

# As pesquisas de laboratorio no diagnostico da Molestia de Chagas

pelos

**Drs. EURICO VILLELA e CHAGAS BICALHO**

Assistente do Instituto Oswaldo Cruz.

Medico do Hosp. O. Cruz

(Com as estampas 3—8)

O diagnostico clinico da molestia de CHAGAS encontra nas pesquisas de laboratorio applicadas assim ás fórmulas agudas como ás chronicas, não só um poderoso auxiliar, mas principalmente uma contraprova decisiva. O exame directo do sangue, a sua inoculação em animaes sensiveis, o xenodiagnostico, a reacção de fixação do complemento, prestam os mais relevantes serviços, embora o valor relativo de cada um destes processos seja differente e variavel, segundo a fórmula clinica em que é applicado e conforme se considere a sua importancia pratica, ou doutrinaria.

O exame histopathologico, quer mostre a existencia de agglomerados parasitarios no interior dos tecidos, quer consigne a existencia das lesões caracteristicas do myocardio, só pode prestar serviços ao diagnostico *post-mortem*, uma vez que a difficuldade na execução de

biopsias systematicas dos musculos, e os resultados aleatorios que tal pesquisa poderia fornecer, tornam pouco pratica a sua applicação ao diagnostico *intra-vita*. Não trataremos, pois, desta parte.

## I) EXAME DIRECTO

Na fórmula aguda o exame directo do sangue entre lamina e laminula é o processo de escolha para o diagnostico da molestia de CHAGAS. Uma gotta de sangue, colhido pela picada da polpa digital, e assim examinada, deixa ver os trypanosomos que, por suas dimensões e movimentos vivos, são facilmente notados e reconhecidos. O augmento dado pelas obj. C, D, ou DD e ocular 2 de ZEISS, é o mais conveniente.

A preparação corada pelo LEISHMANN ou GIEMSA fixará os caracteres do parasito para identificação posterior e documentação.

Quando raros os parasitos, pode-se procurar enriquecer o preparado pelo artificio seguinte: Colher 20 c.c. de sangue por punção venosa em 2 c.c. de solução de citrato de sodio a 4 %; centrifugar por cinco minutos em fraca velocidade; retirar o plasma que sobrenada, despresando as hematias que se depositaram; centrifugar por 15 minutos em grande velocidade. Examinar o deposito como para exame directo.

Nas fórmias chronicas, o exame directo do sangue resulta negativo, não sendo meio de diagnostico utilizavel, mesmo com o methodo de concentração.

## II) INOCULAÇÃO.

A inoculação do sangue em animaes sensiveis servirá nas fórmias agudas, na maioria dos casos, para a identificação definitiva e estudo posterior do parasito, visto como o exame directo já forneceu a prova diagnostica irrefutavel. Nos casos de individuos que tiveram recentemente a fórmula aguda, ou suspeitos de tal, e nos quaes o trypanosomo não é encontrado ao exame directo, a inoculação de 10 c.c. de sangue em animal sensivel traz resultados decisivos. Convem, entretanto, fazer exames de sangue do animal repetidos e demorados, até um mez depois da inoculação, porque o aparecimento dos trypanosomos no sangue, se em geral se faz na segunda semana, pode ser retardado até aquelle prazo.

Como animaes reagentes podem ser empregados o cão e o gato jovens, o mico e a cobaia, sendo este um bom reagente pela constancia com que se infecta, pelo largo tempo que conserva no sangue o trypanosomo, e pela facilidade com que é obtido e mantido.

Nas fórmias chronicas a inoculação pode dar resultados preciosos e da maior significação doutrinaria, embora seja pouco pratico como processo rotineiro de diagnostico, pelo numero rela-

tivamente pequeno das inoculações positivas, pelo tempo de demora do resultado da reacção, e pelo trabalho que exigem os exames de sangue reiterados ou as pesquisas dos parasitos nos orgãos.

Inoculam-se dous ou mais animaes sensiveis (temos usado sempre cobaias) com 10 c.c. de sangue cada um e fazem-se exames de sangue repetidos e cuidadosos depois do 15º dia da inoculação. Em geral os trypanosomos apparecem em torno do 30º dia após a inoculação.

