

LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS
EM 59 MUNICÍPIOS DA ZONA NORDESTE
DO ESTADO DE SÃO PAULO

SEROLOGICAL SURVEY FOR CHAGAS' DISEASE IN 59 COMMUNITIES
FROM THE NORTHEAST PART OF THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

OCTAVIO BARACCHINI (2)
ARYOWALDO COSTA (2)
JOÃO CARLONI (3)
LINDOLFO CLEMENTE FERNANDES (3)

SUMMARY

In this paper are presented the results of complement fixation test performed in 8 455 sera obtained from unselected patients living in 59 communities in northeast of the State of São Paulo, Brazil. In this survey, 17,39% of the sera reacted with methanolic antigen of *Trypanosoma cruzi*. The referred antigen is a methanolic extract of *T. cruzi* heated at a temperature of 120°C., for 30 minutes. This antigen was found to keep its specific properties at room temperature and the isofixation curve with sera from proved cases of Chagas' disease is consistently of the type I; therefore, there is not a critical dose of antigen for complement fixation, permitting its use in a large and broad zone of dilutions. The *T. cruzi* were easily cultivated in a liquid and heated medium without red cells and protein precipitates. This medium gives good results in the cultivation of *T. cruzi* from infected animals.

INTRODUÇÃO

O presente trabalho reúne um levantamento sorológico da doença de Chagas, realizado em 8 455 soros provenientes de 59 municípios, a maioria pertencendo à zona da Mogiana; um estudo de um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, que foi ajustado e experimentado, tendo sido estabelecidas as condições para um crescimento máximo de *Trypanosoma cruzi*; e a descrição de um extrato metanólico de *Trypanosoma cruzi*, aquecido a 120°C, previamente tratado pela acetona, que se mostrou apropriado para uso como antígeno em reações de fixação de complemento, sendo dotado de sensibilidade e especificidade para o diagnós-

tico da doença de Chagas. Essas características, acrescidas da sua estabilidade, mesmo em temperatura ambiente, recomendam-no para o uso em saúde pública.

GUERREIRO & MACHADO¹ foram os primeiros a empregar a reação de fixação de complemento como método sorológico para o diagnóstico da doença de Chagas. Esses autores empregaram como antígeno, primeiro, uma suspensão de tripanosomas obtida por centrifugação de sangue de animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*. Como esse método fornecia muito pouco antígeno e a obtenção era trabalhosa, os refe-

- (1) Trabalho laureado com o Prêmio "Adolfo Lutz" de Ciências Biológicas, Bioquímicas e de Saúde Pública de 1967.
Realizado no Instituto Adolfo Lutz (Lab. Regional de Ribeirão Preto) e na Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto.
(2) Do Instituto Adolfo Lutz (Lab. Reg. Ribeirão Preto) e da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto.
(3) Do Instituto Adolfo Lutz (Lab. Regional de Ribeirão Preto).

ridos autôres optaram pelo extrato de baço de cães infectados e rico em *Trypanosoma cruzi*. Desde então, vários outros抗igenos também obtidos de extratos de órgãos de animais inoculados foram ensaiados (LEÃO², VILLELA & BICALHO³, LACORTE⁴ e PATTO⁵). Foi KELSER⁶ quem demonstrou o valor das culturas de *Trypanosoma cruzi* como antígeno para as reações de fixação de complemento. Após os trabalhos de KELSER e com a publicação de novos meios de cultura para o cultivo do *Trypanosoma cruzi* *in vitro*, meios difásicos (NOVY & MCNEAL⁷, BONACCI⁸, SENEKJIE⁹ e CHANG¹⁰), meios líquidos (LITTLE & SUBBAROW¹¹, SAMPATH & LITTLE¹², LITTLE & OLESON¹³, CITRI & GROSSOWICZ¹⁴, WARREN¹⁵, BONÉ & PARENT¹⁶, NEAL & MILES¹⁷, e BARACCHINI¹⁸), novos progressos foram alcançados e antígenos mais específicos, sensíveis e práticos foram descritos (ROMAÑA & DIAS¹⁹, DAVIS²⁰, ROMAÑA & GIL²¹, MUNIZ & FREITAS²², PEDREIRA DE FREITAS & ALMEIDA²³, CHAFFEE, FIFF & KENT²⁴, BATISTA & SANTOS²⁵ e BARACCHINI, COSTA & CARLONI^{26,27}).

