

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

pelos Drs.

Julio Muniz e Gilberto de Freitas

(Com uma figura no texto)

O estabelecimento de um centro de estudos da doença de Chagas (*Trypanosomiasis americana*), pelo Instituto Oswaldo Cruz, na cidade de Bambuí, Estado de Minas Gerais, nos facilitou a obtenção de material abundante para um estudo comparativo do valor diagnóstico das diversas reações de imunidade nessa doença.

Neste primeiro trabalho iremos expor os resultados a que chegamos em relação às reações de fixação de complemento e aglutinação. Não exporemos aqui a revisão bibliográfica sobre o assunto cujos dados figuram no final do nosso trabalho, o mesmo acontecendo em relação com as numerosas experiências que fomos obrigados a fazer com o fim de escolher entre as várias técnicas propostas, aquelas que esses ensaios nos evidenciaram serem as que resultados mais constantes e seguro ofereciam.

Somos de opinião, em vista dos resultados já obtidos com estas reações no diagnóstico da *Trypanosomiasis americana*, que elas não devam constituir somente assunto de pura especulação científica mas passem após uma necessária standardização para o domínio dos trabalhos de rotina dos laboratórios clínicos, não só dos grandes como dos pequenos centros populosos do país, pois o estudo de tão importante endemia deve constituir preocupação constante não só dos higienistas como dos clínicos das regiões onde ela é encontrada.

(*) Recebido para publicação a 4 de setembro de 1944 e dada à publicidade em outubro de 1944.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Reação de fixação de complemento — Das reações sorológicas utilizadas para fins diagnósticos a única que tem sido mais estudada na *Tripanosomíasis americana* é a de fixação de complemento. Do seu valor falam os numerosos trabalhos publicados a respeito. Apesar disso ela ainda não se apresenta com as características de uma reação do tipo standard como devem ser tôdas aquelas de aplicação rotineira e isso é devido a não se ter ainda fixado qual dos antígenos até hoje estudados oferece resultados mais constantes e seguros. As numerosas técnicas que vem sendo propostas para o preparo dêsse componente, demonstram claramente êsse fato.

O primeiro antígeno usado foi o proposto por Guerreiro e Machado, em 1913, e era preparado com vísceras de animais jovens (Cão) intensamente infectados pelo *Schizotrypanum cruzi*. Tais antígenos que tiveram o grande mérito de demonstrar as possibilidades desta reação no diagnóstico da moléstia de Chagas foram quase completamente abandonados apesar de variarem as técnicas propostas par seu preparo, por não apresentarem estabilidade e serem dotados de um poder fixador muito variável, além de não possuírem características de especificidade devido à complexidade de sua composição. Antes do aparecimento do trabalho de Kelsner várias tentativas foram feitas com o fim de utilizar culturas de *Schizotrypanum* no preparo de antígenos mas os resultados obtidos foram medíocres devido ao emprêgo de suspensões pobres de parasitas dada a dificuldade de obtenção de culturas abundantes com os meios então empregados para o seu cultivo. Em 1936 Kelsner propôs uma nova técnica para preparo de um antígeno hidroglicerinado, partindo de culturas ricas obtidas por êle, utilizando o meio de Bonacci. Com êsse antígeno obteve Kelsner ótimos resultados, trabalhando com soros de indivíduos portadores da doenças de Chagas, fáto êsse depois confirmado por outros pesquisadores utilizando a mesma técnica. Romaña e Dias em 1942 descreveram um processo para preparo de um antígeno alcoólico partindo de formas de culturas prèviamente tratadas com acetona. Recentemente em 1943, Davis utilizando como conservador uma solução de mertiolato a 1/10.000 em soluto fisiológico, propôs uma nova técnica para o preparo do antígeno, partindo de culturas obtidas no meio de Bonacci e que são submetidas à ação de baixa temperatura após suspensão no líquido conservador.

Reação de aglutinação — A não ser o trabalho de Packchanian (1940), que trata do preparo de soros aglutinantes e da pesquisa de aglutininas para o *Schizotrypanum cruzi* em soros de cobaios infectadas experimentalmente, não só com êstes tripanosoma como com o *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma hippicum*, e o de Senekjie (1943), que investiga a questão da presença

de aglutinininas para os antigenos somatico e flagellar do *Sch. cruzi* nos sôros de coelhos imunizados experimentalmente, nenhum estudo foi feito com relação a esta reação de imunidade na doença de Chagas. Deve-se isto, com tôda a certeza, às dificuldades existentes até a pouco tempo na obtenção de culturas abundantes de *Schizotrypanum cruzi*, sem as quais difícil se torna qualquer trabalho sistemático sôbre o assunto. O próprio Packchanian, nos seus estudos, utilizou da técnica de cultivo no meio de N.N.N.

Outra dificuldade para o estudo desta reação é representada pelo fâto de certas amostras de *Schizotrypanum cruzi*, quando recentemente isoladas, e ainda não perfeitamente adaptadas ao meio artificial de cultivo, apresentarem uma tendência para aglutinação espontânea, quando em presença de um eléctrolito como cloreto de sódio, o que torna de todo impossível o seu emprego nas provas de aglutinação.

Marques da Cunha teve ocasião de verificar êste fâto, com grande constância, nas amostras de *Leishmania brasiliensis* recentemente isoladas e que só perdem esta propriedade após serem mantidas por repiques sucessivos, 4 a 6 meses nos meios artificiais de cultura.

Tivemos também ocasião de verificar em relação ao *Schizotrypanum cruzi*, que as culturas de uma mesma amostra obtida em meio líquido apresentam maior tendência a aglutinação espontânea que aquelas feitas num substrato sólido.

Das seis amostras de *Schizotrypanum* que possuímos atualmente, e das quais cinco são recentemente isoladas de casos humanos, três delas (Expedito, Oswaldo Barboza e Raymunda) apresentam uma tendência, embora moderada, para a aglutinação espontânea, enquanto as outras dão suspensões perfeitamente homogêneas em soluto fisiológico. As emulsões mortas, quer por agentes físicos, como químicos (formol, acido fênico, mertiolato, etc.), apresentam uma maior resistência a aglutinação que as suspensões vivas, necessitando um tempo muito mais longo (24 horas) para a observação do fenomeno quando elas são utilizadas nas provas de aglutinação. As suspensões em soluto fisiológico das culturas vivas para uso nas reações de aglutinação pôdem ser guardadas a temperatura de 5° C., durante uma semana e no decorrer dêste prazo, podem ser utilizadas perfeitamente nas reações, sem demonstrar nenhuma variação no seu poder de aglutinar. Após a permanência por 24 a 48 horas nessa temperatura as suspensões de culturas que apresentam uma moderada tendência a aglutinação espontânea mostram-se homogenas, conservando-se assim, mesmo depois de readquirirem a temperatura do laboratório ou serem submetidas a uma temperatura de 37.° C. O exame dessas suspensões revela os parasitos com a mobilidade ligeiramente diminuida. Em nossas pesquisas sôbre aglutinação com soros de

doentes de *Trypanosomiasis americana* e trabalhando com três amostras diferentes de *Schizotrypanum*. nunca observamos variações no poder de se aglutinar dessas amostras, quando em presença de um mesmo soro, a não ser quando em presença de soros específicos preparados com uma determinada amostra, e assim mesmo as variações observadas foram pequenas. Soros de alto poder aglutinante podem ser obtidos com facilidade em coelhos, bastando para isso três injeções de emulsão morta pelo formol e cinco a seis injeções de uma emulsão viva, rica em parasitas. A via de escolha é a venosa e a intervalo a observar entre as injeções, de 3 a 4 dias, podendo-se obter desta maneira soros aglutinantes com títulos de 1/50.000.

ENSAIOS PRELIMINARES

O nosso primeiro cuidado antes de procedermos ao estudo comparativo a que nos propusemos, entre as duas reações, a de fixação de complemento e a de aglutinação, na doença de Chagas, foi de verificar por meio de numerosos ensaios qual a técnica a seguir no preparo de um antígeno que apresentasse, além dos atributos imprescindíveis a esse tipo de reagente (sensibilidade, especificidade e pequeno poder anticomplementar) o de estabilidade, levando em conta o fato de representar a reação, da qual ele é um dos componentes, uma reação de rotina.

Com material abundante obtido de culturas de três amostras de *Schizotrypanum cruzi* (duas recentemente isoladas de casos humanos, amostra Elvira e amostra Raymunda, e uma mantida a longo tempo em cultura, amostra Tatu) preparamos por diferentes processos diversos tipos de antígenos, a saber:

- 1) Suspensão em soluto hidroglicerinado (segundo técnica de Kelsner).
- 2) Suspensão em soluto fisiológico com mertiolato a 1/10.000 (segundo técnica de Davis).
- 3) Autolisado em soluto fisiológico, obtido em baixa temperatura.
- 4) Suspensão em soluto fisiológico com 0,1% de formaldeído.
- 5) Cultura dessecada no vácuo, à temperatura de 30° C., e reduzida a pó.
- 6) Extrato alcoólico obtido de cultura (segundo técnica de Romãna e Dias).

