

PROVAS SUBSIDIÁRIAS NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS (*)

PELO

PROF. ANTÔNIO LUIS DE BARROS BARRETO

(Catedrático de Parasitologia na Faculdade de Medicina da Universidade da Bahia; ex-assistente do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro; ex-chefe do Serviço de Saneamento Rural no Paraná e na Bahia).

Dentre os recursos utilizados para elucidar o diagnóstico clínico de casos suspeitos de Doença de Chagas, merecem assinalados os seguintes:

A — SANGUE

- I — *Pesquisa de parasitos*
- II — *Fórmula leucocitária*
- III — *Reação de fixação do complemento*
- IV — *Reação de uglutininas*
- V — *Reação de precipitinas*
- VI — *Reação do "sublimado"*
- VII — *Reação do "formol gel"*
- VIII — *Xenodiagnóstico*

B — LÍQUIDO CÉFALO RAQUEANO

C — RASPADO CONJUNTIVAL

(*) — Conferência realizada a 7 de Março de 1945, no Segundo Congresso Médico de São Paulo, revista e atualizada até Dezembro de 1946.

D — BIOPSIA — ESTERNO PUNCTURA — VISCE-
ROTOMIA

E — REAÇÕES ALÉRGICAS

I — *Cuti-reação*II — *Intradermo-reação*III — *Prova de Shwartzman*

A — SANGUE

I — *Pesquisa de parasitos* — A evidenciação do *S. cruzi*, nos casos suspeitos de infecção chagásica constitue, sem dúvida, a melhor documentação etiológica. Nem sempre pode fornecer resultados positivos, porque na dependência da *tripanosemia*, isto é, da presença do parasito no sangue periférico, fenômeno êste constante nas fases aguda e subaguda da moléstia, porém menos frequente à medida que esta caminha para a cronicidade, quando escasseiam e às vêzes até desaparecem por completo as fórmias parasitárias da circulação sanguínea, onde surgem apenas, periòdicamente, graças à libertação de parasitos que se achavam aninhados no interior de diversos órgãos (miocárdio, sistema nervoso, glândulas endócrinas, etc.) onde se refugiaram a-fim-de realizarem algumas das etapas de seu ciclo vital.

Os métodos empregados para evidenciar a presença do *Schizotrypanum cruzi* no sangue consistem, principalmente, nos seguintes:

- 1 — preparações "a fresco"
- 2 — preparações coradas (camada delgada e gôta espessa)
- 3 — culturas
- 4 — inoculações em animais sensíveis

1 — *Preparações "a fresco"* — O exame direto, sem coloração, entre lâmina e lamínula, proveitoso em casos agudos da doença, pode ser realizado no sangue, adicionado ou não de algumas gotas de água fisiológica ou soluto de citrato de sódio, como também, consoante a técnica de Leboeuf e Brumpt, na camada sobrejacente ao plasma citratado ou oxalado.

Além das características morfológicas próprias à espécie, teria valor diagnóstico aquilo que Blacklock e Yorke (6) denominam "*tumbling movement*", graças ao qual o *S. cruzi* efetuará apenas movimentos sobre si próprio, "em cambalhotas" sempre em tórno do mesmo ponto, sem atravessar o campo do microscópico, como acontece com o *Trypanosoma gambiense* que, ativamente, se agita em movimentos de translação, fugindo, rapidamente, da zona focalizada da preparação ("*In preparations of fresh blood, the parasite exhibits a curious tumbling movement, which is rather characteristic*") (6).

A colheita de sangue em citrato de sódio a 3.8%, permite o transporte do material para laboratórios distantes do fóco da doença; nessas condições, quando abundantes os tripanosomas, podem sobreviver até um mês, após a sangria, tal como verificou Mazza (35) enviando, da Argentina, amostras para o Serviço Americano de Saúde Pública, em Washington.

No entender de Villela e Bicalho (74) "*na forma aguda o exame direto do sangue entre lâmina e lamínula é o processo de escolha para o diagnóstico da moléstia de Chagas*". Constitúe a "*prova diagnóstica irrefutável*". Nas formas crônicas não é "*meio de diagnóstico utilizável, mesmo com o método de concentração*".

2 — *Preparações coradas* — Distendido o sangue em "camada delgada" ou "gota espessa", será tratado por um dos co-

rantes habituais para estudos hematológicos: Leishman, Giemsa, Wright, etc. Os aspectos morfológicos do tripanosoma tornam-se facilmente reconhecíveis, permitindo rápida identificação do parasita.

A pesquisa direta no sangue, proveitosa nas primeiras semanas de infecção, constitue, seja qual fôr o procedimento adotado, tarefa árdua e não raro infrutífera, quasi impossível de resultar positiva depois de quatro meses de doença.

A variante da "gôta espessa" possui valôr mais apreciável, quando aplicada com a necessária insistência e repetida periódicamente, sendo feitas, de cada vez, diversas preparações (35).

Para as formas agudas, diz textualmente Mazza (33) a respeito da gôta espessa: "*es siempre la "gota gruesa" de sangre para las formas agudas, el procedimiento más fiel y seguro de diagnóstico de Enfermedad de Chagas*".

No recenseamento chagásico, o exame do sangue representa o método de menor rendimento, para descoberta de casos humanos, porque, decorrido cerca de um mês do início da infecção, o *S. cruzi* apresenta-se sumamente escasso no sangue periférico, excetuados os casos, raros na prática, de permanência mais demorada (4 a 7 meses, até um ano) na circulação sanguínea: em 359 indivíduos observados por Mazza e seus colaboradores (35) na Província de Jujuy, norte da Argentina, forneceu o exame de sangue, um caso positivo, (ou seja apenas 0.22%)

Para a verificação da ocorrência de reservatórios do parasito, principalmente cães e gatos, o exame direto revelou tripanosomas na proporção de um a dois por 100 campos do microscópico, durante um mês, passando a *negativo* logo após, e assim permanecendo durante um largo período (4 meses), embora ameúde repetido, até a morte dos animais (Cardoso e Navajas) (13).

3 — *Culturas* — Obedecida a técnica geral para o cultivo de hemoflagelados, quatro são os meios de cultura mais frequentemente utilizados: N. N. N. (Novy — Nicolle — Neal), Noguchi, Galliard e Bonacci. Este último, em face dos resultados medíocres obtidos com os primeiros, vem merecendo a preferência dos pesquisadores, e consiste em agar nutritivo (carne — 1 parte; água — 2 partes; peptona Witte — 2.5%; cloreto de sódio — 0.7%), neutro ao ponto de tornasol, adicionado de 0.5% de glicose e 5% de sangue estéril de cobaio jovem. Semeado com sangue de camundongos brancos infectados (20 a 25 tripanosomas por campo) e conservado à temperatura ótima de 25° C., forneceu nas mãos do autor (6), culturas positivas em 24 horas.

Para o cultivo em massa do parasito, dão preferência Muniz e Freitas (1946) (50) ao clássico meio de Noeller (1917) consoante a seguinte fórmula: gelose nutritiva a 2%, com pH 7,2 contendo 2% de glicose adicionada no momento de usar de 10% de sangue de coelho desfibrinado. Distribuir em frascos de Erlenmeyer. Para o bom êxito da cultura, recomendam temperatura constante de 28° ou 29° C. e quantidade suficiente de semente (1.5 cm³) constituída por uma suspensão de parasitos, em caldo glicosado a 2%.