MATERIAL E MÉTODOS

MEIO DE CULTURA

O meio de cultura que apresentamos é um meio quimicamente indefinido; na sua composição entram sangue e substâncias extraídas do cérebro, coração e fermentos.

Preparação do meio básico — Colocar 750 cm³ de água destilada no copo de um liquidificador. Acionar o aparelho e, aos poucos, adicionar 100 g de coágulos de sangue humano, previamente colocados sobre uma folha de papel filtro. Deixar funcionar o aparelho durante 20 minutos. A seguir, adicionar o conteúdo de um ovo de galinha à mistura de sangue e ligar o aparelho por mais 2 minutos. Passar o líquido para um balão de vidro de dois litros e autoclavar a 115°C, durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). Após a autoclavagem, filtrar a quente em papel e refiltrar as primeiras porções até a obtenção de um líquido pardo-avermelhado, transparente e sem depósito.

Meio de cultura — Meio básico: 1 000 cm³; infusão de cérebro e coração

(Oxoid ou Difco): 37g; extrato de levedura (Oxoid ou Difco): 5g. Deixar em repouso durante 10 minutos; agitar para dissolver. Distribuir 100 ml para cada frasco de Roux. Tamponar com algodão e autoclarvar a 115°C durante 15 minutos (não prolongar este aquecimento). O pH deverá ser de 7.2 a 7.6. Usando-se produtos comerciais "Oxoid" ou "Difco", não será necessário acertar o pH. Os frascos de Roux receberão a nossa preferência pela superfície de aeração que oferecem.

Técnica de cultivo — Repicar o conteúdo de um tubo de cultura de qualquer meio difásico para 1 ou 2 frascos de Roux contendo, cada, 100 ml do meio descrito. Um bom rendimento de *Trypanosoma cruzi* começa a partir do 10.^o dia de cultivo a 28°C, porém, esse rendimento é ainda maior a partir do 30.^o dia. O repique de meio líquido para meio líquido deverá ser feito a partir do 7.^o dia de incubação, na proporção de 10%.

Para o cultivo do *Trypanosoma cruzi* de sangue de animais ou humano, a semeadura na proporção de 10% também é a ideal.

ANTÍGENO

Preparo — O antígeno que descrevemos é preparado a partir de pó seco de *Trypanosoma cruzi*, amostra B. T., obtido do cultivo em meio de BARACCHINI¹⁸ e obedecendo à seguinte técnica:

1. Semear a cepa B. T. de *Trypanosoma cruzi* em meio de BARACCHINI¹⁸ e incubar na estufa a 28°C durante 10 a 30 dias.
2. Adicionar aos frascos de cultura sol. de mertiolate a 1/1000, na proporção de 5 ml para cada 100 ml de meio de cultura. Agitar e deixar em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas.
3. Decantar o sobrenadante e o restante centrifugar a 3 000 r.p.m. durante 15 minutos.
4. Lavar o sedimento com solução fisiológica, 3 vezes.
5. Tratar o sedimento com acetona. Agitar bem e centrifugar. Decantar o so-

- brenadante e secar o sedimento na estufa a 37°C.
6. Triturar o sedimento seco em gral de vidro.
 7. Colocar 200 mg de pó seco de *Trypanosoma cruzi* em um vidro resistente, de capacidade para 100 ml e adicionar 60 ml de metanol p.a.. Fechar o vidro com tampa de borracha, que deve ser fixada ao vidro com barbante forte ou mesmo arame.
 8. Aquecer na autoclave à temperatura de 120°C durante 30 minutos. Deixar esfriar e separar o sobrenadante, que constitui o antígeno.

