

## IMUNODIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS. EVOLUÇÃO SOROLÓGICA DE PACIENTES COM DOENÇA DE CHAGAS

José Alberto CERISOLA <sup>(1)</sup>, Manuel ALVAREZ <sup>(1)</sup> e Ana Maria De RISSIO <sup>(1)</sup>

### RESUMO

1) Efetuou-se um estudo longitudinal em 601 pacientes com Doença de Chagas em fase aguda; 2) Os pacientes foram divididos em 2 grupos: a) 550 pacientes tratados com Bay 2.502 durante 3 meses; b) 51 pacientes que receberam placebo; 3) As provas sorológicas de reação de fixação do complemento (RFC), reação de hemaglutinação (RHA) e teste de imunofluorescência (TIF), foram praticados mensalmente durante os 6 primeiros meses e em seguida trimestralmente, até os 24 meses; 4) No total foram praticadas 3.068 RFC, 3.182 RHA e 3.139 TIF; 5) Durante o primeiro mês observou-se aumento da positividade das três reações, tanto no grupo que recebeu Bay 2.502 como no que recebeu placebo; 6) Ao segundo mês produziu-se grande queda da positividade no grupo tratado com a droga. Esta queda acentuou-se e manteve-se nos meses seguintes. A positividade, ao 2.º ano de observação, foi de 13% para RFC, 14,7% para RHA e 22% para TIF; 7) No grupo placebo o aumento da positividade das reações foi constante e alcançou 100% aos 6 meses, e daí em diante a sensibilidade para a RFC oscilou em torno de 90%, para RHA em 95% e 100% para TIF; 8) O estudo individual para cada paciente tratado revelou que 81% mostraram negatividade persistente pós-terapêutica até os 24 meses de observação. Deve-se aceitar que o tratamento logrou curá-los do ponto de vista do imunodiagnóstico. Nos 19% restantes, observou-se positividade em alguns casos por fracasso do medicamento, em outros, somente por ação supressiva da droga, e em outros, talvez por reinfeção.

### INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* pode ser considerado um dos protozoários mais ricamente antigênicos. A infecção por ele produzida, determina no hospedeiro mamífero o aparecimento de vários tipos de anticorpos. Este fenômeno deu origem aos diversos métodos sorológicos aplicados ao diagnóstico da doença de Chagas.

Preconizaram-se numerosas técnicas imunodiagnósticas e, atualmente, utilizamos rotineiramente: a reação de fixação do complemento (RFC), a reação de hemaglutinação (RHA) e o teste de imunofluorescência (TIF).

O estudo sorológico seriado dos pacientes com período agudo conhecido, diagnosticados clínica e parasitológicamente, permite estabelecer a sensibilidade dos 3 métodos em cada uma das etapas evolutivas da infecção e além disso, serve também para avaliar a eficácia da terapêutica ensaiada.

A presente investigação foi organizada pela Secretaria de Estado de Saúde Pública de Nación e iniciada em agosto de 1966.

(1) Instituto de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben". Secretaria de Estado de Salud Pública de la Nación, Buenos Aires, Argentina. Av. Ingeniero Huergo 690

#### MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo se efetuou em 601 pacientes a partir do momento em que se verificou o diagnóstico clínico da Doença de Chagas aguda, confirmado, e em todos os casos pela observação do *T. cruzi* mediante métodos parasitológicos diretos. Durante os 24 meses seguintes ao diagnóstico, examinaram-se periodicamente amostras de soro, realizando-se simultaneamente a RFC, a RHA e o TIF. Os 601 pacientes foram divididos em dois grupos: 51 que receberam placebo e 550 que foram tratados com Bay 2.502 durante 90 dias em dose média de 15 mg/kg de peso. O Bay 2.502 é um derivado nitrofurilidênico.

As amostras de sangue foram colhidas no lugar onde foram atendidos os pacientes, mensalmente, durante os 6 primeiros meses e depois trimestralmente. Separou-se o soro e as amostras congeladas foram enviadas ao Instituto "Dr. Mario Fatała Chaben", por via aérea em recipientes térmicos confeccionados para esse fim. O material chegou em perfeitas condições de conservação e praticamente não houve necessidade de excluir soros por contaminação ou por hemólise. Em 24 meses de trabalho foram recebidas 3.357 amostras de soro.