Êsses diversos antígenos foram estudados quanto ao seu poder fixador e quanto ao seu poder anticomplementar, em períodos diferentes no decorrer de três meses, sendo mantidos durante esse tempo numa temperatura de 5°C.

Para melhor comparação preparamos os antígenos com concentração equivalente de parasitas, usando para isso do processo nefelométrico, com excessão do extrato alcoólico, que foi empregado de acôrdo com a técnica proposta por Romaña e Dias. Os resultados dêsses nossos ensaios se resumem no seguinte:

- 1) O antígeno formolado é desprovido praticamente de poder fixador.
- 2) Autolizados conservam-se mal e rapidamente o seu poder fixador decai.
- 3) O antígeno dessecado é dotado de um bom poder fixador e conserva-se bem, quando mantido nesse estado, mas é dotado de um poder anticomplementar maior que o antígeno preparado segundo a técnica de Davis.
- 4) O extrato alcoólico (técnica de Romaña e Dias) é dotado de um fraco poder fixador em relação aos antígenos preparados segundo as técnicas de Kelsner e Davis.
- 5) O antígeno hidroglicerinado (segundo técnica de Kelsner) é dotado de um bom poder fixador, que tende a cair com o tempo, à medida que aumenta o seu poder anticomplementar.
- 6) A antígeno com mertiolato (técnica de Davis) é dotado de um alto poder fixador e um pequeno poder anticomplementar. Durante três meses êle se manteve estável, sem apresentar modificações.

Êsses ensaios nos levaram à convicção de que o uso do mertiolato na técnica do preparo do antígeno a ser utilizado na reação de fixação de complemento para a *Trypanosomiasis americana*, representa uma notável contribuição e torna possível a standardização da reação que, a nosso ver, representa o meio mais seguro de que dispomos para o diagnóstico dessa *Trypanosomiasis*.

Queremos aqui assinalar que idênticos resultados obtivemos com seu emprêgo no preparo de antígeno para a reação de fixação de complemento na Leishmaniose tegumentar. Mas já na conservação das suspensões de *Trypanosoma equinum* para emprêgo na reação de fixação de complemento com fim de diagnóstico do "Mal de cadeiras", o antígeno assim preparado mostrou-se muito inferior ao constituído por uma simples suspensão em soluto fisiológico de tripanossomas vivos.

Atividade antigênica das amostras de *Schizotrypanum cruzi* e de outras espécies de Trypanosomidae — Cardozo em 1943, trabalhando com sôro de animais experimentalmente infectados, verificou variações acentuadas quanto ao poder fixador das várias amostras de *Schizotrypanum* com que trabalhou,

e aconselhou verificação prévia do poder fixador das amostras com as quais se pretende trabalhar, bem como praticar a reação somente quando se dispõe de uma raça capaz de fornecer antígenos com poder fixador reconhecida-mente alto.

Nos nossos ensaios com o fim de verificar tal possibilidade, trabalhamos com cinco amostras diferentes de *Schizotrypanum*, sendo quatro isoladas de casos humanos (Expedito, Elvira, Raymunda e Oswaldo Barboza) e uma de tatu (*Dasypus sp.*), amostra esta que vem sendo mantida vários anos em cultivo artificial. Com estas diferentes amostras foram preparados separadamente antígenos segundo a técnica de Davis e depois experimentados na presença de quatro soros de casos de doença de Chagas. Na reação utilizamos a técnica quantitativa e os resultados fornecidos por êsses cinco diferentes antígenos foram praticamente concordantes. É possível que as discordâncias verificadas entre os nossos ensaios e os de Cardoso corram por conta da diferença de técnica empregada no preparo do antígeno.

Baseado no fato da maioria das reações de imunidade nos protozoários, darem reações de grupo, um de nós, Muniz, em 1930, demonstrou que antígenos de *T. equiperdum*, preparado de acôrdo com a técnica de Watson, eram capazes de fixar o complemento em presença de soros de doentes da *Tripanosomíasis americana*.

Aproveitando o material abundante que tivemos a nosso dispor, para a feitura do presente trabalho, verificamos que idêntico fato ocorria em relação ao *T. equinum* e a *L. brasiliensis*. Os resultados que obtivemos trabalhando conjuntamente com antígenos de *T. equinum*, de *S. cruzi* e *L. brasiliensis* são perfeitamente comparáveis. É verdade que o antígeno específico é capaz de fixar em presença de concentrações menores de sôro, mas nas concentrações mais elevadas (0,2 — 0,1 — 0,05) os resultados foram absolutamente idênticos.

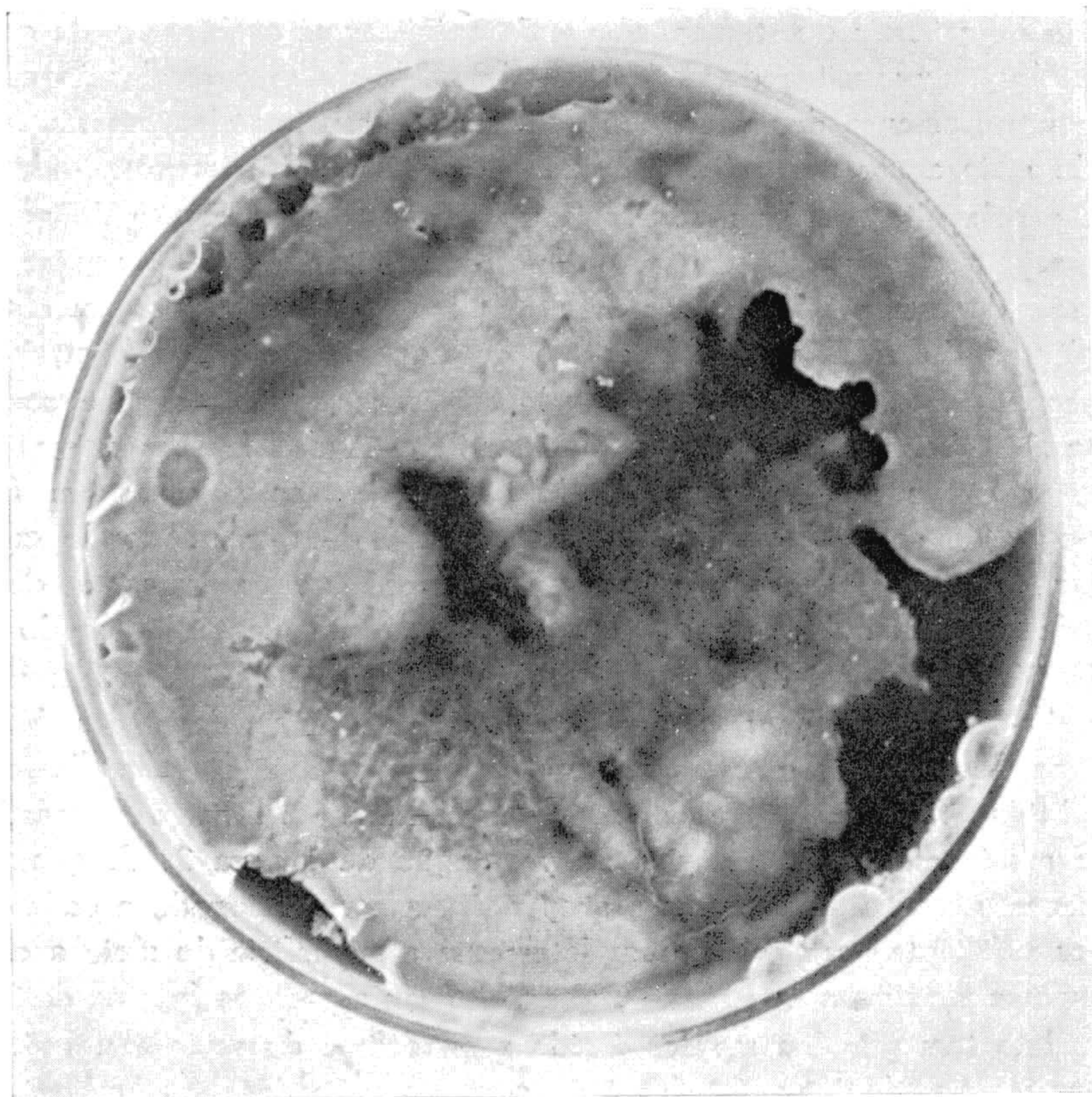
A questão de cultivo e obtenção de massas de *Schizotrypanum cruzi* — Outro ponto de grande importância prática no estudo das diversas reações de imunidade refere-se aos métodos de cultura com o fim de obter abundante quantidade de parasitas não só para o preparo de antígenos como de suspensões para o emprego nessas reações. É sabido que entre os tripanosomas patogênicos o *Schizotrypanum cruzi* é aquele de mais fácil cultivo. Meios como o de N. N. N., Noguchi, agar nutritivo glicosado com sangue de coelho, se prestam admiravelmente, não só para manutenção das amostras no laboratório como para seu isolamento, quer se parta de sangue humano como de animais infectados. Pela facilidade com que êle se desenvolve nos meios artificiais de cultivo, constitui esta prôva ótimo recurso a ser utilizado com o fim de diagnóstico. Nas culturas a sua vitalidade é bastante longa e em certos

meios como Noguchi, ela pode ser de meses, desde que seja mantida uma temperatura não acima de 30.º. Para obtenção de culturas em massa foram propostas várias fórmulas de meios (Bonacci, Kesler, Senekjie, etc.), que em última análise nada mais são que agar nutritivo glicosado, enriquecido com sangue de coelho.