Estudo — O estudo do antígeno foi realizado empregando-se a técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER²⁸, com 50% de hemólise. O controle da anticomplementariedade foi feito com 2 unidades de complemento 50%. As relações quantitativas entre sôro chagásico, antígeno metanólico e complemento foram determinadas pelo método de isofixação de ALMEIDA²⁹. A curva encontrada pertence ao tipo I, significando não haver inibição de fixação de complemento tanto para excesso de sôro, como para excesso de antígeno. Neste caso, o antígeno poderá ser usado em excesso (BARACCHINI, COSTA & CARLONI²⁶).

O antígeno metanólico em reações com soros chagásicos, parasitológicamente comprovados, mostrou-se específico e sensível, apresentando uma inclinação de maior valor na projeção de sôro contra complemento, quando comparado com outros já descritos (ALMEIDA³⁰).

A sua estabilidade à temperatura ambiente não apresentou queda demonstrável de título e nem atividade anticomplementar, após 24 meses.

O antígeno metanólico, quando diluído e conservado em geladeira, não mostrou instabilidade apreciável.

Elementos da reação — Todos os elementos da reação empregados em nossas experiências, como: complemento, hemolisina, hemácias de carneiro, bem como o estudo da atividade anticomplementar do antígeno e as curvas de isofixação, obedeceram às

técnicas descritas por PEDREIRA DE FREITAS & ALMEIDA²³, PEDREIRA DE FREITAS³¹ e ALMEIDA²⁹.

Soros humanos — As amostras de sangue, num total de 8 455, que serviram para o levantamento que apresentamos, foram coletadas em 59 unidades sanitárias, de indivíduos suspeitos ou não de infecção chagásica, a maioria pertencendo à zona da Mogiana, num período compreendido de 1 de janeiro de 1966 a 31 de julho de 1967.

Os soros foram separados, inativados e examinados pela técnica de KOLMER³² 1/5, por ser a empregada na rotina dos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio de cultura descrito é um meio prático e que produz um rendimento apreciável de *Trypanosoma cruzi*. Pelo fato de ser um meio líquido e sem depósito, é um dos mais indicados para a obtenção de culturas de tripanosomas sem outras impurezas, fator importante na preparação de antígenos específicos. O sangue humano empregado, fácil de ser obtido em qualquer laboratório de sorologia, representa o aproveitamento de material que seria desprezado.

O referido meio pode ser empregado com sucesso no isolamento de *Trypanosoma cruzi* de animais infectados tanto na fase aguda como crônica; resultados positivos obtém-se a partir do 7.º dia da semeadura.

Antígeno — Dentre os métodos de laboratório que dispomos para o diagnóstico da doença de Chagas, a reação de fixação de complemento é o mais importante e prático. Assim, o emprêgo de antígenos altamente específicos, sensíveis e estáveis é do mais alto interesse à saúde pública.

À vista dos testes de anticomplementariedade, especificidade, estabilidade e curvas de isofixação (BARACCHINI, COSTA & CARLONI²⁶) e dos recentes resultados obtidos por ALMEIDA³⁰, com soros chagásicos parasitológicamente comprovados, o antígeno que descrevemos é o mais indicado para as reações de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da endemia chagásica e na titulação dos soros positivos.

Levantamento sorológico — As informações sobre as localizações e os índices das endemias que acometem as populações constituem importante contribuição às autoridades sanitárias, para os trabalhos de erradicação.

Certamente os dados numéricos apresentados não representam a real porcentagem da positividade da reação, seja por municípios, seja no total, dado ao fato da amostragem, como assinalado anteriormente, não ter sido obtida rigorosamente ao acaso.

Assim sendo, o nosso objetivo não teve outro sentido se não o de localizar e estabelecer o provável índice da endemia chagásica numa extensa e importante região do Estado de São Paulo, compreendida por 59 municípios.