Para os efeitos desta investigação consideraram-se apenas os resultados de valor categoricamente diagnóstico, ou seja, reações positivas e negativas para cada uma das três provas. Reações duvidosas e anticomplementares não foram levadas em conta.

Foi obtido o seguinte número de reações diagnósticas: 3.068 RFC, 3.182 RHA e 3.139 TIF, o que perfaz um total de 9.389 reações praticadas.

O grupo de pacientes com doença de Chagas aguda que recebeu placebo serviu como padrão e permitiu avaliar as diferenças de positividade de cada um dos três métodos comparando-os aos resultados obtidos nos pacientes tratados com Bay 2.502.

Deve-se assinalar que as amostras dos pacientes que receberam placebo, como as dos

que foram tratados com Bay 2.502, foram estudadas desconhecendo-se sua identificação ou procedência e os resultados dos diferentes métodos foram informados separadamente para cada amostra.

As técnicas empregadas foram:

- 1) *Reação de fixação do complemento (RFC)*, processo de EACLE<sup>9</sup> modificado por DEFFIS<sup>8</sup> e adaptado por CERISOLA & ROSENBAUM<sup>4</sup>. É o método mais simples de fixação do complemento, embora não tão perfeito quanto as modernas técnicas com hemólise de 50%. Deu-se preferência a esta técnica devido à sua ampla difusão em nosso país e seu emprêgo na rotina diária de bancos de sangue e inquéritos epidemiológicos.
- 2) *Reação de Hemaglutinação (RHA)*, técnica baseada nos trabalhos de BOYDEN<sup>2</sup> e STAVITZKY<sup>16</sup> praticada segundo preconizam JACOB & LUNDE<sup>13</sup> para toxoplasmose. Começamos a utilizar este método em 1962 para doença de Chagas (CERISOLA & col.<sup>5</sup>). Atualmente pratica-se como um método de "screening" em uma policubeta tipo Kline com leitura direta da aglutinação formada (similar à leitura dos grupos sanguíneos) (LÁZZARI<sup>15</sup>). Quando se deseja conhecer o título de um soro efetuam-se as diluições do mesmo utilizando o micrométodo em KNIERIM & SAAVEDRA<sup>14</sup>. Este processo quantitativo é mais prático que o método das diluições em tubos. No presente trabalho consideraram-se positivas aquelas reações que mostraram aglutinação com o método qualitativo e um título superior a 1:16 com o método quantitativo.
- 3) *Teste de imunofluorescência (TIF)*, método indireto, praticado em culturas contendo antígenos de *T. cruzi* com técnica própria (ALVAREZ & col.<sup>1</sup>). O processo é similar ao preconizado por GIROLA & col.<sup>11</sup>, CAMARGO<sup>3</sup> e deriva do trabalho de FIFE JR. & MUSCHEL<sup>10</sup>. Foram con-

CERISOLA, J. A.; ALVAREZ, M. & De RISSIO, A. M. — Imunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução sorológica de pacientes com doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 12: 403-411, 1970.

siderados positivos os soros com títulos de 1:30, ou superiores. Adotou-se êste critério para evitar algumas reações inespecíficas que podem ser observadas em diluições menores.

RESULTADOS

Os resultados gerais obtidos foram reunidos: a) Segundo o momento evolutivo da doença. Esta forma permite conhecer a percentagem de positividade que mostrou cada um dos três métodos em cada uma das etapas da doença, iniciando-se o estudo no momento do diagnóstico clínico e parasitológico do quadro agudo. Apresentaram-se, separadamente, os resultados do grupo placebo (Tabela I e Fig. 1) e do grupo tratado (Tabela II e Fig. 1); b) Segundo os diferentes tipos de curvas de evolução sorológica que se observaram no grupo dos pacientes tratados. Estas curvas foram feitas em 232 pacientes que chegaram a ser controlados até um tempo máximo entre 18 a 24 meses (Fig. 2). Foram considerados positivos os que mostraram tal resultado simultaneamente com os três métodos (RFC, RHA e TIF) e para os negativos adotou-se igual critério, isto é, que do ponto de vista

sorológico não havia dúvidas sobre o diagnóstico das amostras. Os resultados discordantes não foram considerados.