4 — *Inoculações* — Mais decisiva que a gôta espessa e a cultura, a inoculação em animais sensíveis, evidencia-se proceder indispensável, maximé quando falham os recursos acima referidos. Prefere-se hoje o camundongo branco aos cobaios, cães e gatos jovens, empregados no início dos estudos sôbre a Doença de Chagas. Inoculando pequena quantidade (1 cm³) de sangue puro ou citratado (solução de citrato de sódio a 3.8%), subcutânea ou intraperitonalmente, em camundongos brancos e ratos brancos jovens (de 50 dias no máximo), conseguem-se resultados positivos, até depois de decorrido um ano do período agudo da moléstia, mórmente quando reduzido

ao mínimo o prazo entre a colheita no doente e a injeção no animal (35). Nas mãos de Mazza e colaboradores (32), falhou êste processo algumas vêzes, em casos com 5 e 6 meses de evolução, mesmo inoculado o sangue, poucas horas depois de extraído. A injeção de grande volume de sangue (5 a 15 cm³) recomendada nos casos crônicos, requer animal de maior porte (cães jovens, cobaias, macacos).

Examinar o sangue do animal inoculado a partir do 20.^o dia e prolongar a observação até 60 dias, no mínimo.

Quanto ao valor da inoculação, acham Vilela e Bicalho (74) que "*nos indivíduos que tiveram recentemente a fôrma aguda, ou suspeitos de tal, a injeção de 10 cm³ em animais sensíveis traz resultados decisivos*". Nas fôrmas crônicas, pensam êsses mesmos autores, que "*póde dar resultados preciosos e da maior significação doutrinária, embora seja pouco prático, como processo rotineiro de diagnóstico, pelo número relativamente pequeno das inoculações positivas, pelo tempo de demora do resultado da reação e pelo trabalho que exigem os exames de sangue reiterados ou as pesquisas dos parasitos nos órgãos*" (74).

II — *Fórmula leucocitária* — Método indireto, apenas presuntivo da infecção chagásica, a apreciação da fórmula leucocitária pode revelar uma eosinofilia residual, uma linfocitose (tendo-se em conta a idade, porque em crianças até 5 e 6 anos é naturalmente alta) e principalmente uma monocitose (35). Elevada linfocitose em adultos, nos períodos agudo e crônico do processo mórbido, representa "*un estigma hematológico del mismo*" (Mazza) (36); em adolescente de 13 anos, verificou êsse autor 52% de linfócitos, decorridos 109 dias do início da doença.

III — *Reação de fixação do complemento* — Em 1913, Guerreiro e Machado (21) do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, utilizando sangue de animal parasitado com S.

cruzi, adicionado de soluto a 2% de citrato de sódio e também extrato aquoso glicerinado, de baço de cães jovens, experimentalmente infectados, praticaram 102 reações de fixação de complemento, em casos clínicos de diversas formas da moléstia, obtendo 66.6% de positividade (27). Desde então, outros antígenos têm sido empregados; assim Marques da Cunha e Vilela (74), em 1920, usaram o extrato aquoso fenicado de cãezinho inoculados em laboratórios; mais tarde (1926) Vilela e Bicalho (74), preferindo um antígeno misto de coração e baço, aquoso e glicerinado, de maneira a obviar a grande labilidade dos anteriores, alcançaram 34 resultados positivos sobre 39 reações efetuadas, ou sejam, 87% aproximadamente. Muniz (45) aplicou o antígeno de Watson (extrato aquoso de *Trypasonoma equiperdum* proveniente de ratos infectados experimentalmente), em 13 casos de moléstia de Chagas, todos dando reações positivas. Patto (1931) executou 34 reações com antígeno metílico, das quais 68.18% positivas (53). Kelsner (1936), com antígeno glicerinado preparado de culturas de *S. cruzi* em meios artificiais, teve ensejo de realizar 400 reações, concluindo que em todos os casos de infecção chagásica alta era a cifra de resultados positivos (26). Em 1938, Lacorte (27), com antígeno de baço de cãezinhos infectados, glicerinado e fenicado, repete a reação em 35 chagásicos, com 68.5% como índice de positividade, confirmando, dessa maneira, as conclusões anteriormente (1926) estabelecidas no Hospital de Lassance (Minas Gerais), quando, em 200 casos suspeitos ou já confirmados, 159 sôros deram resultado positivo, o que equivale a 79.5%. Na forma cardíaca, obteve 87.2% de positividade, na modalidade nervosa, 100%, na glandular, 75%, e nos portadores de bócio da região, 79.6%.

Romana e Dias (63), dão preferência, em 1942, na prática da reação de Machado Guerreiro, a um extrato alcoólico

de formas culturais de *S. cruzi* previamente tratados pela acetona.

Últimamente (1943) Davis (14) sugeriu um novo antígeno, constituído de *S. cruzi* cultivados em agar-sangue com 0.5 de dextrose e emulsionados em solução fisiológica, contando mertiolato na proporção de 1:10.000 como substância conservadora. Aplicando-o em reações com sôros humanos de 9 casos de Doença de Chagas, procedentes da Argentina, do Brasil e da Venezuela, conseguiu resultados positivos em diluições até de 1:160. Tal antígeno guardou a atividade inalterada durante 6 meses, e depois de um ano, mostrou o título inicial apenas ligeiramente diminuído.

Muniz e Freitas (50), mais recentemente (Outubro de 1946) havendo praticado numerosos ensaios em sôros de chagásicos, num total de 217, sendo 6 da fase aguda e 211 da crônica, promoveram "*um estudo comparativo sobre o valor de vários antígenos propostos para uso nas reações de fixação de complemento*" e concluíram textualmente "*que o antígeno de Davis é superior a todos os outros, possuindo um alto poder fixador, baixo poder impediante e dotado de grande estabilidade*".

Verificaram, ademais, que, na infecção experimental do macaco *Rhesus*, a reação de fixação do complemento é positiva no quinto dia do período prepatente.

Esses mesmos autores (48) isolaram em 1944, das formas culturais de *S. cruzi* uma fração de polissacarídeo, dotada de forte poder fixador do complemento a sôros de chagásicos e completamente desprovida de qualquer ação impediante. Quanto ao valor da reação de Machado-Guerreiro, no reconhecimento da infecção chagásica, é hoje incontestado, graças sobretudo, ao aperfeiçoamento na técnica para obtenção de antígenos que, afastando a inespecificidade a princípio verificada,

e outras causas de erro, lhe conferem alto significado diagnóstico. Já em 1924, Vilela e Bicalho (74), incluíam entre as suas interessantes conclusões a seguinte: “a reação de fixação do complemento é dos métodos de laboratório, o mais prático e o mais sensível para o diagnóstico das formas crônicas da Moléstia de Chagas”. Recomendada como “um bom método para o diagnóstico da Moléstia de Chagas, pesquisa e descoberta de casos em zonas onde ainda não foi assinalada” (Lacorte — 1938) (28), considerada de “gran valor presuntivo” (Mazza— 1940) (35), representa, na opinião de Muniz e Freitas (1944) (47) “o meio mais seguro de que dispomos para o diagnóstico dessa tripanosomiasis”, principalmente na forma crônica da moléstia (47 pag. 328).

Sobre a expressividade dêsse recurso laboratorial da diagnose da esquizotripanose, assim se expressam, recentemente (Dezembro de 1945), Dias, Laranja e Nóbrega: “De resultado negativo ou incerto nos primeiros dias de infecção, a reação de fixação do complemento é positiva durante longos anos nos casos de Doença de Chagas, mesmo quando se afastam dos focos de endemia. É uma prova diagnóstica de grande valor, pelo menos para o diagnóstico de probabilidade, já que é sabido que indivíduos portadores de leishmaniose podem, também, apresentar reações positivas com antígenos de *S. cruzi* (reação de grupo).

