

Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e sub-agudas da "Doença de Chagas" (Trypanosomiasis americana)

por

Júlio Muniz

(Com 1 gráfico e 1 fotografura no texto)

Em trabalhos publicados em 1944 e 1946 (1, 2, 3) tendo por assunto o estudo da imunidade humoral na doença de Chagas, tivemos ocasião de demonstrar, que nessa doença, ocorria uma elevada concentração de anticorpos no sangue (amboceptor, aglutininas e precipitinas), concentração essa, que atingia seu ápice na fase aguda, declinando com a passagem da doença para o estado crônico e coincidindo tal fato, com uma diminuição do número de unidades parasitárias na corrente circulatória.

Estudo idêntico, procedido em rhesus infectado experimentalmente, demonstrou, que o aparecimento de anticorpos específicos podia ocorrer já na primeira fase do período parasitológico da infecção, isto é, no período prepatente, se elevando rapidamente com a passagem para o período patente.

A casuística humana sobre a qual baseamos esses nossos trabalhos, era representada por 12 casos agudos, muitos dos quais, foram observados em diferentes períodos até a fase de cronicidade, e 233 casos, já neste último estadio da doença.

De acôrdo com esses estudos, e tomando como índice a concentração de aglutininas no sôro, podemos representar a evolução da imunidade humoral nos diferentes períodos dessa infecção (parasitológico ou da enfermidade), como mostra o gráfico 1.

GRÁFICO 1

Nesse gráfico, tomamos como média da duração do período prepatente, 10 dias, e do período patente, 30 dias, embora variações possam ocorrer na duração desses períodos. É de notar que no homem, como no rhesus, a passagem do período patente para o post-patente, se processa geralmente gradativamente e em tempo variável, e que, no decorrer deste último período,

embora o parasita possa circular no sangue de maneira contínua ou intermitente, o seu número é sempre pequeno e só demonstrável por meios indiretos (Xenodiagnóstico, inoculação, etc.).