A Tabela II e a Fig. 2 mostram os resultados sorológicos dos pacientes tratados, tabulados segundo a fase evolutiva. As amostras do dia 0 correspondem ao momento em que se efetuou o diagnóstico clínico e o achado do parasita no sangue periférico. Seus resultados são prévios à administração da droga (sorologia inicial pré-terapêutica no grupo de pacientes estudados). Na Tabela II, resume-se o número de resultados diagnosticados (positivos e negativos) obtidos com os três métodos em cada lote de amostras de igual evolução cronológica, enquanto que na Fig. 1 projetam-se as curvas das percentagens de reações positivas obtidas em cada período.

No 2.º ano de controle dos pacientes pôde-se praticar um xenodiagnóstico com 44 ninfas de 3.º estágio de *Triatoma infestans* a 87 placebos e tratados (Tabela III).

De 23 placebos, 14 mostraram xenodiagnóstico positivo, 60,9%, cifra que aproximadamente representa a sensibilidade do xenodiagnóstico no período crônico da doença. Os pacientes tratados foram divididos em dois grupos: o primeiro corresponde aos que mostraram negatividade sorológica persistente

TABELA I

Evolução sorológica de 15 pacientes não tratados

Reação	Resultado	Meses após o diagnóstico										
		0	1	2	3	4	5	6	9	12	18	24
% RFC	Total	40	35	32	36	26	13	15	30	13	27	14
	Positivos	14	22	23	30	24	12	15	27	12	24	13
	Positividade	35,0	62,9	71,9	83,3	92,3	92,3	100	90,0	92,3	88,9	92,9
% RHA	Total	47	35	36	36	27	14	15	32	19	30	16
	Positivos	13	17	18	30	23	14	15	30	19	29	15
	Positividade	27,7	48,6	50,0	83,3	85,2	100	100	93,8	100	96,7	93,8
% TIF	Total	43	37	34	34	27	14	15	31	19	30	16
	Positivos	31	33	33	33	27	14	15	30	19	30	16
	Positividade	72,1	89,2	97,1	97,1	100	100	100	96,8	100	100	100