Excluídas as infecções por *Leishmânia* (pelo exame clínico e pela reação de formol-gel, que é nelas positiva, e negativa na doença de Chagas), já se pode formar o diagnóstico de esquizotripanose nos resultados francamente positivos das reações sorológicas com bons antígenos de *S. cruzi*, as quais são de alta valia pelo seu resultado imediato, contrastando com os demorados resultados do xenodiagnóstico, inoculações e hemoculturas, que, entretanto, são as provas etiológicas definitivas” (19).

IV — *Reação de aglutininas* — Packchanian, em 1940 (52) estudando a produção de aglutininas por Tripanosomas, ocupou-se com o preparo de sôros aglutinantes para o *S. cruzi* em cobaios experimentalmente inoculados.

Em 1943, Senekjie (65) pesquisou, em sôros de coelhos experimentalmente imunizados, a presença de aglutininas para os antígenos somático e flagelar do *S. cruzi*.

Mais de próximo, (1944 e 1946), Muniz e Freitas (47 e 50) utilizando suspensões vivas de cultura do parasito, constataram aglutinação em presença de sôros de 26 doentes do Mal de Chagas. Para fôrmas agudas, o título aglutinante mostrou-se bastante elevado (1:2.500 a 1:10.000), baixando, porém, sensivelmente, nos casos crônicos (1:160 a 1:620). Concluem os autores que a prova de aglutinação “quando positiva, pôde constituir um meio seguro no diagnóstico dessa doença” (47), tornando-se, porém, necessário uma casuística maior, para se poder avaliar, em definitivo, do seu valor como meio de diagnóstico na esquizotripanose (50).

V — *Reação de precipitinas* — Lançando mão do processo de Fuller para extração de polissacarídeos de bactérias conseguiram Muniz e Freitas (47 e 50) isolar de fôrmas culturais de *S. cruzi*, uma fração precipitável pela acetona, solúvel n'água, dando soluções absolutamente límpidas, porém que, em contacto com imunessôro para aquele parasito, precipita fortemente. Utilizando a técnica “do anel”, os ensaios com sôros de casos agudos e subagudos de tripanosomose brasileira, foram “altamente animadores” (50) para elucidação da etiologia dos mesmos, embora nas fôrmas crônicas da enfermidade os resultados se mostrassem variáveis, sendo positivos, apenas, para aqueles capazes de aglutinar em títulos acima de 1:600. Trabalhando com sôro de macacos (*Macaca mullata*) infectados por via conjuntival, a prova de precipitação mostrou-se positiva no quarto ou quinto dia da doença, assim permanecendo até a morte dos animais (50).

VI — *Reação do “sublimado”* — Ainda nesse ano (1944) os supracitados autores (Muniz e Freitas) (48) aplicaram a prova do “sublimado” (Bennett — Kenny) a 18 sôros de doentes de tripanosomose americana, dos quais 17 da forma crônica e um na fase aguda, concluindo que tal reação nenhum valor possui para a diagnose dos casos crônicos, e que, para os agudos, é “*necessário maior número de verificações*”.

VII — *Reação do “formol-gel”* — Lembraram-se, também, Muniz e Freitas (48), nessa mesma ocasião (1944), de praticar, com os mesmos 18 sôros de chagásicos acima referidos, a reação do “formol-gel”, proposta, desde 1922, por Napier, para o diagnóstico das leishmanioses, e que resultados tão concludentes oferece no reconhecimento dessas parasitoses.

Em face da ausência de turvação e de gelificação após a adição do formol a tais sôros, acham aqueles pesquisadores, “*pode esta prova (formol-gel) ser de utilidade no diagnóstico diferencial entre a Doença de Chagas (onde é negativa) e a Leishmaniose visceral (em que se mostra positiva) já verificada em várias regiões do Brasil*”.

VIII — *Xenodiagnóstico* — Em 1914, Brumpt (9) divulgou um interessante processo diagnóstico das hemoparasitoses e que consiste, resumidamente, em fazer sugar o doente suspeito por exemplares do hospedador intermediário, isentos da infecção. Utilizado, a princípio, para a diagnose de tripanosomose de batráquios e répteis, aplicou, posteriormente, Brumpt o novo método, ao estudo da Doença de Chagas, obtendo resultados altamente concludentes. Justificando a prática do xenodiagnóstico nas despovoadas zonas rurais de nosso país, usa o eminente professor francês (9) as seguintes expressões: “*dans les régions où habitent des gens très hospitaliers, mais peu familiarisés avec les pratiques médicales, il est déjà difficile, au cours d’une enquête, de faire des frottis de sang, en piquant les doigts des enfants*”. “*C’est en pre-*

sence de ces difficultés d'ordre matériel, que je propose l'emploi anodin du xenodiagnostic; tous les malades connaissent les Triatomes et peuvent consentir à se laisser faire une ponction de sang naturelle, par ces insectes dont la piqûre est indolore". E mais adiante, referindo-se aos riscos de uma punção venosa para inoculação do sangue em cobaio, acrescenta prudentemente: "mais cette ponction ne serait acceptée que bien rarement, et, étant donné le manque d'assistance utile, pourrait présenter de gros dangers, au cours d'une expédition..."

Largamente empregado por numerosos pesquisadores em diversos países (Brasil, Chile, Uruguay, Argentina, etc.) tem o xenodiagnóstico a sua prática subordinada às seguintes normas, quando visar o reconhecimento de casos de Moléstia de Chagas:

a — escolher insetos (barbeiros) da espécie dominante na região como principal transmissor do *S. cruzi*, isto é, aquela que mostrar mais elevado índice de infecção natural, atendida no particular a recomendação de Dias (17): "deve preferir-se, para o xenodiagnóstico em determinada região, uma espécie local, ou melhor, o transmissor natural mais importante da moléstia, nessa região". Dentre as espécies de triatomídeos que melhor receptividade oferecem às raças brasileiras de *S. cruzi* destacam-se o *Panstrongylus megistus*, o *Eutritoma sordida* e o *Triatoma infestans*. Caldeira (11), afirma que, em Minas Gerais, estão preferindo o *T. vitticeps*, graças a sua maior avidez. Para amostras do parasito oriundas da Venezuela, o *Rhodnius prolixus* se revelou mais sensível (17).

b) — preferir exemplares de hemíptero nas fases de ninfa ou de larva na última muda, provado como está, que nesses estádios evolutivos são mais vorazes, podem sugar grande quantidade de sangue, apresentam pequena mortali-

dade, e possuem ainda um largo período de vida, permitindo uma prolongada observação.

c) — utilizar em cada prova diversos exemplares, via de regra, 3 a 6, *“a-fim-de que sejam maiores as possibilidades de de se conseguirem resultados positivos”* (17).

d) — somente usar “barbeiros puros ou limpos”, isto é, seguramente isentos de infecção, obtidos de criações feitas no laboratório sob os melhores cuidados, partidas de ovos oriundos de adultos seguramente não contaminados, porque, quanto a transmissão hereditária seja considerada impossível pela maioria dos autores (17 pg. 96), foi, contudo, admitida por Meyer (74, pág. 15).

e) — ter o cuidado de alimentar as criações de “barbeiros” em vertebrados (cobaios, cães e gatos jovens) absolutamente livres de infecção pelo *S. cruzi*, porque, do contrário, serão falseados os resultados da prova do xenodiagnóstico.

f) — fazer sugar o doente suspeito, durante 15 a 30 minutos, preferencialmente por larvas ou ninfas “em jejum”, vazias e famintas, *“pois terão maior probabilidade de realizarem uma sucção mais rápida e mais completa do que as ainda parcialmente cheias”* (17).

g) — conservar os insectos utilizados na prova, individualmente separados em tubos de vidro de boca larga, fechados com algodão ou gaze dupla e providos de tiras de papel de filtro ou mesmo de jornal, dobradas ao comprido, sobre as quais se movimentarão mais facilmente os hemípteros.

h) — examinar, periodicamente, ao microscópico, entre lâmina e lamínula, decorridos 20 a 30 dias da refeição sanguínea, o conteúdo intestinal dos “barbeiros”, colhido pela punção retal, por meio de pipetas capilares de vidro (técnica de Dias, ou pela simples compressão do abdome (César Pinto), seja pela dissecação do insecto, o que não é aconselhável antes de 40 dias, no mínimo. O exame, nos casos negativos, se de-

vem prolongar por 3 a 4 meses, porque às vèzes, sòmente tardiamente aparecem as formas metacíclicas do protozoário no intestino posterior do invertebrado.