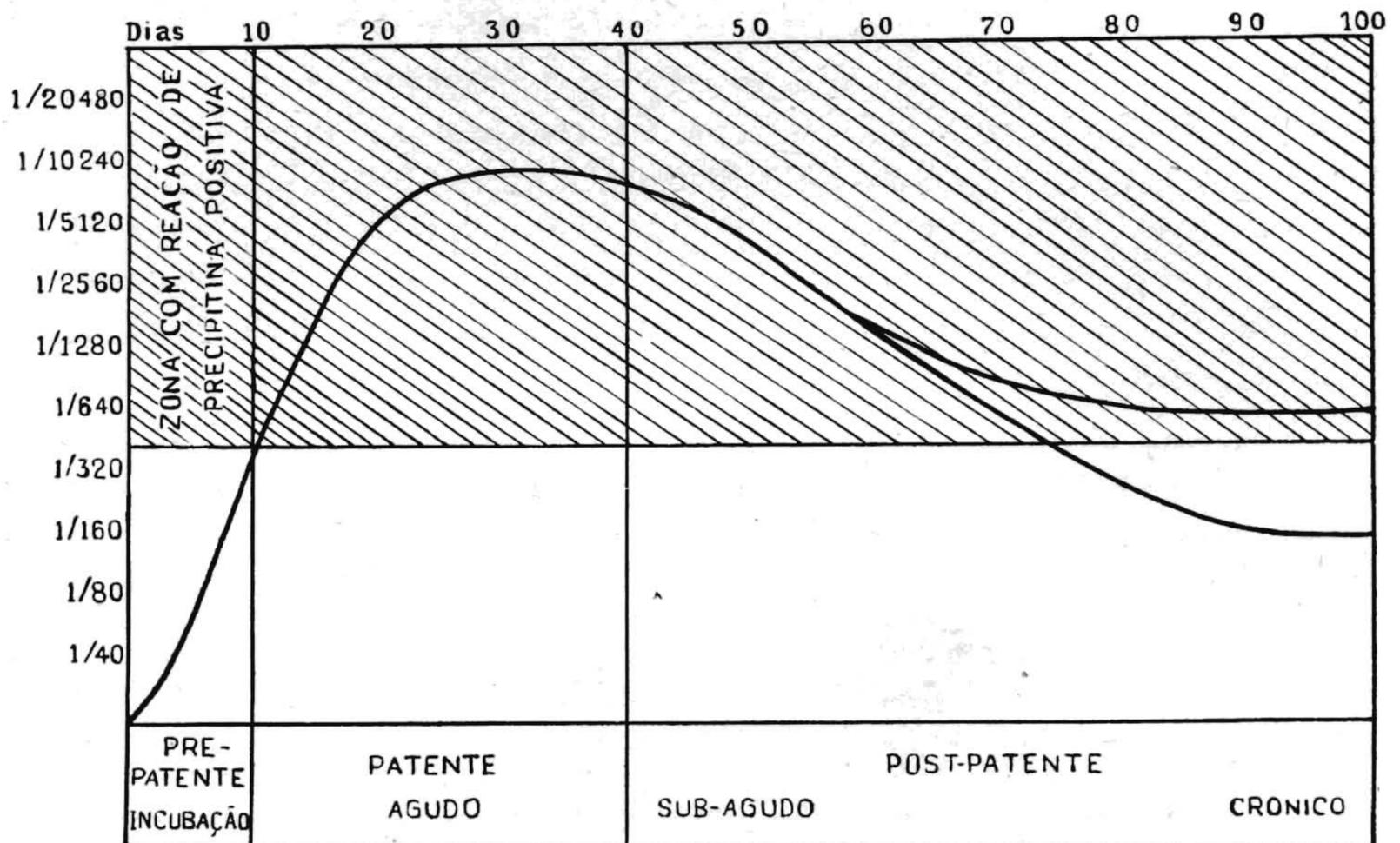


Gráfico I — Evolução do teor de aglutininas nos diferentes períodos da *Tripanosomiasis americana*. (Dados de 2 casos tomados com exemplo)

A fase de ascensão do teor em anticorpos no sangue, corresponde justamente à passagem crescente das unidades parasitárias para a corrente circulatória, oriundas, não só do foco inicial da infecção, como dos novos focos formados pela disseminação do parasita no organismo à custa das vias linfática e sanguínea, fato esse, que caracteriza o início do período patente. Essa elevação que se processa rapidamente, vem a se estabilizar após alguns dias, permanecendo então, em níveis bem altos (títulos aglutinantes 1/2500, 1/5000, 1/10000 e 1/20000), por um período variável (15 a 40 dias) e na dependência da maior ou menor concentração de parasitas no sangue. Os títulos aglutinantes mais baixos por nós observados no decorrer deste período, correspondiam a sôros de crianças de baixa idade (1 a 2 anos), embora tal fato, não constitua regra em relação a esses casos.

Com a diminuição crescente do número de parasitas na corrente circulatória, fase que se inicia geralmente 30 ou 40 dias após o início da infecção e que corresponde ao fim do período patente, ocorre uma queda do teor de anticorpos no sangue. Essa queda, que se processa na maioria dos casos

gradativamente e mais raramente de maneira abrupta, traz em consequência, um abaixamento sensível da primitiva concentração, vindo ela a se fixar posteriormente e após um período muito variável, em níveis bem mais baixos (títulos aglutinantes 1/640, 1/320, 1/160), caracterizando tal quadro imunológico, a fase crônica da doença.

Em relação a certos animais, como o rhesus, o cão e tatús, pudemos verificar, que quando infectados pelo *S. cruzi*, apresentam sob o ponto de vista da imunidade humoral um quadro muitas vezes semelhante ao do homem, ao contrário do cobaio e camondongo, nos quais a concentração de anticorpos no sangue permanece em níveis bem mais baixos, no decorrer de todo o período infeccioso.

Exposta desta maneira a evolução da imunidade humoral na «Doença de Chagas» conforme pudemos observar, passamos agora, ao assunto principal deste trabalho, que é o de demonstrar, o valor da prova de precipitina no diagnóstico das formas agudas e sub-agudas dessa tripanosomiase.

Em trabalhos publicados em 1944 (2) e 1946 (3) tivemos ocasião de expôr os primeiros resultados por nós obtidos com êsse tipo de reação na elucidação de tais casos.

Empregando pela primeira vez a técnica de Fuller para extração do polisacarídeo de bactéria no estudo dos protozoários, conseguimos extrair das formas de cultivo de *S. cruzi*, uma fração, que se comportou como um ótimo precipitinogênio e mostrou-se dotada de elevado poder fixador, quando empregada como antígeno nas reações de fixação do complemento.

Certas características imunológicas e químicas desta fração, já foram por nós relatadas em publicações anteriores (2 e 3).

Queremos assinalar aqui, que recentemente, Robinson e Wichelhausen (4), em estudos sobre o comportamento imunológico de certos espiroquetídeos, utilizaram a técnica de Fuller com bons resultados, na obtenção de precipitinogênios desses organismos.

No presente trabalho vamos expor os resultados obtidos em 21 novos casos de forma aguda da *Trypanosomiasis americana* que tivemos ocasião de estudar ultimamente, todos provenientes de Bambuí, Estado de Minas Gerais, com exceção de um, cujo soro nos foi enviado pelo Prof. Adriano Pondé, da Bahia.