Pela experiência que temos, somos de opinião que a obtenção de grandes quantidades de parasitos depende mais do modo de se proceder às culturas do que pròpriamente das variações que possam ser introduzidas na composição do meio a ser utilizado. Os elementos básicos são representados pelo sangue e pela glicose. As modificações propostas na confecção do agar nutritivo, representadas pelo emprêgo de componentes dêste ou aquêle fabricante, são de pouca influência, pois até hoje temos utilizado para obtenção das culturas do mesmo agar nutritivo empregado na rotina bacteriológica do nosso Instituto, preparado de acôrdo com a fórmula clássica e com uma peptona de fabricação nacional (Geyer). Quanto aos frascos a serem utilizados, melhores resultados se obtem procedendo as culturas em frascos Erlenmeyer de capacidade de 100 ou 200 cc., do que utilizando garrafas de Roux de maior ou menor capacidade, porque nas mesmas o dessecação da superficie do meio se processa mais ràpidamente. O modo de se proceder à sementeira é de capital importância. A suspensão das formas evolutivas do *Schizotrypanum* empregada como semente, deve ser bastante rica, dependendo disso e encurtamento do prazo e a riqueza da cultura a ser obtida. A suspensão deve ser feita em caldo nutritivo glicosado, ao qual se adiciona soluto fisiológico na proporção de 1 para 2. A quantidade de semente, representada por essa suspensão, a ser adicionada a cada frasco deve ser suficiente para cobrir completamente a superficie do meio a semear. Costumamos usar para frascos de 100 cc., 1,5 cc; e para os frascos de 200 cc, 2,5 cc. Isto tem por fim manter úmida a superficie do meio e permitir que se forme no fim do 5.º a 6.º dia após a evaporação da camada líquida, um espesso enduto de parasitas sôbre a mesma. Não se tendo êsse cuidado, e empregando-se uma menor quantidade de líquido o desenvolvimento em vez de se processar sob a forma de um verdadeiro manto, ocorre em pontos isolados, sob a forma de colônias, devido ao dessecação que sofre a superficie do meio, após a evaporação rápida da porção líquida empregada na sementeira.

O emprêgo de abundante camada líquida é desvantajoso, pois fornece cultura muito menos abundante e nela o parasita tem a tendência a se desenvolver formando pequenas colônias constituídas por elementos reunidos sob a forma de roseta, e que dão à cultura um especto grumoso, com tendência a aglutinar espontâneamente, mesmo depois de lavados e suspensos

em soluto fisiológico. A necessidade que tem o parasita, de oxigênio, para o seu cultivo, pode ser demonstrada pela simples observação das culturas em meio de Noguchi, no qual um desenvolvimento abundante ocorre, mas somente na camada mais superficial do meio a qual se acha em contato di-



Fotografia de uma cultura de *Schizotrypanum cruzi* (amostra Raimunda) com 8 dias, no meio agar-glicose-sangue de coelho, feita em balão de Erlenmeyer

rêto com o oxigênio do ar, enquanto as camadas mais profundas permanecem completamente livres de desenvolvimento.

A experiência nos demonstrou que o cultivo sobre um substrato sólido permite obter maior rendimento de cultura, evidenciado pelo fato de se conseguir, empregando essa técnica em único cultivo feito em frasco de Erlenmeyer, de capacidade de 200 cc., e contendo apenas 25 cc do meio de cultura, a quantidade de 0,5 cc de uma massa tornada exclusivamente de parasitas.

Outro fator de grande importância é o de se proceder às culturas numa temperatura constante, evitando variações como as que ocorrem quando são deixadas à temperatura ambiente. É muito comum, quando não se procura evitar este fator, obter-se resultados muito inconstantes, apesar de se utilizar o mesmo meio de cultivo. A temperatura ótima oscila entre 28.º e 29.º C., embora ocorra desenvolvimento em temperatura um pouco acima (30º a 32º) ou abaixo (24º a 27º) das que acabamos de referir.

A adaptação do parasita ao meio de cultivo se faz rapidamente, e culturas luxuriantes podem ser obtidas com essa técnica, já na segunda ou terceira passagem após o isolamento. Todas as cinco amostras com que trabalhamos, isoladas de casos humanos, se comportaram dessa maneira.

TÉCNICAS USADAS

Meio para cultivo em massa, do *Schizotrypanum cruzi* — A 100 cc. de agar nutritivo glicosado (caldo de carne 100 cc. peptona 1 gr. Cloreto de sódio 0,5 g e glicose 2 g. Esterilização a 120º. pH 7,2 a 7,4) juntar após fusão seguida de resfriamento a 50º graus, 10 cc. de sangue desfibrinado de coelho e 10 cc. de caldo de fígado (25 g. de fígado, 100 cc de água-vapor fluente 20 minutos — filtrar — juntar 1 g de peptona e 0,5 de cloreto de sódio — esterilizar a 120º). Agitar sem formar espuma e por meio de uma pipeta de bola, esterilizada, distribuir em frascos de Erlenmeyer com a capacidade de 100 cc. e previamente esterilizados, uma quantidade de meio suficiente para se obter uma camada, com a espessura de 1,5 cm. Após solidificação do agar, os frascos são colocados na estufa a 37º C., de um dia para outro, com o fim de verificar a esterilidade, e, só após esta prova são utilizados para cultura.

Início das culturas e modo de proceder os repiques — A água de condensação de três tubos de meio de N.N.N., semeados dez dias antes com a amostra de *Schizotrypanum* a ser cultivada, é pipetada e misturada num tubo esterilizado com igual volume de caldo glicosado a 2%. Após esta operação, com 1,5 cc de mistura, é feita a sementeira de cada frasco, que depois disso são colocados numa estufa regulada a 28º C. Utilizamos no nosso laboratório, para esse fim, uma estufa de aquecimento e refrigeração fornecida pela "Precision Scientific Co.". Os balões devem repousar sobre uma superfície perfeitamente plana, a fim de que o líquido que serviu como semente cubra completamente toda a superfície do meio. Após 5 a 7 dias, a evaporação da massa líquida, se completa e se acha substituída por um enduto úmido constituído por massas de parasitas.

Utilizando-se como semente esta primeira cultura obtida, torna-se fácil daí por diante, conseguir em série, culturas extremamente ricas em parasitas, bastando para isso, emulsionar o conteúdo de um frasco com uma mistura de caldo glicosado a 2%, duas partes, e soluto fisiológico, 1 parte, e proceder a novos repiques observando as regras acima expostas.

Apesar da sobrevivência das culturas assim obtidas ser longa, a sua utilização para os diversos fins deve ser no máximo, até o 10.^o ou 12.^o dia, devido ao fato que após êsse prazo, começam a aparecer numerosas formas do parasita em desintegração, ocasionada principalmente pelo dessecamento que vem a sofrer o meio.

Técnica para obtenção de cultura em massa de *Leishmania* — Para isso o melhor processo consiste de culturas em placas, utilizando pincéis para sementeira. O meio a ser empregado é o agar nutritivo a 3%, com 2% de glicose, pH 7,2 a 7,4, ao qual se adiciona no momento do preparo das placas, sangue desfibrinado de cavalo na proporção de 1 para 5. Utilizamos nesse trabalho placas de Petri com o diâmetro de 10 cm, e 5 cm de altura. Partindo de culturas em meio de Noguchi, e utilizando somente a porção superficial do meio onde ocorre o desenvolvimento do parasita, procede-se à primeira sementeira das placas, utilizando pincéis esterilizados no autoclave e embebidos na semente, e com êle fazendo 3 a 4 estrias sobre a superfície do meio a semear. Após esta operação as placas são deixadas a temperatura de 22° a 24°, invertidas com a tampa para baixo, e no interior desta são colocados 2 a 3 cc. de uma solução saturada de sublimado em água, com o fim de manter certo grau de úmidade no interior da placa.

Após 8 a 10 dias procede-se a novo repique, partindo do material obtido na primeira cultura, que é recolhido por meio de pincél e com êle feitas novas sementeiras.

Material abundante pôde ser obtido após 3 a 4 repiques, e se ter o parasita adaptado a esta forma de desenvolvimento.