Quanto ao significado do xenodiagnóstico ou "prova do barbeiro" na identificação de casos de Doença de Chagas, fica subordinado a umas tantas indicações. Assim, a percentagem de positividade é muito mais elevada nas formas aguda e sub-aguda da enfermidade, do que nas crônicas, fato êsse perfeitamente explicável, porque naquelas fases a presença do parasito na circulação periférica é muito mais frequente.

Do valor dessa prova, diz Brumpt, em 1939 (9): "*de toutes les méthodes c'est certainement le xenodiagnostic qui présente le plus d'avantages dans les enquêtes faites dans les régions éloignées des laboratoires d'études*".

Dias (15) afirma ser "*um dos melhores meios que possuímos para o diagnóstico etiológico da Doença de Chagas — e o diagnóstico etiológico desta enfermidade é o único indiscutível — sendo, talvez, aquele cuja aplicação maior simplicidade e segurança nos apresenta*". Essa opinião é confirmada, pelo mesmo autor (Dias), posteriormente (1940), ao dizer que o "*xenodiagnóstico é um processo muito valioso para o diagnóstico etiológico da Moléstia de Chagas*" (17).

Talice, Costa e Osimani (1930) declaram "*que o xenodiagnóstico permitiu o diagnóstico de casos que sería impossível ou muito difícil confirmar parasitológicamente pelo emprêgo de outros processos: gôta espessa e mesmo inoculação de sangue no rato: em um dos 6 casos estudados, sòmente foi positiva a gôta espessa depois de dois meses do xeno positivo*" (58).

Em trabalho porterior (1940), Tallice (70) acha que a "prova do barbeiro" não é "*um metodo pratico, como lo pretenden algunos autores. El numero, de infectados por el T. cruzi, asi demonstrado, no es, sin embargo, el real, porque el xenodiagnostico no revela infecciones antiguas, o las revela*

por excepcion (si se practicã en el momento de uma descarga tripanosomica en la sangre), asi como las formas cronicas”.

Mazza (1940), por seu turno, considera o xenodiagnóstico “un metodo engorroso y sucio, pues en general, defecan los insectos, una vez repletos de sangre y despiden repugnante olor, originando con frecuencia pápulas pruriginosas, algunas veces de prolongada evolucion, en el sitio de succión. Además se requiere, para su ejecucion conveniente, paciencia y tiempo del operador, para esperar la completa repleccion de los insectos, mantenidos debidamente hambrientos, y no todas las personas se prestan para su aplicacion. Aplicado en massas humanas, no es de valor el recurso para suministrar un dato real de la difusion de la infeccion chagasica” (34).

Muniz e Freitas (1946), embora não ponham em dúvida a valia do xenodiagnóstico no reconhecimento de casos nas fases sub-aguda e crônica, julgam-no um processo de “execução demorada, exigindo várias semanas para obtenção dos resultados, o que diminue de muito o valor prático que possa ter” (50).

Donde se conclue que a prova sugerida por Brumpt, como expedita, relativamente simples e bem aceita pelos doentes, encontra sua melhor aplicação nos primeiros meses da infecção, sendo de êxito incerto nas formas antigas da doença, porque o resultado positivo depende da “descarga hematogena de parasitos”, como acentuam Mazza e Jörg (41).

B -- LÍQUIDO CÉFALO RAQUEANO

Nas manifestações meningo-encefálicas da doença, pode-se encontrar o *S. cruzi*, no líquido céfalo raqueano, sendo por conseguinte, recomendável a sua pesquisa pelos métodos acima enumerados, nesse material, obtido por punção lombar ou sub-occipital.

Os exames de Burle Figueredo, Vilela e Bicalho (74), efetuados no sentido do diagnóstico de sífilis, em casos de Moléstia de Chagas, forneceram os seguintes dados: *aspecto* — límpido e incolor; *tensão* — muitas vèzes aumentada; *reações de globulinas* (Nonne-Apelt e Ross Jones) — negativas; *leucócitos* — não há aumento; *reação de Wassermann* — negativa. A reação de Machado-Guerreiro praticada no liquor proveniente de quatro casos da fôrma nervosa da esquizotripanose, foi positiva em três (Vilela e Bicalho — 74).

C — RASPADO CONJUNTIVAL

Nos enfermos portadores do chamado “sinal de Romana” ou conjuntivite esquizotripanósica unilateral, interpretada pelo seu autor como um síndrome que traduz, em todos os casos onde estiver presente, a porta de entrada do agente causal da doença (62 e 64) recomenda-se a pesquisa do parasito no material obtido pela raspagem da conjuntiva, onde é, a meúde, encontrado sob fôrma de leishmanias. Tal exame pode ser procedido “a fresco”, entre lâmina e lamínula, ou em esfregaços, fixados e tratados pelos corantes de Leishman, Giemsa, Wright, etc.

Não cabe, aquí, discutir a gênese da reação inflamatória conjuntival, si de origem exógena primitiva, como pretende Romana, ou si de natureza secundária, endógena, por propagação da flogose profunda, proveniente da cápsula de Tenon ou tecido celular orbitário, como quer Mazza (33). Basta que se transcreva a opinião dêsse último autor (Mazza), sôbre a importância do exame do raspado conjuntival: “*Hasta ahora la aplicacion del metodo del raspado conjuntival para diagnostico de la Enfermedad de Chagas, es de fuente arbitraria y conjetural expuesto a todos los fracasos de los procedimientos de origen autistica y no fundado en especulaciones practicas previas*” (36).

Admite, porém, esse autor que o chamado “sinal de Romana” ao qual prefere denominar “complexo oftalmoganglionar” possa ocorrer em 20% dos casos agudos de infecção chagásica.

D — BIOPSIA — ESTERNO PUNCTURA — VISCEROTOMIA

1 — *Biopsia* — A retirada de fragmento de “chagomas”, de gânglio linfático satélite, de músculo estriado (deltoide) ou mesmo de lesão cutânea, propicia valiosos elementos para o diagnóstico da tripanosomose americana, não só porque possa evidenciar a existência de protozoário, como também, pela descoberta de alterações celulares denunciadoras da infecção.

Mazza e colaboradores (40) distinguem três variedades de “chgomas” ou lesões tumorais; *chagoma de inoculação* ou câncer de inoculação, isto é, a manifestação primitiva que se constitui na porta de entrada da infecção cutânea pelo *S. cruzi*; *chagoma metastático* aquele que aparece em pontos da pele distantes e sem relação direta com a lesão inicial; *chagoma hematógeno*, a formação tumoral tradutora de um estado de “septicemia protozóica” ou esquizotripanemia. Todos revelam a mesma estrutura e aparência, originam-se de uma cito-esteato-necrose inflamatória, (descrita por Stultz), equivalente ao granuloma lipofágico de Lecene e Moulounguet, processo degenero-regenerativo do tecido adiposo, provocado pelo ataque do parasito ao tecido gorduroso e caracterizado pelos seguintes períodos: saponificação intracelular de gorduras neutras; ação de sabões e ácidos graxos sobre os elementos celulares; reação proliferativa e hipertrófica celular, dando granulomas que posteriormente se esclerosam, (Mazza e Freire — 37).