Somando êsses novos casos aos 12 anteriormente observados, temos um total de 33 casos, que constituirão a casuística sobre a qual fundamentaremos as conclusões a que chegamos sobre o valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e sub-agudas dessa enfermidade.

Antes de expormos a nova casuística e os resultados obtidos, e com o fim de facilitar aquêles que desejarem verificar os fatos por nós aqui relatados, reproduziremos as técnicas de extração e da reação pròpriamente dita, por nós utilizadas nestes estudos.

MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Tomam-se 0,5 cm³ de massa húmida de parasita, obtidos de cultivo em meio sólido segundo técnica por nós descrita (1) e com a idade de 6 a 8 dias, libertadas por meio de filtração em algodão de qualquer fragmento de gelose e submetidas a lavagens sucessivas em soluto fisiológico por meio de centrifugação. Adicionam-se 1 a 1,5 cm³ de formamida (Kalbaum). Após agitação, a suspensão contida em tubo centrífugo é aquecida a 150° graus, em banho de glicerina, pelo espaço de 10 a 15 minutos, findo o que a suspensão é resfriada e adicionada de 5 cm³ de álcool clorídrico (95 partes de álcool absoluto e 5 partes de 2NHC1). Essa mistura, é agitada pelo espaço de 15 a 20 minutos várias vêzes, e depois submetida a centrifugação com o fim de retirar a parte insolúvel. O líquido sobrenadante, é passado para um novo tubo centrífugo e adicionado de 10 cm³ de acetona pura (Merck). Após rápida agitação, a mistura é deixada em repouso por 10 a 15 minutos, findos os quais, e submetida a nova centrifugação para separar o precipitado formado pela adição da acetona. Terminada esta operação, a parte líquida é desprezada e o tubo com o precipitado colocado numa câmara de vácuo para apressar a evaporação completa da acetona. Isto obtido, ao precipitado são adicionado 2 a 3 cm³ de soluto fisiológico a 0,85%, e o precipitado resuspenso por agitação.

O meio se apresenta então com reação fortemente ácida, e nestas condições só uma pequena parte do precipitado é dissolvido. Elevando-se o pH a 7 ou 7,2 por meio de uma solução fraca de carbonato de sódio e usando como indicador o bromo cresol purpura (prova de toque), obtem-se uma solubilidade maior. Como essas duas frações reagem de igual maneira na prova de precipitina, costumamos proceder à extração num tempo só, levando o pH do meio a 7 ou 7,2, logo após a suspensão do precipitado em soluto fisiológico. Terminada essa operação, a suspensão é agitada várias vêzes e deixada em temperatura ambiente pelo espaço de 2 horas para depois ser submetida a uma centrifugação intensa (3000 r.) e demorada (15 a 20 minutos), com o fim de retirar a fração insolúvel. Decorrido êsse tempo o líquido sobrenadante é passado para novo tubo e deixado durante a noite a 5°C., para depois sofrer nova centrifugação com o fim de retirar qualquer precipitado que se venha a formar posteriormente. Antes de ser distribuído em empolas para

ser guardado, o precipitinogenio assim obtido é testado, na prova do anel, com um sôro imune *anti-cruzi*.

A fração insolúvel que resta, embora possa ser solubilizada em meio com o pH acima de 8, e manter-se assim após a volta do meio a um pH não inferior a 6,8 deve ser desprezada, porque embora lentamente (1 a 2 horas) é capaz de reagir na prova do anel com sôros normais.

A partir da precipitação pela acetona, as diferentes fases que seguem, devem ser conduzidas com técnica bacteriológica, a fim de evitar contaminação, principalmente por cogumelos. Desde que isso não ocorra, o precipitinogenio assim obtido, pode ser conservado em ampolas fechadas, a temperatura de 5°C, por mais de um ano. Ele deve se apresentar no final da operação com aspecto de um líquido límpido e incolor.

TÉCNICA DA REAÇÃO

Usamos na reação de precipitina, a técnica do anel.

Para isso, 0,1 cc. de sôro a estudar, completamente límpido e não hemolisado, é colocado num pequeno tubo, medindo 3 mm de diâmetro e do tipo comumente usado nessa reação. Em seguida, quantidade igual do precipitinogenio é deixado escorrer lentamente pela parede do tubo, a fim de formar uma camada distinta, acima daquela constituída pelo sôro.