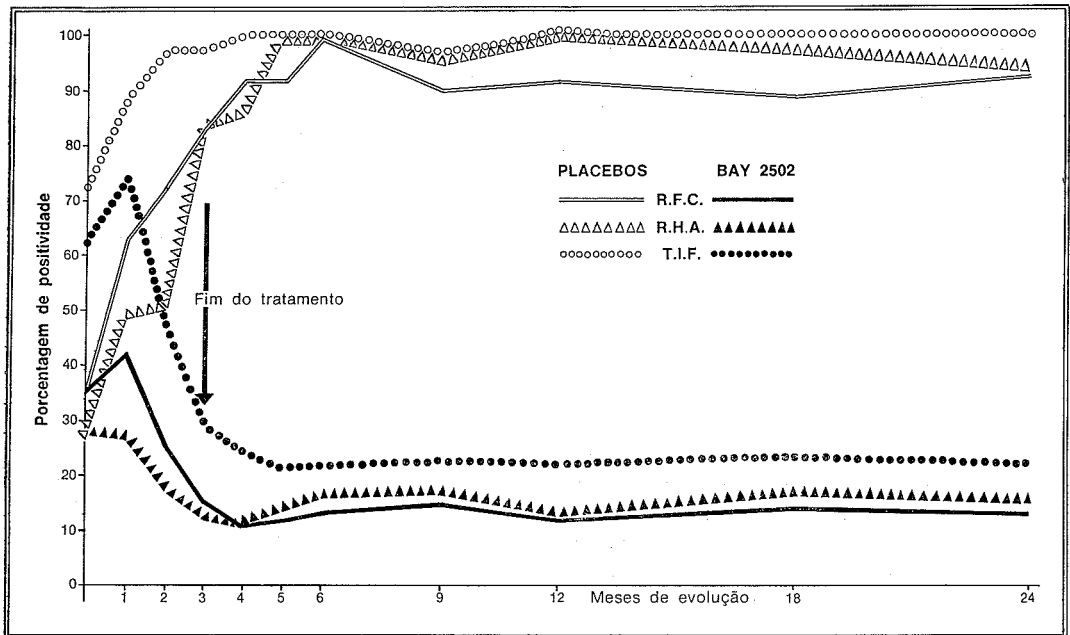


Fig. 1 — Evolução sorológica em pacientes chagásicos agudos tratados com Bay 2502 ou com placebo

TABELA II  
Evolução sorológica de 505 pacientes tratados com Bay 2502

Reação	Resultado	Meses após o diagnóstico											
		0	1	2	3	4	5	6	9	12	18	24	
% RFC	Total	407	322	330	277	272	134	103	293	205	275	169	
	Positivos	142	136	83	43	29	16	14	43	21	38	22	
	Positividade	34,9	42,2	25,6	15,5	10,7	11,9	13,6	14,7	10,2	13,8	13,0	
% RHA	Total	429	350	335	285	276	135	106	299	211	279	170	
	Positivos	121	97	58	35	28	18	16	46	25	44	25	
	Positividade	28,2	27,7	17,3	12,3	10,1	13,3	15,1	15,4	11,8	15,8	14,7	
% TIF	Total	423	345	332	266	272	135	106	303	206	278	173	
	Positivos	264	255	155	79	66	29	23	67	45	65	38	
	Positividade	62,4	74,0	46,7	29,7	24,3	21,5	21,7	22,1	21,8	23,4	22,0	

(curvas "A" e "B"), o segundo àqueles que mostraram positividade sorológica. Nos 55 xenodiagnósticos praticados no primeiro grupo não se observou nenhum positivo. É significativo o fato da negatificação da sorologia com o desaparecimento dos parasitas circulantes evidenciados pelo xenodiagnóstico.

#### DISCUSSÃO

A análise da Tabela I e Fig. 1 permite determinar: a) a sensibilidade das três técnicas sorológicas descritas; b) a duração da etapa pré-sorológica da doença para cada método utilizado.