Além do quadro histológico típico, a pesquisa evidenciará formas do *S. cruzi*, sob o aspecto leishmaniforme, no interior, principalmente, de histiocitos. A retirada e posterior exame anátomo-patológico de gânglios linfáticos satélites (retro-mastoideu, axilar, etc.) de lesões tégumentares, fornecem valiosos subsídios para o reconhecimento do mal de Chagas, permitindo, até, o diagnóstico retrospectivo, porque o protozoário provoca um enfarte ganglionar de características originais, capaz de, por si próprio, identificar a enfermidade, mesmo na ausência de parasitos na trama histológica (*“éste infarto ganglionar corresponde a la Enfermedad de Chagas, aun en ausencia de parasitos en su trama histológica — Mazza, Benitez e Benitez — 1936 — pag. 53*) (39). Nos cortes de tais gânglios, são avistados de parceria com as células ganglionares, numerosas unidades parasitárias leishmaniformes (Mazza, Basso e Basso — 1942) (38). Versiani em Minas Gerais em preparações de gânglio linfático proveniente de biopsia, também encontrou formas de leishmania.

Ainda quanto a eficácia da biopsia ganglionar, vale a pena transcrever as seguintes palavras de Mazza (1938) (33): *“Es procedimiento de muy fieles resultados, no solamente quando se evidencien parásitos leishmaniformes en la trama tisidual, sino también cuando se aprecia la particular estructura histológica que puede reconocerse en los infartos ganglionares de la Enfermedad de Chagas”*. Para a pesquisa de parasitos no gânglio, pode éste ser puncionado com seringa estéril, confeccionando-se preparações coradas, ou não, com o líquido ou suco assim obtido.

Conhecida a predileção do *S. cruzi* pelas fibras dos músculos estriados, demonstrada desde Gaspar Viana, em 1911, podemos promover a colheita, por biopsia, de amostras das massas musculares mais acessíveis (perna, dorso e braço) onde será relativamente fácil descobrir o agente causal da moléstia,

dando-se preferência ao deltoíde, pela sua maior acessibilidade.

Material procedente de manifestações cutâneas polimorfas (esquizotripanides), ainda obtido por biopsia, serviu à Mazza e Miyara (1940), para comprovar, histologicamente, a natureza chagásica da infecção em sua fase aguda (40).

2 — *Esterno punctura* — Jospin e Gallais (1938) (25) lançaram mão da punção esternal (esterno punctura), que bem pode ser considerada uma variante de biopsia, para a pesquisa do *Trypanosoma gambiense* na medula óssea, em casos de Moléstia do Sono. Essa técnica, preconizada como processo de rotina por Van den Branden, na tripanosomose africana forneceu a Robin e Brochen (1939) (60), nessa mesma parasitose, 46 resultados positivos em 60 exames procedidos, o que corresponde a 76.6% de positividade. Mesmo assim, estes últimos autores ainda preferem a pesquisa no suco ganglionar, onde alcançaram 91.6% de êxitos positivos.

Graças à esterno punctura, conseguiram Floch e Tasqué, em 1940 (21) identificar o primeiro caso de esquizotripanose na Guiana Francesa, pelo achado de formas leishmânicas de *S. cruzi* na medula óssea do esterno.

Aplicada, pela primeira vez no Brasil, por José Paula Silva (*apud* Rocha Azevedo — 1945) (61) no diagnóstico da Moléstia de Chagas, a esterno punctura resultou positiva em criança com cinco anos de idade, na qual a reação de Machado se revelou fortemente positiva (+ + +).

3 — *Viscerotomia* — A viscerotomia, tão largamente empregada para o diagnóstico post-mortem da febre amarela, pela Fundação Rockefeller, deve ser recomendada na descoberta de casos de Doença de Chagas (Mazza — 1940 a) (35). Dois órgãos, o coração e o fígado, merecem as preferências para a colheita de material com o viscerótomo, porque neles

sedeiam lesões típicas, patognomônicas da infecção chagásica: a degeneração ceróide (lesão de Margarinos Torres) e o granuloma endotelióide (lesão de Mazza), também determinada "histiocitose nodular" (lesão de Mazza e Jörg).

A primeira, descrita em 1917, por Tórres (71), em magistral publicação sobre as alterações parenquimatosas do miocárdio, na forma aguda da Doença de Chagas, caracteriza-se pela confluência cromatófila dos segmentos obscuros da estriação miofibrilar cardíaca, com perda da aparência normal". Crê Margarinos Tórres que essa degeneração não depende de uma ação direta do *S. cruzi*, e, sim, representa a consequência de perturbações da circulação. Degenerações granulosa e gordurosa foram, também, registradas pelo mesmo autor, no coração parasitado pelo tripanosoma. Todo esse quadro histopatológico provém, ainda na opinião de Tórres, de uma "miocardite exsudativa, em evolução contínua e progressiva". O granuloma nodular (lesão de Mazza ou de Mazza e Jörg) observada pela primeira vez em 1934 no fígado de cão inoculado com *S. cruzi*, teve posteriormente (1937) ampla confirmação em material humano, colhido de caso mortal agudo, que serviu de assunto à publicação de Mazza, Basso e Basso (38). Na interpretação dessa lesão, assim se expressa Mazza (1940 a) (35): "Esta histiocitose nodular com ou sem parasitos, revela sucessivas fases da infecção hepática pelo *Trypanosoma cruzi* como condensação da lesão granulomatosa difusa do ataque inicial e que culmina em abundante macrofagia de elementos leishmanióides nas células do retículo, com grande infiltração parvicelular. Desaparecidas as leishmânias, permanece como lesão tecidual hepática um simples foco infiltrativo, entre cujos elementos persistem algumas células do retículo, hipertróficas ou degeneradas".

E — REAÇÕES ALÉRGICAS

Das provas com fundamento em fenômenos alérgicos e passíveis de aplicação no diagnóstico da Moléstia de Chagas, devemos referir as seguintes: cutireação, intradermoreação de Montenegro e a prova de Shwartzman.

1 — *Cutireação* — Servindo-se de antígeno aquoso de coração de animais experimentalmente infectados como reagente, Marques da Cunha e Vilela (1919 — 1920) tentaram a cutireação em casos de esquizotripanose, sem obterem resultados apreciáveis (74).

2 — *Intradermoreação* — Em 1919 — 1920 Marques da Cunha e Vilela (74), com extrato aquoso fenicado de coração de cães jovens infectados com *S. cruzi*, ensaiam pela primeira vez, a intradermoreação em casos de Doença de Chagas, não alcançando êxitos concludentes. Wagener (75), em 1923, usando extrato alcalino de culturas de *Leishmania trópica* e *L. infantum*, lavadas em água fisiológica, centrifugadas, adicionadas de líquido de Coca — solução de cloreto de sódio a 0.5% com 0.4% de bicarbonato de sódio — e cobertos de toluol) praticou reações cutâneas em casos de leishmaniose.

No ano seguinte (1924) Vilela e Bicalho (74) com antígeno aquoso glicerinado fazem novas tentativas em 16 doentes, sem melhores resultados. Dois anos mais tarde (1926) Montenegro (44), modificando a técnica do preparo do antígeno de Wagener, pela supressão do toluol e adição de 0.4% de fenol, injeta 0.2 de centímetro cúbico, por via intradérmica em casos de leishmaniose brasileira; decorridas 24 horas, será positiva a reação si em tórno do ponto da inoculação, aparecer área circular vermelha, congestionada, endurecida, desaparecendo, lentamente, depois de vários dias

Gomes (23) lembrou-se de praticar (1939) intradermoreações com suspensão aquosa fluoretada e fenicada de *S.*

cruzi em doentes que reagiram fortemente ao antígeno de Montenegro, sendo tôdas negativas, após 48 e 72 horas de observação.