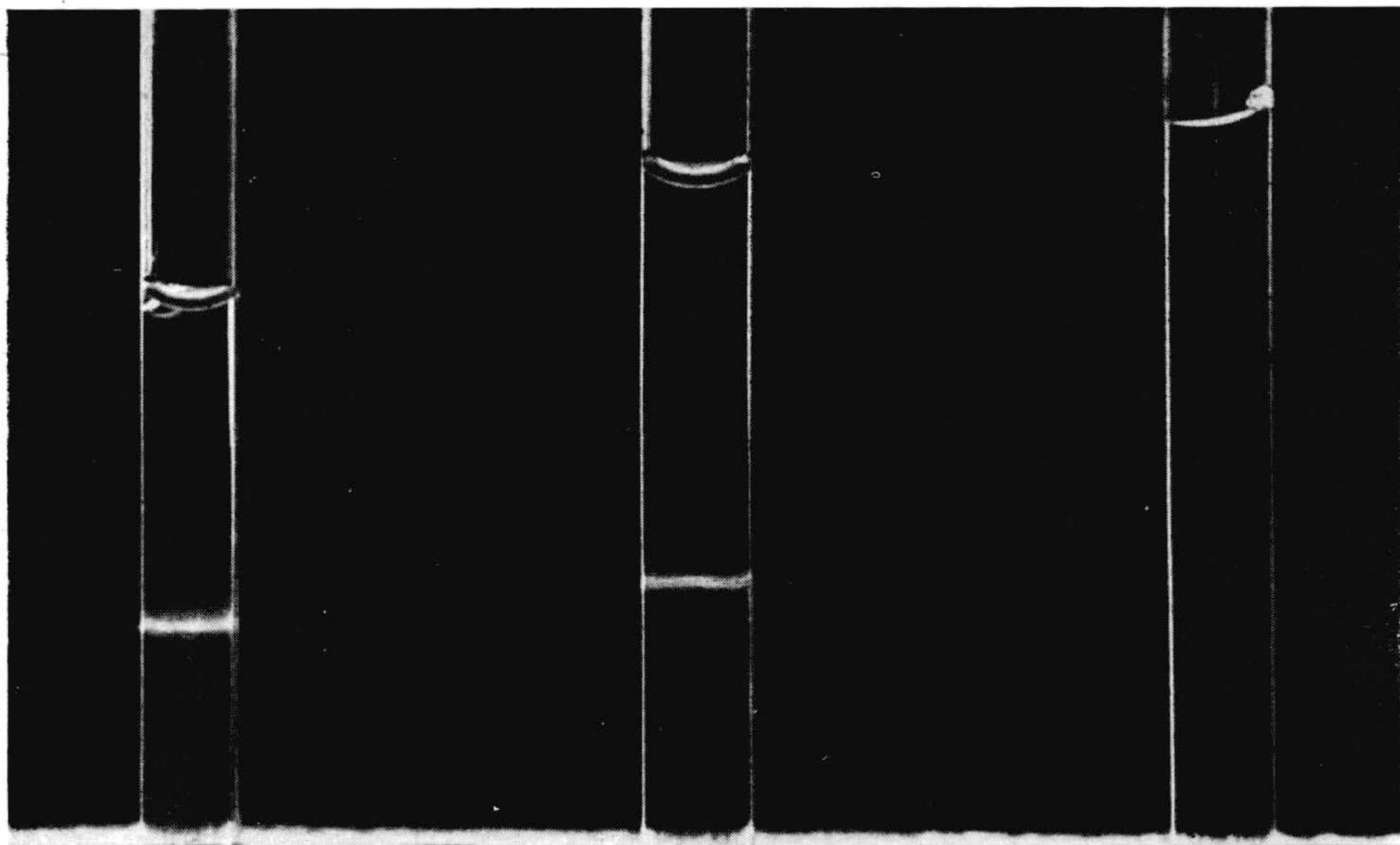
Para cada sôro a estudar, é feito na mesma ocasião, um tubo testemunha, no qual o precipitinogenio é substituído por simples soluto fisiológico.

O tubo testemunha tem por fim evitar falsos resultados, pois alguns sôros, principalmente aquêles com certo grau de hemolise ou ricos em lipídios, são capazes de apresentar uma turvação, quando em contacto com simples soluto fisiológico, perturbando por isso, a reação.

Quando o sôro a estudar se apresenta turvo, mesmo após centrifugação demorada, devido a presença de lipídios, costumamos deixar esse sôro à temperatura de 5°C., durante toda a noite, e depois submetê-lo enquanto resfriado, a nova centrifugação. Desta maneira consegue-se separar grande parte dessa fração que se condensa na superfície, do resto do sôro já com aspecto mais límpido.

Os tubos de reação e testemunha são deixados à temperatura ambiente. Nos sôros dotados de alto poder precipitante, como é a regra nos casos agudos, a reação se processa rapidamente, já no fim de 1 a 2 minutos, com a formação de um anel de aspecto esbranquiçado na zona de contato (Fig. 1).

Esse anel, com o decorrer do tempo, se acentua cada vez mais, transformando-se, no fim de uma a duas horas, numa zona esbranquiçada menos delimitada.