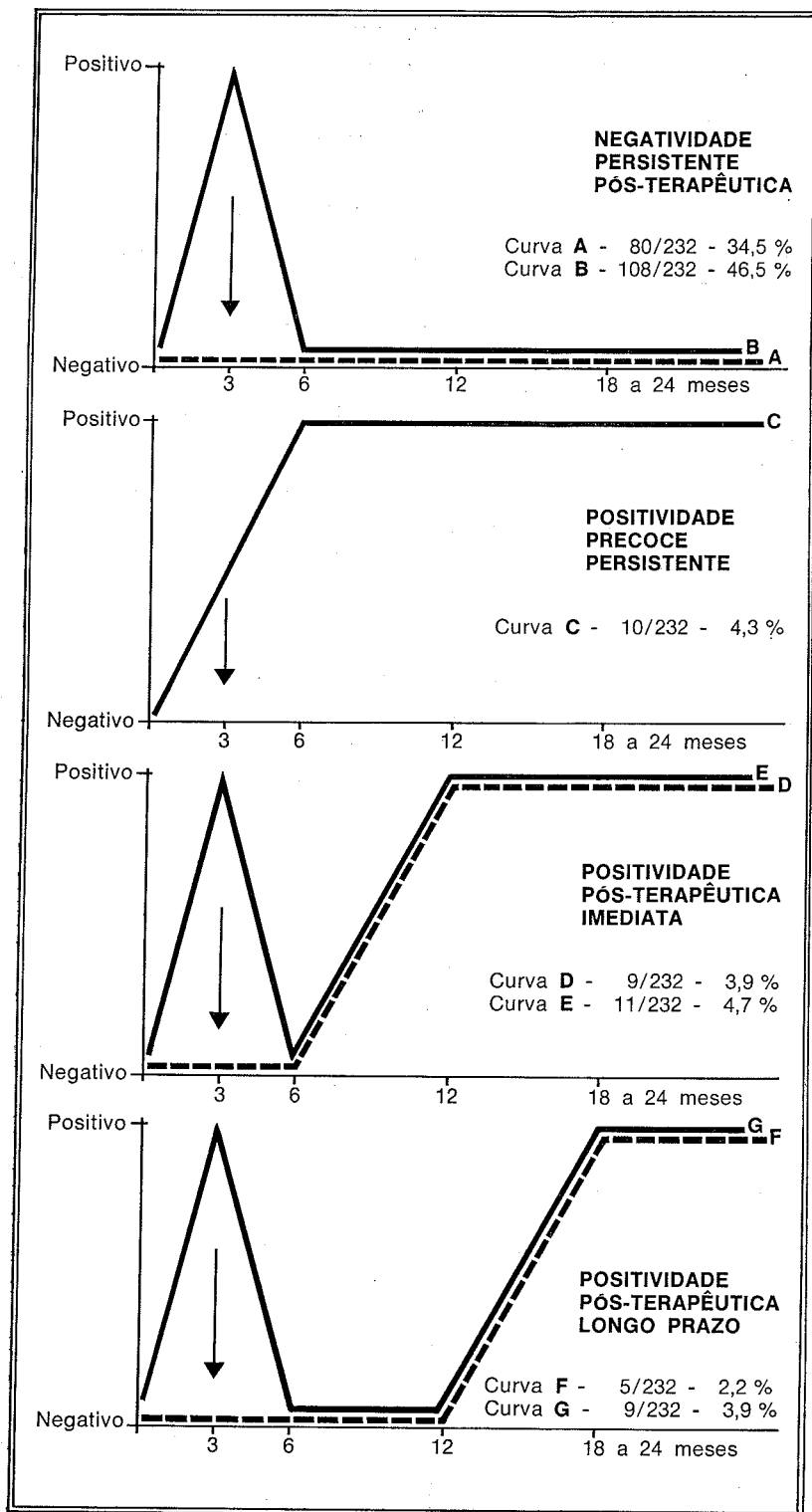


Fig. 2 — Curvas individuais de evolução sorológica dos pacientes tratados.

TABELA III

Resultado do xenodiagnóstico praticado em 87 pacientes no 2.º ano de contróle

		Xenodiagnósticos		Porcentagem
		Total	Positivos	
Placebos		23	14	60,9
Tratados Bay 2502	Negatividade sorológica pós-terapêutica persistente	55	0	0
	Positividade sorológica pós-terapêutica	9	4	44,4

As curvas de porcentagem de positividade da Fig. 1 mostram que a RFC apresenta positividade de 35% que cresce rapidamente até 71,9% no segundo mês. A positividade no terceiro mês aumenta a 83,3%, atingindo 100% no sexto mês; mais tarde a sensibilidade da RFC diminui, o que se explica pela técnica empregada que, embora mais simples, é menos perfeita do que as mais modernas com 50% de hemólise.

As observações sobre o valor da RHA e do TIF basearam-se sobre o estudo comparativo de soros processados pela RFC, em geral pertencentes a pacientes na fase crônica da doença.

Pouco ou quase nada se conhecia sobre a duração dos períodos pré-sorológicos. Em trabalhos prévios (CERISOLA & col.<sup>7</sup>) assinalou-se a impressão de uma sensibilidade menor da RHA nas fases iniciais da doença. Igualmente assinalou-se, pela primeira vez: a precocidade da positividade do TIF nos casos agudos (CERISOLA & col.<sup>7</sup>).

Além disso, observa-se que a RHA apresenta positividade inicial de 27,7% que aumenta até chegar a 50% no segundo mês; daí em diante, a positividade aumenta até 83,3% o terceiro, chegando a 100% no quin-

to mês. Daí em diante, sua sensibilidade estudada até os 24 meses mantém-se entre 93,8% e 100%.