Pessoa e Pestana (1940) (56) repetindo as experiências de Gomes, chegaram a resultados discordantes, porque os leishmaniósicos inoculados com antígenos de leishmânias e de esquizotripanos, sempre reagiram positivamente a ambos os extratos. Mayer e Pifano (1941) (31), colhendo n'água de condensação de meio N N N fórmulas culturais de *S. cruzi* e *Leishmanias* preparam dois antígenos ("Cruzin" e "Leishmanin") lavando-as três vêzes em água fisiológica, centrifugando e emulsionando em soluto cloretado, fenicado a 0.5%. Com êsses extratos fizeram intradermo-reações em 6 casos de Moléstia de Chagas e 5 doentes de Leishmaniose, chegando aos seguintes resultados: nos *chagásicos* — reações fortemente positivas com o "Cruzin" e formação de nódulos discretos e não característicos com o "Leishmanin"; nos *leishmaniósicos* — reações fortemente positivas com "Leishmanin" e completamente negativas com "Cruzin". Conferem tais autores grande valor prático à intradermoreação no diagnóstico da Moléstia de Chagas, julgando-a mais segura que a fixação do complemento (Machado-Guerreiro) e, pelo menos, equivalente ao xenô, sendo mais rápida que êste.

No ano imediato (1942), Pessôa e Cardoso (57) procedem interessantes experiências com suspensões de *Leishmania brasiliensis* e de *S. cruzi* preparadas segundo técnica de Gomes (23) chegando às seguintes curiosas conclusões: 1 — "em doentes de Moléstia de Chagas, resultou negativa a inoculação intradérmica de antígeno, seja de *Leishmania brasiliensis*, seja de *Trypanosoma cruzi*"; 2 — doentes de leishmaniose tegumentar reagiram positivamente à intradermo-reação, quando inoculados com antígeno, seja de *L. brasiliensis*, seja de *T. cruzi*".

Muniz e Freitas (1944), com diversos tipos de alérgenos oriundos de culturas de *S. cruzi* (autolizado, suspensão formulada a 0.2%, fenicada a 0.5 ou mertiolada a 1:10.000, polisacarídeo), chegam a resultados absolutamente negativos, em tôdas as intradermo-reações efetuadas em 6 casos de Doença de Chagas, 4 da forma aguda, confirmados pelo exame de sangue "a fresco", e 2 da fase crônica, ambos com xenodiagnóstico positivo, e concluem pela "*não existência, nessa doença, de um estado alérgico em relação às formas do parasito desenvolvido nas culturas e à fração polissacarídeo*" (48) e estranham os brilhantes êxitos alcançados por Mayer e Pifano, com "*simples suspensão de formas de cultura em soluto fisiológico fenicado a 0.5%*."

Caldeira e Peres (11), em Belo Horizonte, alcançam, também, resultados completamente negativos (1945).

Da mesma opinião se manifestam Dias, Laranja e Nóbrega (1946), ao declararem que "*a intradermoreação não constitue um meio diagnóstico preciso, e seus resultados têm sido contraditórios. Na maioria dos casos em que a temos aplicado, ela foi negativa ou duvidosa*" (19).

III — *Prova de Shwartzman* — Em 1937, Gregory Shwartzman (59), estudando a reatividade local dos tecidos vivos, descreve a seguinte interessante experiência: "*Um coelho recebe na pele do abdomen, uma ou mais injeções intradérmicas de filtrado de cultura de bacilo de Eberth (Eberthella typhica), as quais não produzem ou apenas provocam ligeira reação local; 24 horas depois, inocula-se, por via intravenosa, outra dóse do mesmo filtrado: as zonas anteriormente injectadas, por via intradérmica, transformam-se em focos inflamatórios agudos, intensamente necrótico-hemorrágicos*".

Repetindo com protozoário (*S. cruzi*) a observação acima Mazza e Jörg (1940) (41) verificaram que, usando em cães jovens, extrato de culturas daquele flagelado, em meio de

Bonacci, modificado por Kleser, se provocava o aparecimento de nódulos de histiocitose, absolutamente isentos de parasitos, porém de estrutura idêntica àqueles produzidos na infecção natural e experimental dessa tripanosomose, ricos, estes em fórmias parasitárias.

Dos êxitos dêsses autores argentinos, discordam as verificações de Pessoa e Cardoso (57), os quais, em 1942, em cobaios prèviamente sensibilizados por via intra cardíaca com *L. brasiliensis* obtêm reações positivas quando inoculadas por via intradérmica com antígeno homólogo ou de *T. cruzi*; ao passo que em outra série daqueles animais (cobaios) antecipadamente inoculados no coração em *S. cruzi*, a injeção intradérmica de alérgeno homólogo ou de *L. brasiliensis*, foi sempre negativa.

CONCLUSÕES

Dos vários métodos sugeridos como recursos auxiliares do diagnóstico clínico da Moléstia de Chagas, e aquí passados em revista, alguns são de todo inexpressivos, outros, porém, oferecem subsídios inestimáveis para confirmação dos casos suspeitos, tudo dependendo da oportunidade de sua aplicação às diversas fases evolutivas da moléstia. Ao observador esclarecido e ao clínico avisado cabe decidir de sua escôlha, valendo-se da farta documentação arrolada no presente trabalho e preferindo aqueles mais recomendáveis e que melhores perspectivas de êxito propiciem à elucidação definitiva dos supostos portadores de infecção chagásica.

Bahia, 31 de Janeiro de 1947.

SUMMARY

The author passes in review all the methods suggested to help clinical diagnosis of suspected cases of Chagas' disease (*American trypanosomiasis*) in its various stages (acute, subacute and chronic). With such purpose he studies the blood examination, the Brumpt's xenodiagnosis, the serological reactions, (complement-fixation, precipitin-test, agglutinin-test, formol-gel, mercuric-chloride test), the allergic reactions (skin-reaction, intradermal-reaction and Schwartzman's phenomena), the more important histopatologic lesions and the many ways to find them (biopsy, sternal puncture and viscerotomy). Finally, he gives the more complete and up to date bibliography on the subject.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BACIGALUPO J. — 1936 — Xenodiagnostic en la enfermedad de Chagas — Rev. Sanidade Militar — Buenos Aires — Argentina — 1033.
- 2 — BARROS BARRETO A. L. E PONDÉ A. — 1945 — Doença de Chagas na Bahia — Dois casos parasitológicamente confirmados — Brasil-Médico — 59:46 e 47:394 — 397:6 figs.
- 3 — BARROS BARRETO A. L. — 1945.
Provas laboratoriais no diagnóstico da Moléstia de Chagas.
Anais Segundo Congresso Médico Paulista — 2:404 — 408.
- 4 — BASSO G. E BASSO R. — 1935 — Estudio de enfermos del Asilo de Mendigos de Mendoza con reaccion de Machado positiva — Novena Reunion Soc. Pat. Reg. del. Norte — (Mendoza) — Argentina 1936 — 454 — 516:22 figs.
- 5 — BAYMA T. — 1914 — Moléstia de Carlos Chagas — An. Paul. Med. Cir. — 4:3:57 — Rev. Med. São Paulo — 17:1:3.
- 6 — BLACKLOCK B. E YORKE W. — 1922 — The trypanosomiasis — in Byam and Archibald — Practice of Medicine in the tropics — 2:1386.
- 7 — BONACCI H. — 1934 (Março) — Nuevo medio de cul-

