizada

QUADRO V

Sensibilidade das reações de FC' e IF em Doença de Chagas através da diluição do soro

Reação	Diluição							Total
	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
RFC'	12	14	6	15	4	0	0	51
RIF	—	—	4	20	13	9	5	51

— = Não realizada nesta diluição

Em 51 amostras positivas em ambas as reações realizamos testes quantitativos através da diluição do soro (Quadro V).

DISCUSSÃO

A reação de FC' para o diagnóstico da Doença de Chagas embora tenha tido a sua especificidade bem comprovada ainda apresenta, tanto na sua realização como interpretação, alguns inconvenientes. Dentre estes podemos citar o número de componentes facilmente alteráveis e o fato, comprovado, de que indivíduos parasitados pelo *T. cruzi* podem apresentar resultado negativo, havendo necessidade de mais de uma reação para que se evidencie a positividade. Nossos resultados reafirmam este fato o qual tem repercussões principalmente em Bancos de Sangue. Considerando esse pormenor verificamos que a RIF apresenta vantagens sobre a RFC' desde que aponta, logo na primeira reação, praticamente todos os soros reativos. Quando se considera então as reações duvidosas e impeditivas à RFC' é que podemos verificar com maior clareza o poder de definição da RIF. No teste qualitativo comumente realizado em todos os laboratórios não muito especializados e desprovidos de meios para o teste mais preciso de 50% de hemólise, as reações duvidosas e impeditivas são frequentes e muitas vezes originadas por fatores que independem da técnica empregada ou do manuseio dos reagentes. Geralmente para se esclarecer uma reação duvidosa ou impeditiva torna-se necessário a realização de pelo menos um outro teste com amostra diferente de soro. Isso acarreta dificulda-

des no diagnóstico correto e no emprêgo do sangue, em se tratando de Banco de Sangue.

Em nossas observações, de um total de 22 amostras de resultado duvidoso ou impeditivo à RFC' somente uma ficou indefinida na primeira RIF. Como foi observado e relatado por vários Autores^{6, 7, 15} o preparo do antígeno tem importância fundamental na realização da RIF, sendo isto também comprovado por nós. Verificamos que as culturas devem ser jovens, não devem conter fragmentos ou grumos e, principalmente, o número de formas culturais sobre a lâmina deve ser adequado.

Esfregaços contendo número elevado de formas culturais, transformando-se em massa aglomerada, são sujeitos a causar resultado duvidoso, provavelmente em decorrência de uma pequena autofluorescência das críptídias, acentuada pela confluência e superposição. Este fato foi o responsável pelas duas reações duvidosas de IF mostradas no Quadro III.

Tudo indica, pois, que os fatores que influenciam no resultado da RFC' tornando-a duvidosa ou impeditiva não tem nenhuma participação na alteração dos resultados referentes ao teste de IF.

Cinco pacientes, cujo soro mostrou resultado positivo na RIF e negativo na RFC', puderam ser submetidos ao xenodiagnóstico. Em dois deles foi comprovado o parasitismo pelo *T. cruzi* embora a RFC' tenha se mostrado negativa em dois testes, positivando-se somente no terceiro. Um dos soros (152) era proveniente de indivíduo adulto, masculino, sem qualquer queixa clínica. Tal pacien-

te já havia sido submetido ao teste de GUERREIRO-MACHADO em várias localidades, sempre com resultados disparatados, ora positivo ora negativo. Era habitual doador de sangue. Outro soro (485) era proveniente de indivíduo adulto, feminino e internado no Hospital com manifestações coreiformes, desnutrição e edema de membros inferiores. Os primeiros testes de FC' e IF foram realizados logo após o internamento, os segundos após transcorridos 9 dias e o terceiro teste de FC' foi realizado 16 dias após, com a paciente estando em franca recuperação. Imaginamos que os testes negativos de FC' fossem decorrentes do extremo estado de fraqueza da paciente, com conseqüente diminuição ou interferência na taxa de anticorpos fixadores de complemento. É interessante assinalar que o teste de IF mostrou-se positivo logo na primeira reação, sugerindo que os fatores que alteraram o resultado da FC' não interferiram na IF.

Com base nos dados obtidos através da diluição dos soros achamos que o teste de IF é capaz de detetar a presença de quantidades pequenas de anticorpos circulantes. O título máximo encontrado na RFC' foi de 1:256, sendo que 26 soros não ultrapassaram o título de 1:32, o qual não representa nem a diluição da qual se parte para o teste de IF. Neste teste 5 soros atingiram a diluição de 1:1.024 e em algumas observações posteriores temos encontrado títulos de 1:2.000 ou mais. Este fato poderia fornecer meios para interpretação dos achados representados pela FC' negativa, IF positiva e xenodiagnóstico positivo. Sabemos que a presença de tripanosomas circulantes em indivíduos com Doença de Chagas crônica é cíclica e isto deve depender da presença de anticorpos em quantidades suficientes para possibilitar tal fenômeno. A taxa de anticorpos bem reduzida com conseqüente FC' negativa permite a invasão do sangue pelos tripanosomas que irão estimular novamente a elevação da taxa de anticorpos permitindo a positividade da RFC'. A IF, como vimos, é capaz de evidenciar quantidades reduzidas de anticorpos e assim sendo não seria influenciada.

O percentual de 2,8% de positivos em doadores de sangue não mostrou nenhuma variação apreciável com relação aos dados assinalados por outros Autores.

A dificuldade técnica do teste de IF reside principalmente na obtenção de um conjugado específico. Não vemos dificuldade no preparo desse reagente em laboratórios bem equipados, acrescentando-se, ainda, que já existem à venda ótimos conjugados. A realização do teste é simples e não acarreta problemas e sua leitura e interpretação é facilmente conseguida com pouca prática. O equipamento pode ser bastante simples, é de fácil montagem e de preço acessível.