Preparo da suspensão de *Schizotrypanum cruzi* para emprêgo na reação de aglutinação — Uma cultura de *Schizotrypanum* em frascos de Erlenmeyer, datando de 6 a 8 dias, é emulsionada em solução fisiológica. Para isso se coloca no interior do frasco, no qual se procedeu a cultura, 10 cc de soluto fisiológico, e, por meio de aspirações e jatos sucessivos do líquido sobre a superfície do meio, obtidos com uma pipeta de Pasteur esterilizada, consegue-se desprender a película formada pelo desenvolvimento do parasita e obter uma suspensão do mesmo. Desde que isso seja conseguido, aspira-se tôda suspensão com uma outra pipeta, na extremidade da qual se enrola uma camada fina de algodão hidrófilo, com o fim de reter tôdas as partículas de gelose que costumam desprender-se do meio durante a primeira ope-

ração. Feito isso, a suspensão é passada para um tubo esterilizado, tendo-se antes o cuidado e por meio de uma pinça flambada retirar o algodão carregado de partícula de gelose que é desprezado.

A emulsão espessa assim obtida é lavada duas vezes em soluto fisiológico, usando-se para isso a centrifugação. No final dessa operação a massa de parasitas é novamente suspensa em 5 ou 10 cc. do mesmo soluto, e constitui a suspensão estoque com a qual se procede à feitura da suspensão a ser empregada na reação. A suspensão estoque pode ser guardada em baixa temperatura (5.º C) e servir para o mesmo fim durante uma semana. A maioria dos parasitas nela contida se conservam vivos durante esse espaço de tempo e se comportam de igual maneira na reação como os da suspensão recentemente preparada.

No momento de ser feita a reação procede-se ao preparo da suspensão a ser empregada, e para isso se coloca num tubo esterilizado um volume suficiente de soluto fisiológico que varia de acordo com o número de reações a serem feitas e a ele se adiciona por meio de uma pipeta algumas gotas da suspensão estoque de maneira a se conseguir uma turvação equivalente a que se obtém adicionando 0,05 de uma solução de cloreto de bário a 1%, a 10 cc de um soluto de ácido sulfúrico a 1%.

Suspensões mais concentradas de parasitas não devem ser usadas porque podem mascarar o resultado da reação. É necessário observar se após o preparo da suspensão ocorre uma aglutinação espontânea do parasita fato esse que pode ser logo observado e que invalida o emprego da mesma na reação.

Técnica da soro aglutinação — Com os soros separados dos coágulos e libertos das hematias por centrifugação são feitas, utilizando soluto fisiológico, uma série de diluições com títulos diferentes a partir de 1/10 até 1/10240 que são distribuídas na quantidade de 0,5 cc em um número equivalente de tubos de hemolise. Em seguida é adicionado a cada um deles 0,5 cc da suspensão preparada de acordo com a técnica acima descrita. Um tubo testemunha é feito separadamente contendo 0,5 de soluto fisiológico e 0,5 cc de suspensão. Após agitação a série de tubos é colocada em banho-maria a 37º C. A leitura é feita duas horas depois. Os resultados observados são representados da seguinte maneira : ++++ aglutinação total com a formação de grandes flócos (tipo flagelar). +++ aglutinação total com a formação de flocos finos (tipo somático). ++ aglutinação parcial. O Ausência de aglutinação.

Técnica do preparo do antígeno de *Schizotrypanum cruzi* para a reação de fixação de complemento — Nas suas linhas gerais seguimos a técnica proposta por Davis, desprezando certos detalhes como centrifugações a baixa

temperatura durante a lavagem das culturas bem como o emprêgo da mistura gelo seco e metil celossolve com o fim de congelar a suspensão após o seu preparo com a solução salina de mertiolato. Procedemos da seguinte maneira :

Em quatro frascos de Erlenmeyer de capacidade de 100 cc contendo cultura de *Schizotrypanum* com a idade de 6 a 8 dias, são colocadas, em cada um dêles, 5 cc de soluto fisiológico. Pelo mesmo processo já descrito para o preparo da suspensão para o emprêgo na reação aglutinação são obtidos dos quatro frascos suspensões de parasitas livres de partícula de gelose. Em seguida são misturadas e colocadas em tubo centrífugo e submetidas a uma centrifugação violenta (3000 rotações). O líquido que sobrenada é substituído por igual quantidade de soluto fisiológico, tendo-se o cuidado de pôr novamente em suspensão a massa de parasitas obtida no fundo do tubo. Esta operação é repetida por mais duas vêzes com o fim de libertar os parasitas de qualquer traço de substância contido no meio de cultura. Após a última centrifugação o líquido que sobrenada é desprezado e a massa de parasitas suspensa num volume 10 vêzes maior de um soluto fisiológico, contendo mertiolato na proporção de 1/10.000. Utilizando tubos centrífugos graduados esta operação é facilitada. A suspensão espessa assim obtida é pipetada e colocada num frasco esterilizado e fechado com rôlha de borracha. Após submeter-se o conteúdo do tubo a uma agitação violenta por alguns minutos, êle é colocado na câmara de gelo de um refrigerador. Diariamente no período de três dias o tubo é retirado da câmara e submetido após o degêlo à nova agitação, finda a qual é submetido a novo congelamento. Terminadas essas operações, a suspensão estoque de antígeno é mantida no refrigerador a uma temperatura de 5.º C. Dessa maneira a sua conservação se faz pela espaço de vários meses.

Técnica do preparo do antígeno do *Trypanosoma equinum* — Emulsão espessa de tripanossoma, pode ser obtido para o preparo dêsse antígeno infectando camondongos que são sangrados no coração próximo da morte, quando a concentração de parasitas no sangue é muito elevada (a amostra de *T. equinum* com que trabalhamos mata regularmente o camondongo entre o 4.º e o 5.º dia). O sangue de dois animais é recolhido em 10 cc de soro fisiológico com 1% de citrato de sódio. Essa suspensão é colocada em dois tubos de hemólise e submetida a uma centrifugação de 2500 a 3000 rotações pelo espaço de 1 minuto, findo o qual o líquido sobrenadante dos dois tubos de hemólise é pipetado e recolhido a um tubo de ensaio esterilizado. Nova porção de soluto fisiológico é colocada em ambos os tubos de hemólise que são agitados com o fim de pôr em suspensão os glóbulos juntamente com os tripanossomas que não foram retirados na primeira operação. Ambos os

tubos são sujeitos a uma nova centrifugação com igual velocidade e pelo mesmo espaço de tempo. Novamente o líquido sobrenadante ainda de aspecto turvo é recolhido e misturado ao primeiro. Esta operação se repete três a quatro vezes e desta maneira consegue-se retirar, praticamente livre das hemátias, a maioria dos tripanossomas existentes no sangue. A suspensão rica em parasitas, recolhida no tubo de ensaio, é submetida por duas vezes a centrifugação violenta, tendo-se o cuidado de substituir a solução fisiológica, com o fim de eliminar o citrato de sódio que é dotado de poder impediante. A quantidade de soluto fisiológico a ser adicionada no final da operação, deve ser suficiente para que se obtenha uma turvação equivalente ao padrão 3 da escala de Mac Farland. O antígeno assim preparado pode ser empregado no mesmo dia, ou um a dois dias depois, desde que seja conservado em baixa temperatura. É desprovido praticamente de qualquer poder anti-complementar.

Técnica de preparo do antígeno de Leishmania — Para o preparo desse antígeno, foi utilizada a mesma técnica do preparo do antígeno de *Schizotrypanum cruzi*, isto é, a técnica proposta por Davis.

Técnica da reação de fixação de complemento — Após o preparo do antígeno, ele é submetido a duas provas sendo a primeira para verificação do poder anti-complementar que indicará o título da diluição a ser empregada e a segunda com o fim de verificar o poder fixador quando em presença de um soro específico obtido de animal ou de doente infectado com o *Schizotrypanum cruzi*. Esses ensaios devem ser repetidos todos os meses com o fim de verificar qualquer modificação que possa ocorrer em relação a essas propriedades. Em três diferentes amostras de antígeno por nós preparado pela técnica de mertiolato, nunca observamos qualquer poder hemolítico das mesmas. A diluição do antígeno a ser empregada na reação de fixação deve ser igual a duas vezes o título da menor diluição que não se mostrou dotado de poder anti complementar na dose de 0,2 cc.

O sistema hemolítico utilizado no decorrer desses ensaios, como na execução da própria reação, deve conter um excesso de hemolisina equivalente a 5 doses hemolíticas.

No momento de se proceder à prova com os soros suspeitos, o complemento representado por soro de cobaia na diluição de 1/10 é dosado em presença de igual quantidade da diluição do antígeno a ser empregada nos tubos de reação, isto é, 0,2 cc. A leitura do resultado deve ser feita 1/2 horas após a junção do sistema hemolítico. Conhecida a menor quantidade da diluição do complemento capaz de determinar uma hemólise total e que representa a unidade de complemento, esta é empregada acrescida de 0,1 cc. (unidade retificada) na execução da reação propriamente dita

Determinada a dose de complemento a ser empregada e inativado o sôro pelo aquecimento no banho-maria a 56° C., pelo espaço de 20 minutos, procede-se à execução da reação. Com êsse fim pode-se utilizar duas técnicas, a qualitativa e a quantitativa. Na primeira emprega-se três doses diferentes do sôro em natureza, isto é: 0,2 0,1 e 0,05 cc. Na segunda, que tem por fim a dosagem dos anticorpos fixadores, emprega-se no primeiro tubo da reação 0,2 cc, do sôro em natureza e nos outros igual quantidade de diluições diferentes feitas em soluto fisiológico a partir do título $\frac{1}{2}$.