- tivo para el *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. — Rev. Inst. Bact. — Buenos Aires — 6:2:242 — 247.
- 8 — BRASIL A. — 1946 (Fev.) — Forma cardíaca crônica da Doença de Chagas — O Hospital — 29:2:199 — 143:23 figs.
- 9 — BRUMPT E. — 1914 — Le xenodiagnostic. — Applications au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier á la trypanosomose de Chagas — Bul. Soc. Path. Exot. Paris — 7:706 — An. Paulistas Med. e Cir. — 3:97.
- 10 — BRUMPT E. — 1939 — (Jul. 8) Quelques faits epidemiologiques concernant la maladie de C. Chagas — Presse Med. — 54:1081 - 1085:14 figs.
- 11 — CALDEIRA O. C. — 1945 — Anais Segundo Congresso Paulista — 2:411 - 412.
- 12 — CARDOSO F. A. — Reação de fixação do complemento na tripanosomiase americana experimental da cobaia, feita com cultura de *Trypanosoma cruzi* Chagas (1909). (tipo Kelser) — Bol. Inst. Hig. — São Paulo. — n.º 79.
- 13 — CARDOSO F. A. e NAVAJA S. E. — 1941 — Achado de dois cães naturalmente infectados pelo *T. cruzi* Chagas, 1909, no Município de Itaporanga, S. Paulo. — Presença na mesma localidade de *Triatoma infestans* (Klug, 1834) infectado pelo *T. cruzi* — Rev. Clínica — S. Paulo — 9:6:179-187.
- 14 — DAVIS D. J. — 1943 (Maio) — A stable trypanosome complement fixing antigen — Public Health Rep. — 58:20:775-777.
- 15 — DIAS E. — 1935 — Xenodiagnóstico e algumas verificações epidemiológicas na Moléstia de Chagas. Novena Reu. Soc. Argentina Patol. Reg. Mendoza — 1936 — 1:91 - 119; figs. 1-3.

- 16 — DIAS E. — 1938 — Xenodiagnóstico positivo durante 16 anos (em dois casos) — *Compt., Rend., Soc., Biol.* 129:430-432.
- 17 — DIAS E. — 1940 — Técnica do xenodiagnóstico na Moléstia de Chagas — *Mem. I. O. C.* — 35 (2); 335 - 342; est. 1 - 2.
- 18 — DIAS E. — 1940 (Dez. 28) — Série de xenodiagnóstico em cães infectados com raças Venezuelanas de *S. cruzi* — *Brasil-Med.* — 54:859-861.
- 19 — DIAS E., LARANJA F. S. E NOBREGA G. — 1945 — Doenças de Chagas — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)* — 43:3:495 - 582: 49 figs.
- 20 — DUSSERT E., FALQUENBAUM J. E RODRIGUEZ A. N. — 1939 — (Julho-Dezembro) Reação de Machado no Chile; relatório preliminar — *Rev. Chil. Hig. Med. Prev.* — 2:197 - 203.
- 21 — FLOCH H. E TASQUÉ P. — 1940 — Un cas de Maladie de Chagas em Guyane Française. — *Inst. Pasteur de la Gutane et du Terr. de l' Inini* — 2:1 - 4.
- 22 — CASIC LIVACIC G. — 1939 (Julho-Dezembro) — Primeiro caso de Doença de Chagas confirmado pelo xenodiagnóstico em Domeyko — *Rev. Chilena Hig. Med. Prev.* — 2:211 - 214.
- 23 — GOMES L. S. — 1939 — intradermereação nas leishmanioses e outras pesquisas afins — *Brasil-Médico* — 53:49:1079 - 1087.
- 24 — GUERREIRO C. E MACHADO A. — 1913 (Junho) — Da reação de Bordet-Gengou na moléstia de Chagas como elemento diagnóstico — *Brasil-Médico* — 27 (23); 225-226.
- 25 — JOSPIN Y E GALLAIS — 1938 — (Out. 12) — Diagnostic par la ponction sternale, d'une forme mentale

- pure de trypanosomiase humaine — Bull. Soc. Pat. Exot. (Paris) — 31:710-713.
- 26 — KELSER R. A. — 1936 (Julho) — A complement-fixation test for Chagas disease employing an artificial culture antigen — Am. Jour. Trop. Med. — 16:405-415.
- 27 — LACORTE J. G. — 1926 — A reação do complemento na Moléstia de Chagas — Tese Fac. Med. Rio de Janeiro — Mem. I. O. C. 20:2:197: figs. 105-122.
- 28 — LACORTE J. G. — 1938 — A reação de Machado na Moléstia de Chagas — Ata médica — Rio de Janeiro — 3:1:264-274.
- 29 — LEÃO A. E. A. — 1923 (Set. 30) — Do diagnóstico das tripanosomoses pela reação do desvio do complemento. *Sciencia Medica* — (Rio de Janeiro) — 1:3:126.
- 30 — MACHADO D. — 1940 (Maio) — Diagnóstico laboratorial na Doença de Chagas — Rev. Flum. Med. — 5:163-165.
- 31 — MAYER M. e PIFANO C. F. — 1941 (Maio, 3) — Diagnóstico da Moléstia de Chagas pela intradermoreação com cultura de *S. cruzi* — Brasil-Med. — 55:18: 317-319.
- 32 — MAZZA S. — 1935 — Positividad de la reaccion de Machado-Guerreiro con sueros de enfermos de Leishmaniosis tegumentaria americana — Novena Reun. Soc. Pat. Reg. del Norte (Mendoza) — 1936 — 560-565.
- 33 — MAZZA S. — 1938 — Instrucciones para el diagnostico de laboratorio de Enfermedad de Chagas. Instruccions n.º 1 MEPRA.
- 34 — MAZZA S. — 1939 (Dez. 20) — Valor da viscerotomia cardio-hepatica no diagnostico da Doença de Chagas — Prensa Med. Arg. — 26:2461-2470.

- 35 — MAZZA S. — 1940 a — Metodos de investigacion de la epidemiologia de la enfermedad de Chagas — La viscerotomia cardio-hepatica — Publ. 43 — Mission de Estudios de Patologia Regional Argentina (M. E. P. R. A.) 3 - 19; figs. 1 - 7.
- 36 — MAZZA S. — 1940 b — Enfermedad de Chagas en San Juan. — Consideraciones generales — Publ. 43 — Mission de Estudios de Patologia Regional Argentina (M. E. P. R. A.) — 20 - 35 figs. 2.
- 37 — MAZZA S. e FREIRE R. — 1940 — Manifestaciones de inoculacion, metastaticas y hematogenas en Enfermedad de Chagas. — Chagomas de inoculacion, chagomas metastaticos y chagomas hematógenos — (M. E. P. R. A.) Pub. n.º 46.
- 38 — MAZZA S., BASSO G. e BASSO R. — 1942 — Investigaciones sobre enfermedad de Chagas. — Enfermedad de Chagas en primer periodo, diagnosticada exclusivamente por biopsia de ganglio linfatico con hallazgo de parasitos leishmaniformes — (M. E. P. R. A.) Mission de Estudios de Parasitologia Regional Argentina) — 63:3 - 48.
- 39 — MAZZA S., BANITEZ e BENITEZ J. — 1936 — Diagnostico retrospectivo de enfermedad de Chagas, forma aguda, por examen anatomopatologico de ganglio axilar — Publ. 28 — Mission de Estudios de Patologia Regional Argentina (M. E. P. R. A.) — 47 - 53.
- 40 — MAZZA S. e MIYARA S. — 1940 — Enfermedad de Chagas aguda con chagoma de inoculacion y esquizotripanide polimorfa, comprobado por histopatologia de biopsia de la lesion cutanea — (M. E. P. R. A.) — 46: 85 - 104.
- 41 — MAZZA S. e JÖRG M. E. 1940 — (Nov. 13) — Perio-