Reação de precipitina — Os dois tubos à esquerda contem sôros de doentes na fase aguda da *Tripanosomiasis americana* e o da direita de um indivíduo normal

Nos sôros de menor atividade, a reação se processa em 10 ou 20 minutos, ou mesmo após um tempo mais longo, devendo por isso, a leitura final ser feita no fim de 24 horas. Devido a êsses casos, o material a ser empregado na reação deve ser todo esterilizado e as operações, conduzidas com técnica bacteriológica. Isto tem por fim, evitar que desenvolvimento de bactérias no meio, venha falsear os resultados. Nos casos negativos, não há necessidade de repetir a prova utilizando diluições crescentes do precipitinogenio, como fazíamos inicialmente, isto porque nunca observamos com amostra alguma dêsse componente por nós obtida até hoje, inibição da reação, devida a uma elevada concentração.

Costumamos expressar os resultados dessa reação da seguinte maneira :

- ++++ — Início da formação do anel nos primeiros 10 minutos.
- +++ — Início da formação do anel entre 10 e 20 minutos.
- ++ — Início da formação do anel após 30 minutos.

FIGURA 1

CASUÍSTICA E RESULTADOS

No quadro 1 acham-se agrupados os novos casos com a forma aguda da «Trypanosomiasis americana», em número de 21, estudados por nós ultimamente. Nas três primeiras colunas desse quadro, figuram não só as iniciais dos nomes, como a idade e a data do aparecimento dos primeiros sintomas da doença, representados geralmente, por febre, olho inchado ou lesão cutânea. Nas quatro últimas colunas encimadas pela rubrica «Verificações sorológicas», constam as datas de colheita do sangue, o tempo decorrido entre esta operação e o aparecimento dos primeiros sinais da doença e finalmente, os resultados das provas de precipitina e aglutinina. A maneira de interpretar a representação desses resultados, figura na parte inferior do quadro. Quanto à técnica empregada para a primeira dessas reações, é a que descrevemos neste trabalho e quanto à segunda, é a que consta de um trabalho anterior (1). Nesta última utilizamos sempre suspensões vivas do parasita (amostra Tatú), oriundas de cultivo com 6 a 8 dias em meio sólido, a leitura dos resultados sendo procedida após 24 horas, a 37°C., em banho-maria.

QUADRO 1

A análise dos resultados obtidos, demonstra que êsses 21 novos casos apresentam, sob o ponto de vista imunológico, uma evolução semelhante aos 12 primeiros já estudados, isto é, elevado teor de imune-corpos (aglutinina e precipitina) no período inicial da infecção (fase aguda), seguida de uma queda progressiva desse teor, com a passagem da doença para a fase crônica.

A concentração mais baixa por nós encontrada em relação a êsses casos foi a apresentada pelos doentes L.V.J., I.A.P., com as idades de 1 e 2 anos, cujos sôros, aglutinavam em títulos de 1/1280.

A prova de precipitina se mostrou positiva em todos os casos e em alguns mesmo depois de decorrido um período de 3 a 4 meses após o início dos primeiros sintomas. Os resultados foram fortemente positivos (+ + + +), isto é, foram obtidos dentro de 10 minutos, na maioria dos sôros com um teor em aglutininas não inferior a 1/2560; dentro de 10 a 20 minutos (+ + +) nos sôros com um teor igual a 1/1280; e após um período mais longo, compreendido entre 20 minutos a 24 horas (+ +), quando êsse teor não ultrapassava 1/640.