Nos diferentes tubos de reação, é acrescentado em seguida 0,2 cc do antígeno. Após agitação, os tubos são deixados em repouso pelo espaço de 30 minutos à temperatura do laboratório. Depois disso junta-se a cada mistura uma unidade retificada do complemento (sôro de cobaia a 1/10) e uma quantidade de soluto fisiológico suficiente para se obter um volume de 2 cc. em todos os tubos. Após nova agitação, coloca-se no banho-maria a 37° C., pelo espaço de 1 hora. Além dos tubos de reação devem ser feitos três tubos testemunhas, um contendo 0,2 cc do sôro em natureza e dois outros, contendo 0,4 e 0,2 cc do antígeno. A cada um destes tubos é adicionado a unidade retificada do complemento e soluto fisiológico para completar o volume de 2 cc. Como os tubos de reação, são também levados ao banho-maria a 37° C., onde permanecem pelo espaço de 1 hora.

Decorrido o tempo para a fixação, a todos os tubos são adicionados 2 cc do sistema hemolítico.

A leitura final é procedida após ter ocorrido hemólise total nos tubos testemunhas do sôro e do antígeno. Os resultados são expressos por ++++ ausência de hemólise, +++ hemólise ligeira, ++ hemólise parcial, + hemólise quase total e — ausência de hemólise.

MATERIAL DE ESTUDO

Trabalhamos em nossos ensaios com 54 soros assim discriminados:

Soros humanos

Casos agudos de doenças de Chagas	6
Casos crônicos de doença de Chagas	16
Casos suspeitos de doença de Chagas	7
Casos de malária	3
Caso de leishmaniose tegumentar	1
Casos de boubá	3
Casos de lepra	4
Indivíduos normais com Wassermann negativo...	10

Sôro de animais

Cão suspeito de infecção com <i>S. cruzi</i>	1
Tatu suspeito de infecção com <i>S. cruzi</i>	2
Cavalo infectado com <i>T. equinum</i>	1

A maioria dos soros de casos agudos, crônicos ou suspeitos de doença de Chagas, provêm de individuos residentes em Bambuy, Estado de Minas Gerais, sendo da mesma proveniência, os soros dos tatus e do cão. Um dos soros dando reação positiva para tripanosomíase, foi obtido de um funcionário do nosso Instituto nascido em Lassance, Estado de Minas Gerais, e a muito tempo residente no Rio de Janeiro. Os soros que serviram de testemunhas, foram obtidos de doentes internados no Hospital Evandro Chagas, no Leprosário de Jacarépaguá e de clínicas privadas.

Devemos à gentileza do nosso colega Dr. Emanuel Dias os dados referentes aos xeno-diagnósticos feitos na maioria dos casos crônicos, bem como os resultados das pesquisas do tripanosoma no sangue dos casos agudos. Para melhor clareza organizamos dois quadros (Quadro I e Quadro II) contendo esses dados e que podem ser observados logo a seguir.

Para caracterização dos diversos soros com que trabalhamos, e para facilitar a nossa exposição quando a êles quisermos nos referir, cada um deles recebeu um número, que será conservado sempre o mesmo até o final do nosso trabalho.

QUADRO I

CASOS AGUDOS DE DOENÇA DE CHAGAS

Nº. DO SÔRO	NOME	PROVENIÊNCIA	DATA DA VERIFICAÇÃO DO S. CRUZI NO SANGUE
1	Oswaldo Barboza.....	Bambuí	2 de fevereiro 1944
2	Roldão Garcia.....	Bambuí	3 de março 1944
3	Raimunda Maria de Sousa.....	Bambuí	13 de dezembro 1943
4	Expedito Chaves.....	Bambuí	13 de dezembro 1943
5	Nazaré Maria de Jesus.....	Bambuí	28 de março de 1944
6	Nilza Lobato,.....	Bambuí	25 de julho de 1944

QUADRO II

RESULTADO DOS XENODIAGNÓSTICOS NOS CASOS CRÔNICOS E SUSPEITOS DE D. DE CHAGAS

Nº. DO SÔRO	NOME	PROVENIÊNCIA	XENODIAGNÓSTICO POSITIVO EM :	XENODIAGNÓSTICO NEGATIVO EM :	PESQUISA DE TRIP. NO SANGUE
7	Josê Barbosa.....	Bambuí			Posit. 1940
8	Rosa Sant'Ana.....	Bambuí	15-10-40, 9-7-42 e 4-3-43		—
9	Moacyr ds Anjos.....	Bambuí	20-3-44		—
10	Aparecida Melo.....	Bambuí	4-8-43		—
11	Hilda Teixeira.....	Bambuí	9-7-42, 29-4-44		—
12	José Magalhães.....	Bambuí	3-3-43		—
13	Teresa Maria de Jesus.....	Bambuí	15-7-44		—
14	Jovina Maria de Jesus.....	Bambuí			—
15	Luzia Margarida.....	Bambuí	22-1-44		—
16	Sebastião Rosa.....	Bambuí	22-1-44		—
17	Maria Madalena de Jesus.....	Bambuí		22-7-43	—
18	Ana Maria de Jesus.....	Bambuí	22-1-44		—
19	Maria Umbelina.....	Bambuí	16-1-41	3-3 e 19-5-43	—
20	Messias José Martins.....	Bambuí	15-12-43		—
21	Marta de Sousa.....	Bambuí		31-1-44	—
22	Aparecida de Jesus.....	Bambuí			—
23	Oto Camilo.....	Bambuí	21-1-44		—
24	Regina Garcia.....	Bambuí			—
25	Maria Lobato.....	Bambuí			—
26	Lucilio.....	Lassance		3 vezes, sem data	—
27	Manuela Fernandes.....	Bambuí	posit. s/data		—
28	Daniel Martins de Oliveira.....	Bambuí	7-12-43		—
29	Benevenuto Alves.....	Bambuí	posit. s/data		—
30	Tatu I.....	Bambuí		22-8-44	Negativa
31	Tatu II.....	Bambuí		30-8-44	Negativa
32	Cadela "Bolinha".....	Bambuí	18 - 44		

RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados que vamos expor foram obtidos parceladamente no decorrer de um período compreendido entre Novembro de 1943, e agosto de 1944.

Para facilitar o estudo em conjunto, organizamos diversos quadros onde figuram os resultados obtidos das várias questões por nós estudadas no decorrer dêste trabalho. É assim que no quadro III estão agrupados todos os ensaios com o fim de verificar os poderes aglutinantes e fixador do complemento das soros de casos agudos, crônicos e suspeitos de Doença de Chagas, para o *S. cruzi*.

No quadro IV estão agrupados os ensaios com os soros que serviram de testemunha no estudo dessas duas reações.

No quadro V figuram os ensaios feitos com o fim de estudar comparativamente o comportamento de antígenos preparados com *Schizotrypanum cruzi*, *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma equinum*, quando na presença de soros de doença de Chagas, de leishmaniose cutânea e do "Mal de cadeira".

O quadro VI compreende os ensaios com o fim de verificar comparativamente o poder aglutinante para *Leishmania brasiliensis* dos soros de doença de Chagas e de um caso de leishmaniose cutânea americana.

No quadro VII o resultado dos ensaios feitos com o fim de verificar se o poder aglutinante para o *Schizotrypanum cruzi* apresentado por soros de individuos normaes corre por conta de anticorpos heterófilos. Na execução dêsses numerosos ensaios foram empregadas rigorosamente as tecnicas expósta anteriormente.