Os resultados apresentados no quadro seguinte mostram que dos 8 455 soros examinados, 1 471 foram positivos na reação de fixação de complemento para o diagnóstico sorológico da doença de Chagas. O índice

de positividade foi de 17,39%, o que representa, com a ressalva acima mencionada, uma informação da mais alta importância às autoridades sanitárias do país. A doença de Chagas foi constatada sorologicamente em todos os 59 municípios dos quais recebemos sangue para exame.

Amostras examinadas	Não reagentes	Reagentes	Reagentes %
8 455	6 984	1 471	17,39

Apenas uma publicação de PEDREIRA DE FREITAS³³, com uma breve citação de 1 887 exames sorológicos realizados no interior de São Paulo, foi encontrada.

Abaixo apresentamos a relação dos municípios onde a endemia chagásica foi constatada sorologicamente.

Relação dos municípios

Altinópolis	Guariba	Restinga
Ariranha	Igarapava	Ribeirão Preto
Barretos	Ipuá	Rincão
Batatais	Ituverava	Sales de Oliveira
Bebedouro	Jabuticabal	Santa Adélia
Bento Quirino	Jardinópolis	Santa Lúcia
Brodosqui	Jeriquara	Santa Rita do Passa Quatro
Caconde	Miguelópolis	Santa Rosa do Viterbo
Cajobi	Mococa	Santo Antônio da Alegria
Cajuru	Monte Alto	São Joaquim da Barra
Cândia	Monte Azul Paulista	São José do Rio Pardo
Casa Branca	Morro Agudo	São Sebastião da Gramá
Colina	Novo Horizonte	Serrana
Cravinhos	Nuporanga	Sertãozinho
Descalvado	Orlândia	São Simão
Divinolândia	Patrocínio Paulista	Tamboré
Dumont	Pedregulho	Tapiratiba
Franca	Pitangueiras	Terra Roxa
Guaíra	Pontal	Vargem Grande do Sul
Guará	Pradópolis	

RESUMO

Neste trabalho são apresentados os resultados de um levantamento sorológico para a doença de Chagas, realizado em 8 455 soros procedentes de 59 unidades sanitárias, obtidos de pessoas sem qualquer exame clínico prévio. O índice de positividade foi de 17,39%, e representa a contribuição às autoridades sanitárias do país, para o conhecimento da atual situação da endemia chagásica em 59 municípios do Estado de São Paulo.

Neste trabalho os autores estudam também o comportamento de um meio de cultura líquido, esterilizável pelo calor, isento de precipitados de proteínas e hemárias, que pode ser empregado com bons resultados para a obtenção de culturas de *Trypanosoma cruzi* para o preparo de抗ígenos, bem como para isolamento de trypanosomas de animais inoculados ou naturalmente infectados.