No caso de ser negativo o exame directo do sangue do animal, deve-se sacrificar-o após 1 e meio mezes e pesquisar os kystos parasitarios nos tecidos, de preferencia no myocardio. Esta pesquisa pode ser feita com a fixação pelo formol a 10 %, ou liquido de ZENKER; inclusão em parafina, e coloração pela hematoxylina-eosina.

Pode-se ainda usar para inoculação o sangue submettido a previo enriquecimento pelo processo usado para exame directo. Assim, em pequeno volume, podem-se inocular os parasitos provavelmente contidos em 30 ou 40 c.c. de sangue.

Em uma serie de inoculações feitas com o sangue de 19 doentes de fórmias chronicas (cardiaca, nervosa, hypothyreoidiana, dystrophica e indeterminada) obtivemos cinco resultados positivos, assim discriminados:

Reg. No. 54 (Timotheo). (\*) Fórmula cardiaca; reacção de fixação do complemento *positiva*.

Reg. No. 162 (Bemvindo). Fórmula cardiaca; reacção de fix. comp. *positiva*.

Reg. No. 161 (Geremias). Fórmula cardiaca; reacção de fix. comp. *positiva*:

Reg. No. 97 (José). Fórmula nervosa e hypothyreoidiana; desenvolvimento re-

---

(\*) Unico caso em que a inoculação foi feita com plasma enriquecido por centrifugação.

tardado; aphasia. Reacção de fix. do comp. *positiva*.

Reg. Nº. 106 (America). Fórma nervosa e hypothyreoidiana; infantilismo. Reacção de fix. do comp. *positiva*.

Estes resultados até agora fornecidos pelo exame directo do sangue dos cobayos dão uma percentagem provisoria de 26,3 de resultados positivos, a qual pode ser augmentada para mais, não só pelos exames em andamento e de novas inoculações, como pelas pesquisas ainda não feitas de kystos parasitarios nos tecidos.

Cumpre referir aqui aos trabalhos de BAYMA, que em varias inoculações obteve 2 casos positivos, trabalhando com sangue de doentes chronicos de Ribeirão Preto, S. Paulo, e um caso de TEJERA, da Venezuela, que obteve a infecção da cobaia com o sangue de uma doente cuja infecção datava provavelmente de mais de 10 annos.

Não ha que encarecer, nem precisa de ser exagerada, a importancia que esses factos têm na demonstração até á evidencia do diagnostico clinico, e na solidez com que cimentam a realidade do factor etiologico.

### III) XENODIAGNOSTICO

As experiencias de MAGARINOS TORRES sobre o xenodiagnostico na mol. de CHAGAS são muito interessantes.

Fazendo picar individuos de fórma chronica (cardiaca) da molestia, conseguiu elle infectar triatomas creados no laboratorio e alimentados em animaes novos, e demonstrar tambem por esta fórma a existencia de trypanosomos no sangue circulante.

Este facto, de grande valor para a epidemiologia, pois mostra que o homem pode ser um reservatorio permanente do parasito infectante, explica a alta percentagem de barbeiros infectados que se encontram nas cafúas onde não houve caso agudo recente, e tem, entre-

tanto, para a pratica do diagnostico, valor menor. Exige manobras complicadas e demoradas, como a creação dos barbeiros, fazel-os picar aos doentes, e esperar o desenvolvimento do parasito no tubo digestivo do insecto. Demais, as pesquisas recentes de MAYER, que provam a possibilidade da transmissão hereditaria da infecção nos triatomas, tiram muito do seu rigor.

### IV) FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

Os primeiros ensaios sobre a reacção de BORDET e GENGOU applicada ao diagnostico da molestia de CHAGAS foram feitos por A. MACHADO, em Lacsance, e publicados, em collaboração com C. GUERREIRO, no Brasil Medico de 15 de Junho de 1913, Nº. 23.

Nesse trabalho os AA. fixaram a orientação do modo de obter o antigeno, afastando os extractos alcoolicos e glyco-alcoolicos, o extracto aquoso de corpos de trypanosomos, e dando preferencia ao extracto aquoso de baço, rico em kystos de multiplicação do parasito. A technica seguida na preparação do antigeno, e que aconselham, foi a seguinte:

O baço de cães novos, muito infectados, é triturado e posto em maceração em trez partes de agua destillada phenicada a 1 % e na temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A mistura é depois filtrada, addicionada de outro tanto de solução salina a 1,7 % e novamente filtrada. O liquido obtido constitue o antigeno.