O TIF mostra positividade inicial no dia 0 surpreendentemente elevada 72,1% (Fig. 1). Em um mês a positividade chega a 89,2%. No segundo e terceiro meses a positividade é 97,1% e a partir do quarto mês sobe a 100%, valor que se mantém até dois anos de observação. O TIF é, pois, um método sorológico que permite o diagnóstico mais precoce.

O estudo da curva da Fig. 1 demonstra que habitualmente a primeira reação a se mostrar positiva é o TIF, logo após aparece positiva a RFC e, finalmente, a RHA, mostrando tôdas sua máxima sensibilidade ao sexto mês após iniciada a doença.

Daí em diante, já entrando na fase crônica e até os 24 meses, a RHA apresenta uma sensibilidade média de 95% e o TIF de 100%. A RFC não alcançou esta sensibilidade possivelmente por não se ter empregado técnica mais precisa.

No dia 0 da infecção os pacientes tratados mostraram ligeira diferença nas porcentagens de positividade das reações, comparadas com as do grupo placebo. Esta diferença

poderia ser explicada pelo tempo variável de evolução anterior ao diagnóstico, que cada paciente apresentou.

Durante o primeiro mês produziu-se um aumento da percentagem de positividade tanto no grupo placebo como no grupo tratado, fato que se explicará pelo estímulo antigênico representado pelos tripanosomas circulantes presentes no momento em que foi feito o diagnóstico. Desde o segundo mês observou-se diferente comportamento em ambos os grupos: enquanto no grupo placebo continuou aumentando a percentagem de positividade das três reações, no grupo tratado iniciou bruscamente a queda da positividade das mesmas. Ao fim do terceiro mês, término do tratamento, as percentagens de positividade dos diferentes métodos no grupo tratado com Bay 2.502 variaram entre 15,5% para RFC, 12,3% para RHA e 29,7% para TIF, enquanto o grupo que recebeu placebos mostrou positivities significativamente elevadas.

Ao sexto mês tôdas as amostras dos não tratados foram positivas (100%) com os três métodos, enquanto os tratados apresentaram positividade de 13,6% para RFC, 15,1% para RHA e 21,5% para TIF.

A partir do terceiro mês a positividade se mantém em constante declínio no grupo tratado, oscilando ao fim de um ano, entre 11,8% para RHA, 10,2% para RFC e 21,8% para TIF. Na mesma fase evolutiva os placebos apresentaram positividade de 100% para RHA e TIF e 92,3% para RFC.

Aos 18 meses as amostras do grupo tratado apresentaram positividade de 13,3% para RFC, 15,8% para RHA e 23,4% para TIF, enquanto que os placebos apresentam 100% para TIF, 96,7% para RHA e 88,9% para RFC. Estes valores, com poucas variações, mantêm-se em ambos os grupos até os 2 anos, tempo máximo que se prolongou a observação. Esta última avaliação sorológica efetuada em ambos os grupos demonstrou que a negatificação do grupo tratado persistiu ainda 21 meses após a suspensão do medicamento. Este fato indica que a droga atua especificamente sobre o agente etiológico e não por ação imunossupressora na formação dos anticorpos. Habitualmente, a primeira reação que se faz positiva é o TIF, logo a RFC e por último o RHA.

Nos pacientes que receberam tratamento observou-se, em geral, primeiro a negatificação da RFC, logo após a RHA e por último o TIF.

A Fig. 2 mostra a evolução sorológica individual de pacientes chagásicos que completaram o tratamento e seguiram regularmente os contrôles sorológicos até os 18 a 24 meses após iniciada a doença (232 pacientes). Para considerar a evolução sorológica individualmente, foram levados em conta os resultados categoricamente diagnosticados (denomina-se positivo aquele que mostrou simultaneamente as três reações positivas (RFC, RHA e TIF) e negativo, as três reações negativas, que mostraram os pacientes em três períodos evolutivos: 1) *Período inicial da doença*, que se estende desde o início até ao sexto mês. Este lapso de tempo deve ser considerado como o período pré-sorológico máximo da Doença de Chagas, pois, como se observa na Fig. 1, ao término de 6 meses todos os placebos foram positivos com os três métodos; 2) *Período pós-terapêutico recente*, que abrange desde o sexto mês de iniciada a doença até um ano; 3) *Período pós-terapêutico posterior*, que em nossas observações estendem-se até aos 18 e 24 meses após início da doença.