Concluindo, acreditamos poder afirmar que o teste de IF para o diagnóstico da doença de Chagas é bem mais sensível e muito menos sujeito que a RFC' a fatores capazes de causar erro tanto na leitura como na interpretação dos resultados. Assim a RIF deve ser empregada sempre que as condições forem propícias.

S U M M A R Y

Observations on the complement fixation and indirect immunofluorescent tests on Chagas' disease

Complement Fixation (C'F) and indirect Immunofluorescent (IF) tests were performed on 1019 serum samples from blood bank and clinics of the "Hospital das Clínicas", Faculty of Medicine U.F.M.G., Brasil.

I was found that 2.8% of the donors gave positive reactions. The IF test was more effective since it showed all positives with only one test, while with the C'F test it was necessary to repeat one or more times to detect reaction. Anticomplementary and doubtful results were found on 22 C'F samples, but on the IF test these results were not observed, suggesting that this problem does not exist in the latter test. Quantitative reactions using diluted serum showed 1:256 as the highest titer on the C'F test and 1:1024 on the IF which indicated this test as more sensitive. The IF test is therefore the test of choice to detect antibodies against *T. cruzi* in blood banks samples because of the absence of anticomplementary and doubtful results, a higher degree of sensitivity and the use of fewer alterable reagents.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, J. O. de; FREITAS, J. L. P. & BRANDÃO, H. — Complement fixation test with a triple antigen for siphylis, tuberculosis, leprosy and Chagas' disease in blood banks. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 3:490-494, 1954.
2. AMATO Neto, V.; DOLES, J.; RASSI, A.; BORGES, A. P.; REZENDE, J. M. & GOMES, M. C. O. — Relato de novos casos de transmissão de Doença de Chagas por transfusão de sangue. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:46-51, 1968.
3. ARAÚJO, F. G. & MAYRINK, W. — Fluorescent antibody test in Visceral leishmaniasis. II — Studies on the specificity of the test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 10:41-45, 1968.
4. BATISTA, S. M. & SANTOS, U. M. — Antígeno metilico de cultura de *T. cruzi*. *Hospital (Rio)* 56:175-184, 1959.
5. BIAGI, F.; TAY, J. & MURRAY, R. M. — La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 57:237-240, 1964.
6. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:227-234, 1966.
7. CERISOLA, J. A. — *Teste de imunofluorescencia para diagnóstico de la enfermedad de Chagas*. Secretaria de Estado de Salud Publica. Laboratorio Sanitario "Dr. Mario Fatała Chabem". Buenos Aires, Argentina. (Técnica mimiografada).
8. CHERRY, W. B.; GOLDMAN, M. & CARSKI, T. R. — Fluorescent antibody techniques. U. S. Public Health Service Publication n.º 729. Atlanta, Communicable Disease Center, USA, 1960.
9. DAVIS, D. J. — An improved antigen for complement fixation in American Trypanosomiasis. *Public Health Rep.* 58:775-777, 1943.
10. FIFE, B. H. & MUSCHEL, L. H. — Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *T. cruzi* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:540-542, 1959.
11. FREITAS, J. L. P. de — *Contribuição para o diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório*. Tese. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1947, 160 págs.
12. FREITAS, J. L. P. de — Reação de fixação de complemento para o diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. *Arg. Hig. Saúde Pública* 16:55-94, 1951.
13. FREITAS, J. L. P. de — Diagnóstico de laboratório da Moléstia de Chagas. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 51:429-438, 1961.
14. FREITAS, J. L. P. de; BIANCALANA, A.; AMATO Neto, V.; NUSSENZWEIG, V.; SONTAG, R. & BARRETO, J. G. — Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev. Paul. Med.* 40:36-40, 1952.
15. GIROLA, R. A.; MARTINI, G. W. & MILIC, A. — La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas-Mazza. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.* 64:130-136, 1968.
16. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet-Gengou na moléstia de Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Médico* 27:225-226, 1913.
17. JATINE, A. D. & JACOMO, R. — Doença de Chagas e transfusão de sangue. *Rev. Goiana Med.* 5:23-30, 1959.
18. KNIERIM, F. — Técnica de la reacción de fijación de complemento según el método de 50% de hemolisis de Bozicevich aplicada al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chile. Parasit.* 13:75-78, 1958.
19. PELLEGRINO, J. — Doença de Chagas e transfusão de sangue. *Rev. Brasil. Malar. Doenças Trop.* 11:697-706, 1959.
20. PELLEGRINO, J.; BORROTCHIN, M.; LEITE, G. & BRENER, Z. — Inquérito sobre doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 49:555-564, 1951.
21. REZENDE, J. M.; ZEPPELLI, W. & BAFUTTO, M. G. — O problema da transmissão da Doença de Chagas por transfusão de sangue. Emprego da violeta de genciana como medida profilática. *Rev. Goiana Med.* 11:35-47, 1965.
22. ROMAÑA, C. — Adaptación del método de inhibición de inmunofluorescencia de Goldman al diagnóstico de enfermedad de Chagas. *Rev. Soc. Argent. Biol.* 39:128, 1963.
23. SADUN, E. H.; DUXBURY, R. E.; WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American Trypanosomiasis in man. *J. Parasit.* 49:385-388, 1963.
24. VIEIRA, R. R. — *Estudo comparativo das reações de imunofluorescência e de fixação de complemento na Moléstia de Chagas*. Tese. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1967, 92 págs.
25. VOLLER, A. — Immunofluorescent observations on *T. cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 57:232, 1963.

Recebido para publicação em 13/9/1968.