QUADRO I

N.º	NOME	IDADE	DATA DO APARECIMENTO DOS PRIMEIROS SINTOMAS (EDEMA PALPEBRAL, FEBRE OU LESÃO CUTÂNEA)	DATA EM QUE FOI FEITA A 1.ª VERIFICAÇÃO DO PARASITA NO SANGUE	VERIFICAÇÕES SOROLÓGICAS			
					DATAS DA COLHEITA DO SANGUE	TEMPO DECORRIDO DO INÍCIO DA INFECÇÃO	RESULTADO DA REAÇÃO DE PRECIPITINA	TÍTULO AGLUTINANTE DE SORO
1	E. C. J.....	10 anos.....	9-10-46	22-10-46	25-10-46 5-12-46 28- 3-47 9- 4-47	16 dias 77 > 164 > 176 >	++++ ++++ +++ ++	1/5120 ++ 1/2560 ++ 1/640 +++ 1/640 ++
2	M. A. J.....	7 anos.....	11-10-46	25-10-46	25-10-46 5-12-46	14 dias 55 >	++++ +++	1/5120 ++ 1/2560 ++
3	L. V. J.....	1 ano e 3 meses	15-10-46	21-10-46	25-10-46 7-12-46	10 dias 54 >	+++ ++	1/1280 ++ 1/640 ++
4	M. A.....	1 ano e 2 meses	± 2-11-46	12-11-46	19-11-46	17 dias	++++	1/10240 ++
5	E. R. F.....	4 anos.....	3-11-46	20-11-46	19-11-46 9- 4-47	16 dias 140 >	++++ ++	1/10240 ++ 1/640 ++
6	A. P.....	2 anos.....	11-11-46	22-11-46	5-12-46 9- 4-47	24 dias 124 >	+++ ++	1/1280 ++ 1/640 ++
7	M. B.....	6 anos.....	12-11-46	27-11-46	5-12-46 28- 3-47 9- 4-47	23 dias 135 > 147 >	++++ +++ ++	1/10240 ++ 1/1280 ++ 1/640 ++
8	N. C.....	2 anos.....	± 22-11-46	11-12-46	30-12-46 9- 4-47	38 dias 98 >	++++ +++	1/2560 ++ 1/640 ++
9	A. C. C.....	32 anos.....	5-12-46	5- 1-47	5- 1-47 21- 1-47	31 dias 47 >	++++ ++++	1/5120 +++ 1/5120 +++
10	O. P. C.....	7 meses.....	11-12-46	18-12-46	30-12-46	19 dias	++++	1/2560 ++
11	G. M. J.....	5 anos.....	16-12-46	24-12-46	27-12-46	11 dias	++++	1/5120 ++
12	I. G. R.....	1 ano e 6 meses	29-12-46	6- 1-47	21- 1-47	24 dias	++++	1/10560 ++
13	D. H.....	4 anos.....	24- 1-47	29- 1-47	13- 3-47 9- 4-47	48 dias 75 >	++++ ++++	1/10240 ++ 1/1280 ++
14	R. A.....	23 anos.....	28- 1-47	27- 2-47	13- 3-47 28- 3-47 9- 4-47	44 dias 58 > 66 >	++++ ++++ ++++	1/2560 ++ 1/2560 ++ 1/1280 ++
15	A. G.....	1 ano.....	20- 2-47	11- 3-47	29- 3-47 9- 4-47	37 > 48 >	+++ +++	1/2560 ++ 1/2560 ++
16	G. C.....	7 anos.....	4- 3-47	8- 3-47	13-3- 47 28- 3-47 9- 4-47	9 dias 24 > 35 >	++++ ++++ ++++	1/10240 ++ 1/10240 ++ 1/5120 ++
17	N. A.....	5 anos.....	15- 3-47	4- 4-47	30- 4-47 19- 5-47	46 dias 65 >	++++ ++++	1/5120 ++ 1/5120 ++
18	J. L.....	14 anos.....	6- 4-47	25- 4-47	1- 5-47 15- 5-47	27 dias 42 >	++++ ++++	1/5120 +++ 1/5120 +++
19	E. M. J.....	1 ano e 5 meses	25- 4-47	30- 4-47	7- 5-47 30- 5-47	12 dias 35 >	++++ ++++	1/5120 +++ 1/2560 +++
20	O. J.....	5 anos.....	fins de 4-47	16- 5-47	30- 5-47	± 35 dias	++++	1/5120 ++
21	A.M.M(Bahia)..	8 anos.....	8- 1-47	tôdas as pesquisas negativas — só xero positivo	12- 2-47	25 dias	++++	1/5120 +++

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

PROVA DE PRECIPITINA	PROVA DE AGLUTINAÇÃO
++++ Formação do anel nos primeiros 10'	++++ Tipo flagelar
+++ Formação do anel entre 10' e 20'	+++ Tipo somático
++ Formação do anel após 30'	++ Aglutinação parcial

CONCLUSÕES

Baseados em nossos estudos, podemos afirmar, que a «Doença de Chagas» se diferencia, pelo seu quadro imunológico de tôdas as outras doenças do homem produzidas por protozoários, pois em nenhuma outra foi até hoje demonstrada uma imunidade humoral tão acentuada como a que apresenta essa tripanosomiase, na sua fase aguda.

O conhecimento de tal fato, e a obtenção pelo método de Fuller, de uma fração solúvel na água e perfeitamente estável das formas de cultivo do *S. cruzi*, tornou possível o emprêgo de uma reação de técnica tão simples como a de precipitina para o diagnóstico das formas aguda e sub-agudas dessa doença.

Numa casuística de 32 casos agudos que nos foi dado estudar até hoje, ela se mostrou sempre positiva (100%) podendo permanecer muitas vezes assim, no decorrer de um período de três a quatro meses após o aparecimento dos primeiros sintomas.