Individualmente, os 232 pacientes reproduziram em sua evolução sorológica sete tipos de curvas que são um índice do efeito terapêutico da droga. Passamos a analisá-las: *CURVA "A"* — este tipo de curva mostra que os pacientes nos três períodos de observação (inicial, pós-terapêutico recente e pós-terapêutico posterior) mostraram sempre negatificação persistente nas reações sorológicas. Isto indica que o tratamento iniciado em etapas muito precoces da doença evita a posterior positificação das reações. Oitenta pacientes dos 232 apresentam este tipo de curva (34,5%); *CURVA "B"* — aqui os pacientes mostraram as reações positivas no período inicial, aos seis meses o imunodiagnóstico foi negativo, resultado que se repetiu nos contrôles efetuados até o último período de observação. É interessante observar como a sorologia positiva na fase aguda pode tornar-se persistentemente negativa após a suspensão da droga (Frequência em 108 dos 232, isto é, 46,5%); *CURVA "C"* — a curva "C" é exatamente similar à que mostram os pacien-

tes do grupo placebo (Fig. 1) isto é, que se observou positividade durante a etapa inicial e idêntico resultado mostraram os controles efetuados até os 2 anos. Aqui pode-se afirmar que o tratamento fracassou nestes pacientes já que evoluíram sorologicamente do mesmo modo que o grupo não tratado (Frequência 10/232: 4,3%); *CURVA "D"* — observaram-se reações negativas no período inicial da doença, ou seja, durante a administração da droga, porém no período pós-terapêutico recente as reações tornaram-se positivas mantendo-se este resultado no período pré-sorológico da doença, seguramente por uma ação supressiva sobre o *T. cruzi*, porém, uma vez suspensa a administração da droga, a persistência do agente etiológico determinou a positividade das reações sorológicas (Frequência 9/232: 3,9%); *CURVA "E"* — aqui as reações foram positivas na fase inicial, logo tornando-se negativas ao terminar o tratamento, porém posteriormente nos controles recentes e a longo prazo tornam-se positivas mostrando também o fracasso da terapêutica que somente foi eficaz enquanto administrada. Sua ação pode ser catalogada como na curva anterior, somente supressiva, mas não curativa (Frequência 11/232: 4,7%); *CURVA "F"* — a curva "F" mostrou negatificação nos primeiros períodos de observação e logo positividade no terceiro período (pós-terapêutico posterior). Aqui o tratamento logrou manter negativa a sorologia até um ano após suspensão a medicação. É difícil aceitar uma ação supressiva tão prolongada, pois como já foi demonstrado, o período pré-sorológico dos tratados não excede dos seis meses e existem outras curvas que evidenciam que a droga só teve ação supressiva, pois as reações se positiveram dentro de seis meses após suspensão da droga (curvas "D" e "E"). Aqui cabe a possibilidade de reinfeção dos pacientes, o que não é improvável sabendo-se que os mesmos continuaram expostos ao vector, dado que residiam em zona endêmica (Frequência 5/232: 2,2%); *CURVA "C"* — os pacientes mostraram positividade na fase inicial da doença e logo negatividade sorológica durante o primeiro ano de observação pós-terapêutica, porém, finalmente na observação a longo prazo, voltaram a mostrar-se positivos. Cabem aqui as mesmas considerações da curva anterior e seguramente o mecanismo de rein-

fecção foi uma causa importante na positividade tardia da sorologia (Frequência 9/232: 3,9%).