Os AA. deixam consignada a especificidade do antigeno de cães infectados e a ausencia de relação dos resultados da reacção com o antigeno que prepararam e os da reacção de WASSERMANN.

Embora praticassem a reacção com

o liquido cephalo racheano ou o sôro de mais de 80 doentes (1) da fôrma chronica e alguns da fôrma aguda, com resultados concludentes, não publicaram os auctores nota complementar com os pormenores sobre as condições dos doentes e os resultados das reacções respectivas.

Em fins de 1919 e principios de 1920, MARQUES DA CUNHA e um de nós (2), aproveitando alguns casos agudos e chronicos da molestia de CHAGAS que tinham sob observação, tentaram repetir a reacção de BORDET e GENGOU segundo as indicações de MACHADO e GUERREIRO. Surgiram, porém, difficuldades em obter baços que estivessem bastante parasitados. Como nos animaes infectados (no caso, cães jovens) é o coração a séde mais constante dos kystos parasitarios, foi elle utilizado na fabricação do antigeno, e usado comparativamente com o baço e o cerebro dos mesmos cães, coração de cobaia infectado e coração de cão normal. A technica de preparação do antigeno era mais ou menos a mesma para todos os órgãos, e muito proxima da indicada por MACHADO e GUERREIRO na preparação do seu antigeno aquoso.

O animal muito infectado é necropsiado logo depois da morte pelo processo da infecção ou pelo chloroformio. O órgão é retirado com cuidados de asepsia, libertado dos coagulos sanguineos, lavado rapidamente em agua physiologica, reduzido a pequenos fragmentos e triturado no gral, com ou sem auxilio de areia lavada e esterilizada. A polpa assim obtida é posta a macerar na geleira em duas a tres partes de agua physiologica ou agua destillada phenicadas a 0,5%. Depois de tres a quatro

dias de maceração é filtrada em papel de filtro e exgottada por outro tanto de solução salina a 1,6 %, ou solução physiologica, phenicadas a 0,5 %.

O filtrado constitue o antigeno, que dosado em relação ao poder impediante, era empregado na dose de metade do maximo não impediante. A technica usada no seguimento da reacção foi a classica de WASSERMANN.

Foram utilizados na fabricação do antigeno o extracto aquoso de coração de 11 cães e de 6 cobaias, de 6 baços e de 1 encephalo de cães jovens infectados, e extracto aquoso de coração de cão normal.

Os sôros ensaiados foram de:

1—Honorina: Menina de 8 annos. Caso observado no periodo agudo, com trypanosomos no sangue, que um mez antes da reacção não mais eram encontrados.

2—Pedro: Menino de 2 annos, com trypanosomos no sangue alguns dias antes da reacção.

3—Anna: 9 mezes. Fôrma aguda com trypanosomos no sangue alguns dias antes da reacção.

4—Francisco: Fôrma chronica (cardiaca), pae de Anna.

5—Mariano: Fôrma chronica (cardiaca), pae de Pedro.

6—Maria: Fôrma chronica (nervosa), mãe de Geralda, fôrma aguda em observação.

7—João: 4 annos. Fôrma nervosa, filho de Maria.

8—Carmina: Schistosomose.

9—X (Doente do Dr. A. LEÃO). Leishmaniose.

10—A (Doente do Dr. E. VILLELA). Bocio esporadico e ulcera fuso-espirillar.

11—B (Doente do Dr. E. VILLELA). Impaludismo, terçã mixta; sangue retirado logo depois de um accesso.

12, 13 e 14—Sôros W. positivo do serviço de WASSERMANN do Instituto O. CRUZ.

(1) Communicação pessoal.

(2) E. Villela. Trabalho inedito.

15, 16, 17 e 18—Sôros W. negativo, idem.

O sôro da doente Honorina servia de indice do valor do antigeno. Foram usados cinco antigenos differentes formados com extracto aquoso de 1 só coração; misturando dous ou mais corações; um mixto de baço do mesmo cão que fornecera um dos antigenos de coração; um de extracto de encephalo; um mixto de coração de 2 cães normaes; e um mixto de coração de cobaias.