QUADRO III

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE AGLUTININA E FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM OS SOROS DE CASOS AGUDOS, CRONICOS E SUSPEITOS DE D, CHAGAS

N.º DO SORO	NOMES	CASO CLÍNICO	AGLUTINAÇÃO PARA O <i>Schizotrypanum cruzi</i> (amostra Tatu)									FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO COM ANTÍGENO DAVIES						
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	Soro Puro	1	1	1	1	1	1
			40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240		2	10	20	40	80	160
1	Osvaldo Barbosa.....	caso agudo D. C.	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	++	—
2	Roldão Garcia.....	caso agudo D. C.	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
3	Raymunda Maria de Sousa.....	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
4	Expedito Chaves Campos.....	caso agudo D. C.	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
5	Nazaré Maria de Jesus.....	caso agudo D. C.	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
6	Nilza Lobato.....	caso agudo D. C.	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
7	José Barbosa.....	caso crônico D. C.	++	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
8	Rosa Sant'Ana.....	caso crônico D. C.	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
9	Moacir dos Anjos.....	caso crônico D. C.	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	++++	++++	++++	+++	+	—	—
10	Aparecida Melo.....	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	+	++++	++++	++++	+++	+	—	—
11	Hilda Teixeira.....	caso crônico D. C.	+	+	++	+++	+++	++	+	+	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
12	José Magalhães.....	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	+++	++	+	+	+	+	++++	++++	++++	+++	+	—	—
13	Teresa Maria de Jesus.....	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	+++	++	+	+	+	+	++++	++++	++++	+++	+	—	—
14	Jovina Maria de Jesus.....	caso crônico D. C.	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
15	Luzia Margarida.....	caso crônico D. C.	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
16	Sebastião Rosa.....	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
17	Maria Madalena de Jesus.....	caso suspeito D. C.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
18	Ana Maria de Jesus.....	caso crônico D. C.	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
19	Maria Umbelina.....	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
20	Messias José Martins.....	caso crônico D. C.	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
21	Marta de Sousa.....	residente em Bambuí caso suspeito	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
22	Aparecida de Jesus.....	caso suspeito D. C.	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	++++	++++	+++	—	—	—	—
23	Oto Camilo.....	caso crônico D. C.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	++++	++++	+++	—	—	—	—
24	Regina Garcia.....	residente em Bambuí caso suspeito D. C.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
25	Maria Lobato..... (mãe de Nilza Lobato)	residente em Bambuí caso suspeito D. C.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
26	Lucílio.....	nascido em Lassance	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	+++	++	—	—	—
27	Manuela Fernandes.....	caso crônico D. C.	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	++++	++++	++++	+++	—	—	—
28	Daniel Martins de Oliveira.....	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
29	Benevenuto Alves.....	caso suspeito D. C.	++++	++++	+++	+++	++	++	+	+	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
30	Tatu I.....	proveniente de Bambuí	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	++++	++++	++++	+++	++	—	—
31	Tatu II.....	proveniente de Bambuí	++++	++++	+++	++	+	+	+	+	+	++++	++++	+++	+	—	—	—
32	Cadela Bolinha.....	Bambuí	++++	++++	+++	+++	++	+	+	+	+	++++	++++	+++	—	—	—	—

QUADRO V

ESTUDO COMPARATIVO DO PÓDER FIXADOR DOS ANTÍGENOS DE *S. cruzi*, *T. equinum* e *Leishmania brasiliensis* EM PRESENÇA DE DIVERSOS SOROS

N.º DO SORO	NOME	CASO CLÍNICO	ANTÍGENO <i>Schizotrypanum cruzi</i> (mét. de Davis)					ANTÍGENO <i>Leishmania brasiliensis</i> (Mét. de Davis)					ANTÍGENO <i>Trypanosoma equinum</i> (Vivo)				
			PURO	1	1	1	1	PURO	1	1	1	1	PURO	1	1	1	1
				2	10	20	40		2	10	20	40		2	10	20	40
1	Hilda Teixeira.....	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+	-	-	++++	++++	+	-	-
2	Roldão Garcia.....	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	-	-	++++	++++	+	-	-
12	José Magalhães.....	caso crônico D. C.	++++	+++	++	+	-	++	-	-	-	-	++++	+++	-	-	-
13	Teresa Maria de Jesus.....	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	+++	+	++++	+++	-	-	-	++++	++++	++	-	-
28	Daniel Martins de Oliveira.....	caso crônico D. C.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Benevenuto Alves.....	caso suspeito D. C.	++++	++++	++++	+++	++	++++	+++	++	-	-	++++	++++	++	-	-
30	Tatu I.....	suspeito de infecção pelo Schizotrypanum cruzi	++++	++++	++++	+++	++	++++	++++	++	-	-	++++	++++	++	+	-
31	Tatu II.....	suspeito de infecção pelo Schizotrypanum cruzi	++++	++++	++	+	-	++++	++++	+	-	-	++++	++++	+	-	-
34	Jovino Correia.....	Leishmaniose tegumentar	+++	++	-	-	-	++++	+++	++	-	-	+++	++	-	-	-
54	Cavalo.....	Infectado experimentalmente com trypanosoma equinum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	++	++	-

QUADRO VI

ESTUDO COMPARATIVO DO PODER AGLUTINANTE DE DIVERSOS SOROS PARA A *Leishmania brasiliensis*

N.º DO SORO	NOMES	CASO CLÍNICO	SORO DE AGLUTINAÇÃO PARA <i>Leishmania brasiliensis</i> (AMOSTRA 14)								
			1	1	1	1	1	1	1	1	1
			20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
1	Oswaldo Barbosa.....	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
3	Raimunda Maria de Souza.....	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
41	José Barroso.....	malária	++++	+++	+++	○	○	○	○	○	○
43	S. T.....	Wassermann negativo	++++	+++	+++	○	○	○	○	○	○
44	S. M.....	Wassermann negativo	+++	++	○	○	○	○	○	○	○
34	Jovino Correia.....	Leishmaniose tegumentar	lisou	++++	+++	++	○	○	○	○	○

QUADRO VII

DEMONSTRAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS HETEROFILOS NOS SOROS NORMAIS AGLUTINANDO O *Schizotrypanum cruzi*

N.º DO SORO	NOMES	CASO CLÍNICO	AGLUTINAÇÃO COM <i>s. cruzi</i> (AMOSTRA TATÚ)								
			1	1	1	1	1	1	1	1	1
			40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240
6	Nilza Lobato.....	caso agudo D. C.	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
46	Manuel Anchieta.....	Bouba	+++	+++	+	○	○	○	○	○	○
53	José Chinez.....	Wassermann negativo	+++	+++	○	○	○	○	○	○	○
APÓS ABSORÇÃO COM POLPA DE RIM DE COBAIA											
6	Nilza Lobato.....	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++
46	Manuel Anchieta.....	Bouba	○	○	○	○	○	○	○	○	○
53	José Chinez.....	Wassermann negativo	○	○	○	○	○	○	○	○	○

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Comparando os resultados obtidos com o xenodiagnóstico e com a fixação de complemento verificamos que a maioria dos soros de doentes com xeno positivos deram reações positivas de fixação com exceção do soro 28 que apresenta um xeno positivo e a reação de fixação negativa.

Resultado inverso verificamos em relação aos soros 17, 21 e 26, cujos xenos foram negativos e no entanto a reação de fixação foi positiva. O soro 19 que apresenta um xeno positivo em 1941 e dois xenos negativos no ano de 1943, deu uma reação de fixação positiva.

O estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação mostra uma grande concordância de resultados, não só nos casos agudos como nos casos crônicos. Uma única exceção foi verificada em relação ao soro n.º 23, caso crônico cuja reação de aglutinação foi negativa enquanto a de fixação foi positiva. Parece não haver uma relação muito estreita na intensidade das duas reações, pois soros que aglutinaram num título elevado fixaram o complemento quando em concentrações mais altas, enquanto outros dotados de menor poder aglutinante fixaram em menores concentrações. Todos os soros dos casos agudos mostraram-se dotados de alto poder aglutinante, sendo que em dois deles (1 e 6), esse poder atingiu o título de 1/10.000. Nos casos crônicos o poder aglutinante mostrou-se variável, sendo de notar contudo que em muitos deles, mostrou-se elevado, chegando mesmo ao título de 1/2560. O teor mais baixo em aglutinina foi verificada no soro 22 que aglutinou fracamente no título de 1/160. O fato observado com alguns soros de aglutinações mais intensas ocorrem nos tubos com diluições mais elevadas pode ser explicado pela presença de maior concentração de proaglutinóides nas menores diluições do soro. Em relação aos tipos de aglutinação, observa-se, em regra, o flagear (H) ocorrendo nas concentrações maiores de soro e somático (O) nas diluições mais elevadas embora alguns soros apresentaram somente aglutinação do tipo somático.

Passando ao estudo do comportamento dos soros que serviram de testemunha em relação a essas duas reações verifica-se que o único soro que deu reação positiva de fixação foi o 34, de um caso de leishmaniose tegumentar, embora se mostrando desprovido de poder aglutinante. Dos 22 soros utilizados, cinco aglutinaram no título de 1/80 e cinco outros somente no título de 1/40.

Ensaio realizado com os soros 46 e 53 de proveniência humana que se mostraram capazes de aglutinar no título de 1/80 mais fortemente o *Schizotrypanum cruzi* demonstraram possuírem eles poder aglutinante nos títulos de 1/160 e 1/320 para glóbulos de carneiro e serem dotados de poder hemo-

lítico para os mesmos. Submetidos a prova de absorção com polpa de rim de cobaio (Quadro VII) se mostraram incapazes de aglutinar novamente o *Schizotrypanum cruzi*, demonstrando êsse fato correr por conta de anticorpos heterófilos o poder de que são dotados.

Os resultados por nós obtidos no estudo comparativo do poder fixador de antígenos preparados com *Schizotrypanum cruzi*, *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma equinum* (Quadro V) quando em presença de soros de doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e de equídeo infectado com *Trypanosoma equinum*, constituem mais um exemplo para se considerar a reação de fixação de complemento uma reação de grupo. A concordância dos resultados obtidos com êsses diferentes antígenos, foi bem acentuada, em relação aos soros de doença de Chagas e leishmaniose, principalmente nos tubos contendo maior concentração de soro. Resultado diferente foi observado em relação ao soro do equídeo infectado com o *Trypanosoma equinum* que só fixou em presença do antígeno específico.