- dos anatômico-clínicos na Doença de Chagas — Prensa Med. Arg. — 27:2361 - 2363.
- 42 — MINNING W. — 1935 — (Agosto) Zur spezifität der Komplement-Bindung Reaktion bei der americanischen Tripanosomiasis (Chagas Krankheit) — Arch. f. Schiff. u. Trop. Hyg. — 39:8:315 - 328.
- 43 — MIYARA S. — 1936 — Enfermos con reacion de Machado positiva determinados en la provincia de San Luis — Novena Reunion Soc. Pat. Reg. del Norte — 422 - 438; figs. 1 - 9.
- 44 — MONTENEGRO J. — 1926 — A cuti-reação na leishmaniose — An. Fac. Med. Univ. S. Paulo — 1:323 - 330.
- 45 — MUNIZ J. — 1930 — Del uso del antigeno Watson (*Trypanosoma equiperdum*) en la reacion de desviacion del complemento en la enfermedad de Chagas — Quinta Reunion Soc. Arg. Pat. Re. del Norte — (Jejuy) — 897 - 901.
- 46 — MUNIZ J. e BORRIELLO A. — 1945 (dez.)E — Estudo sôbre a ação lítica de diferentes soros sôbre as formas de cultura e sanguícolas do *S. cruzi* — Rev. Bras. Biol. — 5:4:563 - 576.
- 47 — MUNIZ J. e FREITAS G. — 1944 — 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 (Rio de Janeiro) — 4:2:303 - 333: 1 fig.
- 48 — MUNIZ J. e FREITAS G. — 1944 (Dez.) — Idem II — Isolamento de polissacarídeos de *S. cruzi* e de outros tripanosomídeos; seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade — Os "tests" de floculação (sublimado e for-

- mol-gel) — Rev. Bras. Biol. (Rio de Janeiro) — 4:4: 421 - 438.
- 49 — MUNIZ J. E FREITAS G. — 1945 (Dez.) — Estudo sobre o determinismo da transformação das formas sanguícolas do *S. cruzi* em critídias. — I. da existência de um fator responsável por essa metamorfose — Rev. Bras. Med. 2:12:995 - 998.
- 50 — MUNIZ J. E FREITAS G. — 1946 (Out. 19 e 26) — Estudos sobre a imunidade humoral na Doença de Chagas Brasil-Médico — 60:42 e 43.
- 51 — PACKCHANIAN A. — 1935 Agglutination and precipitation tests for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) — Jour. Immunolog. — 29:1:84 - 85.
- 52 — PACKCHANIAN A. — 1940 (Nov. 15) — Experimental production of agglutinins for *Tryp. cruzi* — Publ. Health Rep. — 55:2116 - 2124.
- 53 — PATTO O. — 1931 — Fixação do complemento no bócio endêmico — An. Fac. Med. Univ. Minas Gerais — 3:1:95.
- 54 — PEDREIRA DE FREITAS J. L. — 1946 (Março) — Inquérito preliminar sobre Moléstia de Chagas no Município de Cajuru (Estado de São Paulo, Brasil) — O Hospital — 29 - 2 - 155-156.
- 55 — PEDREIRA DE FREITAS J. L. — 1946 (Março) — Inquérito preliminar sobre Moléstia de Chagas no Município de Franca (Estado de São Paulo, Brasil) — Rev. de Med. (S. Paulo) — 30:147:181 - 185:2 figs.
- 56 — PESSOA S. B. E PESTANA F. A. — 1940 — (Nov. e Dez.) — A intradermo-reação de Montenegro nas campanhas sanitárias contra a leishmaniose — São Paulo Médico — 23:2:5 e 6:133 - 135.
- 57 — PESSOA S. B. E CARDOSO F. A. — 1942 — (Fev.) —

- Nota sôbre a imunidade cruzada na leishmaniose tegumentar e na moléstia de Chagas — Hospital — 21:2 187 - 193: 2 figs.
- 58 — PONDÉ R., MANGABEIRA FILHO O. E JANSEN G. — 1942 — Alguns dados sôbre a leishmaniose visceral americana e Doença de Chagas, no nordeste brasileiro — Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) — 77:3: 333: 17 figs.
- 59 — RAMOS JÚNIOR J. E LAUS FILHO J. A. — 1946 (Fev.) — Miocardite crônica na tripanosomiase americana — O Hospital — 29:2:231 - 250: 14 figs.
- 60 — ROBIN C. E BROCHEN L. — 1939 (Out. 11) — Le diagnostic de la trypanosomiase humaine par ponction de la moelle osseuse — 60 esterno-puncturas em tripanosomose. Bull. Soc. Path. Exot. — 32:830 - 835.
- 61 — ROCHA AZEVEDO L. G. — 1945 — Patogenia da Moléstia de Chagas — Anais Segundo Congresso Médico Paulista — 2:377.
- 62 — ROMANA C. — 1935 — Acerca de un sintoma inicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas — La conjuntivitis esquizotripanosica unilateral — M E P R A — publ. n.º 22 — pages. 16-28; 8 figs.
- 63 — ROMANA C. E DIAS E. — 1942 — Reação de fixação do complemento na Doença de Chagas, com antígeno alcoólico de cultura do *Schizotrypanum cruzi* — Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) — 37:1-10.
- 64 — ROMANA C. — 1939 (Abril 4) — Reproduction chez le singe de la "conjunctivite schizotripanosomienne unilaterale". — Soc. Pathol. Exot. Paris — 32:4:390 - 394.
- 65 — SENEKJIE H. A. — 1943 — Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infections — II. Slide

- agglutination and intradermal tests — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. — 34:2:56-59.
- 66 — SHWARTZMAN G. — 1937 — Phenomena of local tissue reactivity — 461 pags., 47 figs.
- 67 — SOUZA, CAMPOS E. — 1929 — Estudo sôbre anatomia patológica do gânglio linfático na tripanosomíase americana experimental. Alterações do sistema retículo endotelial, etc. — An. Fac. Med. São Paulo — 4: 75-90: 8 figs.
- 68 — TALIC7 R. V., COSTA R. S. E OSIMANI J. J. — 1939 — Novos casos de Doença de Chagas, nos Depts. de Rivera, Tacuambó e Soriano, confirmados pelo Xeno-diagnóstico — An. Fac. Med. Montevideo — 24:799-804.
- 69 — TALICE R. V. E RIAL B. — 1940 — Forma subaguda de Doença de Chagas confirmada pelo xenodiagnóstico; nono caso — An. Fac. Med. Montevideo — 25:1078-1082.
- 70 — TALICE R. V. — 1940 — Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) — Montevideo.
- 71 — TORRES C. B. M. — 1947 — Estudo do miocárdio na Moléstia de Chagas (fórma aguda). Alterações parenquimatosas — Tese — Fac. Med. Rio de Janeiro — 98 págs., ests. 1-2.
- 72 — VERSIANI O. — 1944 — Diagnóstico diferencial da Doença de Chagas — Resenha Clínico-Científica (S. Paulo) — 13:7:10 figs. (Julho, 1944).
- 73 — VERSIANI O. E JUNQUEIRA M. — 1943 — Adenopattias chagásicas — Brasil Médico — 57:12 e 13 (20 e 27 de Março) — 3 figs.
- 74 — VILELA E. E BICALHO C. — 1923 — As pesquisas de laboratório no diagnóstico da Moléstia de Chagas —

Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) — 16:1:
13:1-10 figs.

- 75 — WAGENER E. H. — 1923 (Dez.) A skin reaction to ex-
tracts of *Leishmania tropica* and *L. infantum*. — Uni-
versity of California Publications in Zoology — 20:
22:477.
-