#### CONCLUSÕES

Do estudo efetuado e agrupando os pacientes pelo tipo de curvas de evolução sorológica, observa-se que: 1) independentemente dos resultados da sorologia no período inicial, 81% dos pacientes mostram negatividade persistente posterior ao tratamento até os 2 anos de observação (curvas "A" e "B"). Este grupo pode ser classificado como curado do ponto de vista do imunodiagnóstico. 2) os 19% restantes dos pacientes mostram finalmente positividade sorológica. Isto é explicável em alguns casos por fracasso da terapêutica (curva "C"). Não se pode invalidar uma administração incorreta do medicamento. Em outros pacientes o tratamento teve ação somente supressiva (curvas "D" e "E") e num terceiro grupo também a reinfeção por meio do vector pode ter desempenhado papel importante (curvas "F" e "G").

#### SUMMARY

##### *Serologic diagnosis and serologic evolution of patients of Chagas' disease*

1) A longitudinal survey on 601 acute chagasic patients was performed; 2) The patients were divided into 2 groups: a) 550 patients treated with Bay 2502 during 3 months and b) 51 untreated patients; 3) Complement Fixation Test (CFT), Hemagglutination Test (HAT) and fluorescent Antibody Test (FAT) were performed simultaneously in all patients. The first serological test was always done on the same day in which *Trypanosoma cruzi* was found in blood of each patient, subsequently, samples were taken each month up to 24 months, the total period of observation; 4) In the untreated patients (placebo group) it was demonstrated that: a) FAT exhibited the shortest pre-serologic period; b) by the first two months of infection CFT was slightly more sensitive than HAT; c) and by the sixth month of infection the three tests turned 100% positive; d) from the ninth month their grades of



sensibility were: FAT 100% while HAT was 95% and CFT 90%; 5); In the treated patients the serology shows a significant decrease in positivity from the second month onwards. The positivity of CFT was about 10 to 14% from the 4th month to the 24th month, while HAT was 10 to 15% and FAT was 21 to 24%; 6) The treatment determined a completely negative serology in 81% of the acute-phase patients.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ, M.; CERISOLA, J. A. & ROHWEDDER, R. W. — Test de Inmunofluorescência para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chile. Parasit.* 23: 4-9, 1968.
2. BOYDEN, S. V. — The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera. *J. Exp. Med.* 93:107-120, 1951.
3. CAMARGO, M. E. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:227-234, 1966.
4. CERISOLA, J. A. & ROSENBAUM, M. B. — La Reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prensa Méd. Argent.* 45:1454-1463, 1968.
5. CERISOLA, J. A.; FATALA CHABEN, M. & LAZZARI, J. — Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Proc. VII Inter. Congr. Trop. Med. Malaria* 2:252-253, 1964.
6. CERISOLA, J. A. — Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. *Bol. Chile. Parasit.* 24:54-59, 1969.
7. CERISOLA, J. A.; ALVAREZ, M.; LUGONES, H. & REBOSOLAN, J. B. — Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chile. Parasit.* 24:1-8, 1969.
8. DEFFIS, M. — Una técnica para reacción de fijación del complemento. Triduo de la *As. Bioq. Argent.*, Buenos Aires (comunicación personal), 1953.
9. EAGLE, R. — *Laboratory Diagnosis of Syphilis*. Philadelphia, St. Louis E. Mosby, 1937.
10. FIFE, Jr., E. H. & MUSCHEL, L. H. — Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101:540-543, 1959.
11. GIROLA, R. A.; MARTINI, G. W. & MILIC, A. — La reacción de inmunofluorescencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *II Jorn. Entomoepid. Argent.* 1:187-192, 1965.
12. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med.* 27:225-226, 1913.
13. JACOBS, L. & LUNDE, M. N. — An hemagglutination test for Toxoplasmosis. *J. Parasit.* 43:308-314, 1957.
14. KNIERIM, F. & SAAVEDRA, P. — Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico serológico de las parasitosis. *Bol. Chile. Parasit.* 21:39-44, 1966.
15. LAZZARI, J. — Test de hemaglutinación para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *II Jorn. Entomoepid. Argent.* 1:209-210, 1965.
16. STAVITSKY, A. B. — Micromethods for the study of proteins and antibodies. I — Procedure and general application of hemagglutination and hemagglutination inhibition reactions with Tannic Acid and Protein treated red blood cells. *J. Immun.* 72:360-367, 1954.

Recebido para publicação em 26/5/1970.