Fomos levados em vista do resultado negativo com o soro n.º 34 de leishmaniose tegumentar na prova de aglutinação para o *Schizotrypanum cruzi* a verificar se igual comportamento ocorria com os soros de doença de Chagas quando em presença de *Leishmania brasiliensis*. Os resultados acham-se expostos no quadro VI. Por êle podemos ver que os dois soros (Soro 1 e 3) de casos agudos dessa doença usados nesse ensaio aglutinaram num título mais elevado (títulos de 1/2560 e 1/5120) a amostra de *Leishmania brasiliensis* que o soro (34) do caso de leishmaniose tegumentar que só aglutinou no título de 1/160. O tipo de aglutinação dominante observado nos tubos contendo os soros dos casos agudos de Doença de Chagas foi o H.

O comportamento apresentado pela amostra de *Leishmania brasiliensis* em relação aos três soros testemunhas (41, 43 e 44) falam a favor da presença na constituição antigênica da *Leishmania brasiliensis* de antígenos heterófilos, talvez em maior concentração que no *Schizotrypanum cruzi*.

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios acima expostos falam a favor de uma maior concentração de antígenos de grupo na constituição do *Schizotrypanum cruzi* que nas do *Trypanosoma equinum* e da *Leishmania brasiliensis*.

RESUMO E CONCLUSÕES

Trabalhando com 24 soros provenientes de casos agudos e crônicos cujos diagnósticos foram estabelecidos quer pela pesquisa direta do parasita (casos agudos) quer pelo xenodiagnóstico ou fixação de complemento (casos crônicos) podemos demonstrar em 26 destes soros a presença de aglutininas para o *Schizotrypanum cruzi* em títulos que variaram de 1/160 a 1/10240.

Os casos agudos apresentaram um mais alto teor variando os títulos entre 1/2560 e 1/10240 e os casos crônicos entre 1/2560 e 1/160. Um único soro apresentou resultado negativo.

Em 10 dos 22 soros que serviram de testemunha e entre os quais figuravam um de leishmaniose tegumentar e outro de um cavalo infetado experimentalmente com *Trypanosoma equinum*, puderam ser demonstrados a presença de aglutininas para o *Schizotrypanum cruzi* em títulos que não ultrapassaram de 1/80.

Em dois desses soros que maior concentração de aglutininas apresentavam e que provinham um de caso de bouba com Wassermann positivo e outro de um indivíduo considerado normal, com Wassermann negativo, as pesquisas demonstraram possuírem ambos, hemolisinas e aglutininas para glóbulos de carneiro em títulos que variavam entre 1/160 e 1/320. Esses soros submetidos à prova de absorção com polpa de rim de cobaia perderam completamente o poder aglutinante para o *Schizotrypanum cruzi*, fato que não ocorreu com o soro de doença de Chagas servindo de testemunha que só ligeira modificação apresentou quanto ao primitivo título aglutinante. Ficou evidenciado dessa maneira correr por conta de um anticorpo heterófilo o poder aglutinante que são dotados certos soros de indivíduos livres de infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* e a presença de um componente heterogênico na estrutura antigenica desse parasita. No decurso deste trabalho pudemos verificar que idêntico fato ocorre em relação a *Leishmania brasiliensis*. Essa verificação é de valor prático porque se pode com facilidade eliminar as reações inespecíficas.

Ao contrário do que observamos possuírem soros de casos agudos da doença de Chagas, elevado poder aglutinante para *Leishmania brasiliensis* (1/2560 e 1/5120) o soro leishmaniose tegumentar foi incapaz de aglutinar o *Schizotrypanum cruzi*, sendo o agente específico aglutinado por ele no título de 1/160.

Os fatos que acabamos de expor, em relação à prova de aglutinação na *Tripanosomíasis americana* demonstram claramente o seu valor, podendo constituir, quando positiva um meio seguro no diagnóstico dessa doença. Eliminada a hipótese de aglutinações inespecíficas por meio da absorção com polpa de rim de cobaia, o título de 1/160 fala a favor de uma infecção pelo *Schizotrypanum cruzi*. A maioria dos soros de doença de Chagas por nós estudados apresentaram os dois tipos de aglutinação H e O, ocorrendo o primeiro nas maiores concentrações de soro e o segundo nas menores. Alguns soros, contudo, apresentaram aglutinação somente do tipo somático.

O estudo do comparativo que fizemos dos diversos antígenos propostos para a fixação de complemento na doença de Chagas e os resultados por nós

obtidos no decorrer das nossas pesquisas utilizando o antígeno de Davis, autoriza-nos afirmar que o emprêgo do mertiolato permitindo obter um antígeno de alto poder fixador e estavel por um longo período, resolveu o maior empecilho que se antepunha à necessária standartização dessa reação para o emprêgo como técnica de rotina.

No preparo do antígeno de *Leishmania*, o mertiolato se mostrou também superior a qualquer outro conservador, proporcionando um antígeno estável dotado de bom poder fixador e funcionando como um ótimo alergeno na prova de intra-dermo reação. Em relação ao preparo de antígeno com o *Trypanosoma equinum*, a conclusão que chegamos após numerosos ensaios é de que a simples suspensão de trypanosomas em soluto fisiológico apresenta um maior poder fixador que aquelas feitas em mertiolato ou em mistura hidroglicerizada, sendo desprovidas de todo poder anticomplementar, possuindo, porém, desvantagem de só poder ser utilizada no curto prazo de 2 a 3 dias quando mantidos a temperatura de 5.º graus.

Na série de reações de fixação a que procedemos em 27 soros de doença de Chagas utilizando o antígeno de *Schizotrypanum cruzi* com mertiolato, obtivemos um único resultado negativo e tratava-se de um caso que possuía um xenodiagnóstico positivo datando de pouco tempo. Com êsse sôro não pudemos realizar a prova de aglutinação devido a quantidade enviada ter sido pequena. Foi o único caso discordante. A reação de fixação mostrou-se dotada de grande especificidade, menos em relação ao sôro do caso de leishmaniose tegumentar que fixou até a diluição de 1/2. Já o sôro de cavalo com infecção pelo *Trypanosoma equinum* deu um resultado negativo, o mesmo acontecendo com todos os outros que serviram de testemunhas.

Em relação a concentração de anticorpos fixadores nos soros de doença de Chagas, pudemos observar que alguns dêles foram capazes de fixar mesmo no título de 1/80, mas a maioria não ultrapassou os títulos de 1/10 e 1/20. De um modo geral os soros dos casos agudos demonstraram possuir uma maior concentração de anticorpos fixadores que os casos crônicos.

Os soros de doentes portadores da doença de Chagas na presença dos antígenos de *Leishmania brasiliensis* e de *Trypanosoma equinum* mostraram-se capazes de fixar o complemento e os resultados observados nos tubos contendo maiores concentrações de sôro, foram iguais aos obtidos quando em presença do antígeno específico.

O sôro de leishmaniose tegumentar comportou-se de igual maneira embora com menor intensidade, mas o sôro de equídeo infectado com *Trypanosoma equinum* só fixou em presença do antígeno homólogo.

Êsses resultados com os obtidos nas provas de aglutinação além de confirmarem um fato já conhecido das reações de imunidade darem reações

de grupo, servem para demonstrar que na constituição antigênica do *Schizotrypanum cruzi* entram em maior concentração antígenos com essas características do que nas do *Trypanosoma equinum* e da *Leishmania brasiliensis*.

O estudo comparativo dos resultados obtidos com as reações de aglutinação e de fixação de complemento em soros de doentes de *Tripanosomíasis americana* demonstra concordância entre as duas reações. Em 24 soros só um apresentou reação de fixação positiva com a ausência de aglutininas. Esse soro provinha de um caso crônico com xenodiagnóstico positivo.

Em vista do número relativamente pequeno de soros com que trabalhamos, só um estudo sistemático das duas reações em soros dos indivíduos residentes em regiões nas quais grassa essa endemia poderá determinar o grau de concordância dessas duas reações.

Quanto a intensidade das duas reações, em relação a um mesmo soro, foi observado variações, pois soros que aglutinavam num título elevado, só fixaram o complemento quando em concentrações mais altas, enquanto outros dotados de menor poder aglutinante foram capazes de fixar em concentrações mais baixas.

Dos processos mais comumente utilizados até hoje para a diagnose dos casos crônicos de *Tripanosomíasis americana*, a fixação de complemento se nos afigura ser aquêle que resultados mais sólidos e seguros oferece, pois o xenodiagnóstico além de exigir um espaço de tempo relativamente longo para obtenção dos resultados (40 a 50 dias), falha em muitos casos.

A técnica de Davis resolveu o maior empecilho que se antepunha ao emprego dessa reação, permitindo a obtenção de um bom antígeno que se mantém estável por espaço de tempo bastante longo.