A importância que terá esta reação na elucidação de tais casos, poderá ser avaliada se levarmos em consideração o que segue :

A *Trypanosomiasis americana* é uma doença parasitária, capaz de evolver desde a sua fase inicial sem sintomatologia apreciável, e por isso mesmo, podendo passar muitas vezes despercebida ao próprio doente.

Tal fato é evidenciado, se levarmos em conta a desproporção entre os casos diagnosticados na fase aguda com os casos crônicos identificados pelas reações sorológicas em centros em que grassa endemicamente a doença como o de Bambuí, Estado de Minas Gerais, e se considerarmos também que, nesses últimos, a anamnese na maioria das vezes não revela nenhum dado referente a uma possível infecção na vida pregressa. Precisa ser dito que em Bambuí, funciona um centro de estudos dessa doença no qual trabalham médicos especialistas aos quais dificilmente passariam despercebidos casos agudos de sintomatologia suspeita.

O meio mais rápido, utilizado até hoje, para o diagnóstico da forma aguda é representado pela demonstração direta do parasita no sangue por meio da técnica do exame a fresco ou dos frotis distendidos, ou em gota espessa e submetidos depois a coloração.

Sobre o valor desses processos transcreveremos a opinião insuspeita de Talice : (5) «*El frotis como el exame en fresco — sólo puede permitir hallar tripanosomas después de un tiempo prudencial, en los enfermos que los presentan en abundancia en la circulación*». Referindo-se ao exame a

fresco diz : «*No puede tampoco servir como metodo sistematico em encuestas epidemiologicas, aún realizadas por especialistas, pues exige tambien un tiempo demasiado largo para tales circunstancias*». E sobre a gota espessa, que êle considera um dos melhores métodos, diz : «*El exame de la gota «Espessa» exige como dijimos, tiempo y paciencia. Es un examen a menudo fatigoso*».

Todos os outros processos para a demonstração do parasita, como cultura, inoculação e xenodiagnóstico dão sempre resultados tardios.

Sobre todos êsses processos, a reação de precipitina apresenta as seguintes vantagens :

- 1º Técnica da reação extremamente simples.
- 2º Precipitinogenio estável e de duração longa, desde que seja guardado livre de contaminação.
- 3º Quantidade de sôro necessário para a reação : 0,2 cm³ sendo 0,1 cm³ para o tubo pròpriamente da reação e 0,1 cm³ para o tubo testemunha.
- 4º Resultado imediato, pois a maioria dos sôros de casos agudos reage dentro de 1 a 2 minutos.
- 5º Absolutamente específica, pois apesar do precipitinogenio do *S. cruzi* reagir em presença de imune-sôros preparados em coelho com amostras das diversas espécies de *Leishmania*, conforme demonstramos em trabalho anterior (2), tal fato não ocorre em presença de sôros de indivíduos portadores de Leishmaniose tegumentar e Leishmaniose visceral americana, devido à baixa concentração de anticorpos que êles possuem.
- 6º Ela pode constituir um índice do grau de imunidade humoral, pois geralmente ocorre quando o poder aglutinante do sôro se apresenta em títulos acima de 1/500.
- 7º Como a imunidade humoral está quase sempre ligada a maior ou menor atividade do parasita no organismo, ela poderá constituir, também, um índice dessa atividade, como ocorre nas formas aguda e sub-aguda da doença.
- 8º De grande utilidade nos inquéritos epidemiológicos para evidencição dos casos ativos.

Em relação a seu emprêgo no diagnóstico dos casos crônicos, o valor decái muito, pois, como tivemos ocasião de mostrar em 211 casos com essa forma da doença, só 18% deram reações de precipitina positivas, não podendo, por conseguinte, substituir nesse particular a reação de fixação do complemento.

Utilizando a técnica de aglutinação de partículas e adsorvendo o precipitinogênio a partículas de colódio ou de carmin, temos conseguido resultados animadores no diagnóstico desses casos. Esses estudos estão em andamento.

Ao terminar queremos consignar os nossos agradecimentos ao Dr. Genard Nóbrega, chefe de clínica do Hospital Evandro Chagas, pelos dados relativos à história clínica de cada doente e pelas facilidades que sempre nos proporcionou na obtenção dos sêros com que trabalhamos.

CONCLUSIONS

Based upon our studies of the subject, we are convinced that Chagas' disease differs, in its immunologic picture, from all other diseases produced in man by protozoa, because up to now in no other disease has so stressed a humoral immunity been demonstrated, as that offered by this trypanosomiasis in its acute stage.

The knowledge of this fact and the obtainment by the Fuller method of a fraction from culture forms of *S. cruzi* that is soluble in water and perfectly stable, has made possible the application of a precipitin reaction, presenting a so simple technique for the diagnosis of the acute and sub-acute forms of the disease.