Um antígeno metanólico de *Trypanosoma cruzi*, aquecido à temperatura de 120°C, é também estudado. Esse antígeno, nos testes de anti-complementariedade, especificidade, sensibilidade e estabilidade, mostrou-se superior aos já descritos, sendo, portanto, o antígeno mais indicado para as reações de fixação de complemento no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, tanto nos testes qualitativos como nos testes quantitativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Méd. 27:225-226, 1913.
2. LEÃO, A. E. ÁREA — Do diagnóstico das trypanosomoses pela reação de desvio do complemento. Cienc. Med., R. de Janeiro. 1s126-234, 1923.
3. VILLELA, E. & BICALHO, C. — As pesquisas de laboratório no diagnóstico da moléstia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 16:13-191, 1923.
4. LACORTE, J. G. — A reação do desvio do complemento na moléstia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 20: 197-210, 1927.
5. PATTO, O. — Fixação do complemento no bôcio endêmico. An. Fac. Med. Minas Gerais 2:95-103, 1930.
6. KELSER, R. A. — A complement-fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen. Amer. J. Trop. Med. 16(4):405-415, 1936.
7. NOVY, F. G. & MCNEAL, W. J. — On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. J. Infect. Dis. 1:1-30, 1904.
8. BONACCI, H. — Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi*. Chagas, 1909. Rev. Inst. Bact., B. Aires 6: 242-247, 1934.
9. SENEKJIE, H. A. — Biochemical reactions, cultural characteristics and growth requirements of *Trypanosoma cruzi*. Amer. J. Trop. Med. 23:523-531, 1943.
10. CHANG, S. L. — Studies of haemoflagellates. I. A semi-solid medium and fluid medium with a solid for growing various species of *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 80:164, 1947.
11. LITTLE, P. A. & SUBBAROW, Y. — A practical liquid medium for cultivation of *Trypanosoma cruzi* in large volumes. J. Bact. 50:57-60, 1945.
12. SAMPATH, A. & LITTLE, P. — Cultivation of *Trypanosoma cruzi*, in liquid media. J. Bact. 57:265, 1949.
13. LITTLE, P. A. & OLESON, J. J. — The cultivation of *Trypanosoma cruzi*. J. Bact. 61:709-714, 1951.
14. CITRI, N. & GROSSOWICZ, N. — A partially defined culture medium for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 13:273-278, 1955.
15. WARREN, L. G. — Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. J. Parasit. 46:529, 1960.
16. BONÉ, G. J. & PARENT, G. — Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol. 31:261-266, 1963.
17. NEAL, R. A. & MILES, A. R. — Heated blood agar medium for the growth of *Trypanosoma cruzi* and some species of *Leishmania*. Nature (London) 198:210-211, 1963.
18. BARACCHINI, O. — Meio de cultura líquido esterilizável pelo calor para *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Adolfo Lutz 22/23:91-92, 1962/63.

19. ROMANA, C. & DIAS, E. — Reação de fixação de complemento na doença de Chagas com antígeno alcoólico do *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 37(1):1-10, 1942.
20. DAVIS, D. J. — An improved antigen for complement fixation in American Trypanosomiasis. Publ. Hlth. Rep. 58:775-777, 1943.
21. ROMANA, C. & GIL, J. — Reacción de fixación de complemento com antígeno de cultura de *S. cruzi* en 500 sueros humanos. An. Inst. Med. Reg. Tucumán 1(3):297-304, 1946.
22. MUNIZ, J. & FREITAS, G. de — Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 41:303-333, 1944.
23. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. Hospital Rio de J. 35:787-800, 1949.
24. CHAFFEE, E. F., FIFF, E. H. Jr. & KENT, J. F. — Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement-fixation. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 5(5): 763-771, 1956.
25. BATISTA, S. M. & SANTOS, U. M. — Antígeno de cultura de *Schizotrypanum cruzi*. Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, 1963.
26. BARACCHINI, O., COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor e do me-
- tanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 68(6):193-199, 1965.
27. BARACCHINI, O., COSTA, A. & CARLONI, J. — Emprêgo do calor à temperatura de 120°C e do metanol no preparo de antígeno de *Trypanosoma cruzi*. Hospital, Rio de J. 70(1):97-100, 1966.
28. WADSWORTH, A. B. — Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department.
29. ALMEIDA, J. O. — Isofixation curve as a method of standardizing quantitative complement-fixation test. J. Immunol. 76:259-263, 1956.
30. ALMEIDA, J. O. — Comunicação pessoal. Resultados obtidos em Washington. O. M. S., 1967.
31. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Reação de fixação de complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. Archos. Hig. Saúde Públ. 16:55-94, 1951.
32. KOLMER & BOERNER — Approved Laboratory Technic. Copyright by D. APPLETON. Century Co. Ind., New York, 1948.
33. PEDREIRA DE FREITAS, J. L. — Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa: vantagens do método e sua aplicação em saúde pública. Hospital, Rio de J. 41(2):257-267, 1952.

Recebido para publicação em 31 de outubro de 1967.