A obtenção de culturas em massa de *Schizotrypanum* para o seu preparo é de técnica fácil, não necessitando de meios de cultivo com composição complexa. Os elementos básicos, são representados por sangue de coelho e a glicose. O modo de se proceder as sementeiras bem como o emprêgo de uma temperatura constante (28 a 29.º C.), são de capital importância. O desenvolvimento sob um substrato sólido humedecido dão um rendimento muito maior que culturas em camada líquida abundante.

Antes de terminar queremos agradecer ao Dr. Emmanuel Dias as facilidades que nos proporcionou na obtenção da maioria dos soros com que trabalhamos, bem como pelos dados referentes aos xenodiagnósticos e exames direto do sangue. Ao nosso mestre Dr. Aristides Marques da Cunha e ao Dr. Genard Nobrega pelas facilidades na obtenção dos soros dos casos hospitalizados no Hospital Evandro Chagas e ao nosso técnico Sr. Atilio Borrielo pelo auxílio prestado no decorrer dêste trabalho.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1) The AA. present a contribution toward the elaboration of a method for the laboratory diagnosis of Chagas' disease, suitable for routine work.

2) Complement fixation test has been studied in detail and attempts to remove the difficulties which prevent the practical application of this test, have been realized.

3) Agglutination test has been performed on acute and chronic cases of Chagas disease as well as in healthy individuals, and results compared with complement-fixation test.

4) The organisms used as antigen in both tests have been cultured successfully in a broth-dextrose-rabbit blood-agar in Erlenmeyer flasks, covered by a thin layer of liver broth-glucose, as described in the text. In this medium the flagellates have grown luxuriantly and a single Erlenmeyer flask containing only 25 cc. produces more or less 0,5 cc. of packed flagellates.

5) A comparative study of the various antigens (Romaña & Dias, Kelser, Davis etc.) proposed for the complement fixation test led to the following conclusions.

a) A suspension of the parasites killed and preserved with 0,1% formalin, is practically devoid of fixation power.

b) Autolysates present poor preservation capacity and its fixative activity rapidly falls.

c) Dessicated flagellate bodies are easily preserved and fix very well the complement, but is more strongly anti-complementary than Davies antigen.

d) Romaña & Dias antigen presents a weak fixative power as compared with Kelser and Davis preparations.

e) Kelser antigen when recently prepared, has a highly fixative capacity which soon falls, with a progressive increase in its anticomplementary activity.

f) Davis antigen is the best. It has a strong fixative power, and a small anticomplementary activity which are not altered by storage, at least for three months, in accordance with AA. experience. This antigen has been adopted in this work.

6. Variations in the fixative capacity of different strains of *Schizotrypanum cruzi* could not be observed.

7) The complement fixation applied to sera from cases of Chagas' disease but using an antigen suspension of *Leishmania brasiliensis* (Davis method) and *Trypanosoma equinum* (living organisms) has shown a strong fixative property of both antigens, chiefly in tubes with a greater concentration of the serum.

A different result was observed in relation to the behaviour of horse serum which gave positive fixation reaction only in the presence specific antigen (*Trypanosoma equinum*).

These observations as well as the action of Chagas disease sera on *Leishmania brasiliensis* and vice-versa (see tables V and VI), suggests the existence of greater concentration of group antigens in the *Schizotrypanum cruzi* than in *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma equinum*.

8) Davis method has been tried with *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma equinum*. With the former, it gave entirely satisfactory results in the complement fixation test and allergic skin test for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. With *Trypanosoma equinum* as antigen in the complement fixation test in presence of sera from horses with "mal de cadeiras" this method has offered results incomparably poorer than living suspension.

9) This test has been performed with sera from 24 cases of Chagas' disease controled by xenodiagnosis or by the evidention of parasites in the blood. All samples have fixed the complement, except one, the serum nr. 28 (see table III which did not fix the complement, in spite of presenting positive xenodiagnosis. Sera nrs. 17, 21 and 26 gave positive complement fixation reaction with negative xenodiagnosis.

Two sera from suspected "armadillos" gave positive reactions as well as a suspected dog.

Three cases of malaria reacted negatively as well as four cases of leprosy, one presenting Wassermann positive, nine normal sera with that reaction negative. Sera from three cases of yaws with positive Wassermann reaction, exhibited also negative results.

Finally a serum from a horse infected with *Trypanosoma equinum*, gave equally a negative result.

The only exception amongst the controls was a case of skin leishmaniasis which fixed the complement with the lowest dilution of the serum (1/2).

10) The AA. introduced the agglutination test as a diagnosis method for human cases of Chagas' disease.

The technic has been described in detail at the first part of this work. Twenty six sera from the cases of acute and chronic Chagas' disease, which have been used for complement fixation, were used for agglutination test,

as well as the sera from the three suspected animals, and from the cases of other diseases used for the complement fixation test.

11) Positive results were obtained in 25 of the 26 cases, and agglutination was observed at dilutions varying between 1/160 to 1/10240. Only one case of Chagas' disease did not give positive test.

12) Acute cases furnished more potent agglutinating sera, acting in higher dilution (1/2560 to 1/10240). The samples from chronic cases have shown agglutinating activity in dilutions from 1/160 to 1/2560.

13) The sera from the two suspected "armadillos" and one dog agglutmann positive serum, gave negative results.

14) The 3 cases of malaria, 1 case of skin leishmaniasis and 1 Wassermann pos. serum, gave negative results.

15) Some samples from healthy individuals as well as cases of leprosy, yaws and the horse infected with *Trypanosoma equinum*, have shown agglutinating activity in lower dilutions, not higher than 1/80. This unexpected behaviour as has been demonstrated in two human sera, possessing the highest activity observed, is due to the presence of heterophilic anti-bodies, as shown by the fact that the same samples have agglutinate sheep corpuscles in higher dilution (1/160 to 1/320), and this activity has been lost by absorption through guinea pig kidney pulp. Sera from cases of Chagas' disease absorbed by the same material, have maintained practically their agglutinating capacity, with only a slight alteration, as summarized in table VII.

16) Acute cases of Chagas' diseases possess high agglutinating activity upon *Leishmania brasiliensis* used as antigen, manifested in dilutions from 1/2560 to 1/5120, but the serum from cutaneous leishmaniasis failed to agglutinate *Schizotrypanum cruzi*.

The serum tested has activity against the homologous antigens at 1/160.

17) The majority of the samples of sera tested for agglutinins has shown types of H and O agglutination, occurring the former at higher concentrations and thesecond at the lower ones. With some sera almost exclusively somatic agglutination was observed.

18) The results of both agglutination and complement fixation tests, are shown in table III.

The accordance in the results between the two tests is perfectly satisfactory. Only one sample which has fixed the complement demonstrated the absence of agglutinins. This was a case of chronic Chagas' disease with positive xenodiagnosis.

19) Concerning the intensity of both reactions on a same serum, not a such accordance has been observed because some samples, which revealed a strong agglutinating capacity, have fixed the complement only in higher concentrations.

20) Agglutination reaction, when positive at dilution higher than 1/160 and with control of heterophilic antibodies with the sera agglutinating at low dilutions (1/80, 1/160), seems to be a very useful diagnostic method for Chagas disease.

21) Until further data on these reactions will be available, complement fixation test is the most secure method for the diagnosis of this disease, and the AA. believe that with the introduction of Davis antigen and of methods for mass culture of the flagellates in accordance with the technic herein given, this test is perfectly apt to be included amongst routine methods for laboratory diagnosis of Chagas disease.

BIBLIOGRAFIA

CARDOSO, F. A.

1943. Bol. n.º 79 Inst. Hig. São Paulo.

CUNHA, A. M. DA & DIAS, E.

1939. C. R. Soc. Biol., 129 : 991.

CUNHA, A. M. DA & VILELA, E.

1919. Citados por Vilela e Bicalho.

DAVIS, D. J.

1943. Publ. Health Rep. 58 : 20

GUERREIRO, C. & MACHADO, A.

1913. Brasil Med. n.º 23 : 225.

KELSER, R. A.

1936. Am. J. Trop. Med. 16 : 405.

LACORTE, J. G.

1927. Mem Inst. O. Cruz 20 : 197.

MINNING, W.

1935. Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. 39 : 315.

MUNIZ, J.

1930. V Reunion Soc. Arg. Pat. Reg. n.º 2 : 297.

PACKCHANIAN, A.

1940. Publ. Health Rep. 55 : 46.

PATTO, O.

1930. An. Fac. Med. Minas Gerais.

ROMEIRO, O. S.

1941. *O Hosp.* 20 (4) : 587-590.

SENEKJIE, H. A.

1943. *Am. J. Trop. Med.* 23 : 5.

SENEKJIE, H. A.

1943. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 52 : 1.

VILLELA, E.

1930. *An. Fac. Med. Minas Gerais* 2 (1):1-18.

VILLELA, E. & BICALHO, C.

1923. *Mem. Inst. Os. Cruz* 26 : 13-29.