In an incidence of 32 acute cases, which we have had a chance of studying up to the present time, it has always proved positive (100%), and can often so remain during a period of from three to four months after the manifestation of the first symptoms.

The importance of this reaction in elucidating such cases may be calculated if we take into consideration the following :

Trypanosomiasis americana is an infectious disease capable of developing from its initial phase without appreciable symptomatology, and for this reason may frequently pass undetected even by the patient himself.

This fact is made evident if we take into account the disparity between the finding of acute cases revealed by symptoms and the chronic cases detected by means of serological reactions, as it occurs in Bambuí, State of Minas Gerais. In connection with this it must be emphasized that in chronic cases, the anamnesis in the majority of instances does not reveal any information in reference to a possible previous infection. It should be mentioned that in Bambuí there is a centre for study of this disease, in which are working

specialists who would be most unlikely to overlook these acute cases of suspected symptomatology.

Up to the present time the most rapid method for the diagnosis of acute cases, are based on the demonstration of parasite in the blood, by the examination of fresh specimens on by using thin and thick films.

Upon the value of these tests we permit ourselves to transcribe Talice's unbiased opinion : (5) «*El frotis como el exame en fresco — solo puede permittir hallar tripanosomas después de un tiempo prudencial, en los enfermos que los presentan en abundancia en la circulación*» (Blood smears as well as the examination of fresh blood can only detect trypanosomes after a reasonable time in patients who display them abundantly in their circulation). Referring to the fresh blood examination, he states : «*No puede tampoco servir como metodo sistematico em encuestas epidemiologicas, aún realizadas por especialistas, pues exige tambien un tiempo demasiado largo para tales circunstancias*». (neither can it serve as a systematic method in epidemiologic surveys, even if carried out by specialists, since under the circumstances it demands too long a period of time). And concerning the thick films, considered by him as one of the best methods he mentions : «*El exame de la gota «espessa» exige como dijimos, tiempo y paciencia. Es un examen a menudo fatigoso*». (the examination of the «thick films» requires, as we have said, both time and patience. It is often as exhausting examination).

All other processes for demonstrating the existence of parasites, such as culture, inoculation, xeno-diagnosis, always produce delayed results.

Precipitin reaction has the following advantages over them :

1. Exceedingly simple reaction technique.
2. Long lasting and stable precipitinogen, once it is kept free from contamination.
3. Quantity of serum needed for the reaction : 0,2 cm³, being 0,1 cm³, for the reaction tube and 0,1 cm³ for the control tube.
4. Immediate results, since the greater part of sera from acute cases react within one to two minutes.
5. It is absolutely specific, because although the precipitinogen of *S. cruzi* reacts in the presence of immune sera prepared in rabbit with samples of various species of *leishmaniasis*, as demonstrated by us in a previous work (2), this fact does not occur in the presence of sera from individuals bearing «tegumentary leishmaniasis» and «visceral American leishmaniasis», owing to their low concentration of anti-bodies.

6. It can constitute an index of the degree of humoral immunity, since it generally occurs when the agglutinating power of the serum reach titers above 1/500.

7. As the humoral immunity is nearly always connected with the greater or smaller activity of the parasite in the organism, it may also represent an index of this activity, as is the case in the acute and sub-acute forms of the disease.

8. It is very useful in epidemiologic surveys to show up active cases.

For diagnosing chronic cases, its value is greatly impaired, as we had occasion to point out in 211 instances of this form of the disease, when only 18% produced positive precipitin reactions. It cannot, therefore, substitute the complement fixation reaction in this particular point.

By utilizing the technique of particle agglutination and by adsorbing the precipitinogen to particles of colloid or carmine, we have succeeded in obtaining encouraging results in the diagnoses of these cases.

We are carrying on with these studies.

BIBLIOGRAFIA

- 1) MUNIZ, J. e FREITAS, G. — 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. do Inst. Oswaldo Cruz, 1944, 41 (2) :303-333.
- 2) MUNIZ, J. e FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da «Doença de Chagas» pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polisacarídeos de «Schizotrypanum cruzi» e de outros Tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os «Tests» de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. Brasil. Biologia, 1944, 4 (4) :421-438, Dezembro.
- 3) MUNIZ, J. e FREITAS, G. — Estudos sobre a imunidade humoral na «Doença de Chagas». Brasil Médico, 1946, Vol. LX :337-341. nº 42 e 43.
- 4) ROBINSON, L. B. e WICHELHAUSEN, R. H. — The problem of identification of oral spirochetes and description of a precipitin test for their serological differentiation. Bul. Johns Hopkins Hospital, 1946. Vol. LXXIX :436-450, n. 6, December.
- 5) TALICE, R. — Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana) Montevideo : 1940.