O resultado geral feito com os cinco antigenos de coração de cães infectados foi o seguinte:

Honorina—positivo.

Francisco—positivo.

Maria—positivo.

Pedro—Uma vez fracamente positivo, outra negativo.

Anna—Uma vez fracamente positivo, outra negativo.

João—negativo.

Marianna—Sôro muito impediante.

X—negativo.

A—negativo.

B—negativo.

Carmina—negativo.

3 sôros W. positivo—negativos.

4 sôros W. negativo—negativos.

O antigeno mixto de baço e o de encephalo, embora de cães cujos corações forneceram bons antigenos, não revelaram poder fixador bom, bem assim o de coração de cão normal. O de coração de cobaia infectada tinha poder fixador muito fraco.

Os resultados negativos obtidos com coração de cobaia e baço e cerebro dos cães explicam-se pela pequena infecção de que eram séde. Dos baços usados só um mostrou regular infecção. Dahi a utilidade de examinar previamente o orgão para verificar o seu grau de parasitismo, o que se consegue em poucos minutos fazendo um esfregaço simples, do baço, ou após dissociação

do coração, e corando pelo LEISHMAN. A ausencia ou a presença de abundantes fórmulas de LEISHMANIAS dará indicações sobre a utilização posterior do orgão.

A reacção foi feita tambem com o sôro do sangue de 3 cães, sendo 2 normaes e 1 infectado chronico. O resultado foi o seguinte.:

Cão normal No. 1—negativo.

Cão normal No. 2—positivo.

Cão infectado—impediante.

Outras tentativas fizeram-se com o sôro de cães, e ellas mostraram que frequentemente fica impedida a hemolyse, d'onde a sua difficil utilização nesse genero de pesquisas.

Ainda com um de nós, MARQUES DA CUNHA teve occasião de fazer nova serie de reacções empregando como antigeno o extracto aquoso de coração de cães infectados. A technica da preparação do antigeno foi semelhante: o coração era extrahido e misturado em tres vezes o seu volume de agua physiologica ou destillada, phenicada a 0,5%, deixando em maceração por trez dias, e após filtrando e exgottando com outro tanto de solução salina a 0,8% ou a 1,6%, tambem phenicadas a 0,5%, de modo a fornecer liquido isotonico. As qualidades do antigeno não são modificadas com maceração em agua destillada ou physiologica.

Os sôros utilizados foram dos seguintes doentes:

A. de Mattos, 12 annos F. indeterminada, com desenvolvimento retardado. Fôra observada 7 annos antes, por um de nós, em Lassance, com a fórmula aguda (1) Positivo.

Umbelina, f. cardiaca; bocio volumoso, dysthyreoidia. Positivo.

Guilherme, f. cardiaca. Positivo.

(1)—Nesta occasião fôra feita a reacção por A. Machado no periodo agudo e pouco depois d'elle, sendo os resultados respectivamente negativo e positivo.

Timotheo, f. cardiaca. Positivo.  
 Henrique, f. indeterminada. Positivo.  
 Cecilio, f. cardiaca. Positivo.  
 João Dias, f. cardiaca. Positivo.  
 Thomaz, f. cardiaca. Positivo.  
 Virgilio, f. cardiaca. Positivo.  
 Heliodora, f. indeterminada, bocio, distúrbios menstruaes. Negativo.  
 Geraldo, filho de Timotheo e Heliodora, 5 annos, f. indeterminada, bocio. Negativo.

Sôro W. positivo. Negativo.

Sôro W. negativo. Negativo.

Os doentes provinham todos de zonas proximas de Lassance. As testemunhas do valor do antigeno eram dadas pelo sôro de A. de Mattos, que servia de pedra de toque, e pelos sôros W. positivo e W. negativo, provenientes de doentes da Santa Casa e fornecidos pela secção de reacção de WASSERMANN do Instituto O. CRUZ.

As reacções feitas quer com o extracto por agua physiologica, quer por agua destillada, deram sempre resultados identicos e como foi acima registrado. Assim, o antigeno de animaes infectados (cães) mostrou-se capaz de fixar com regularidade o complemento em presença do sôro de doentes da mol. de CHAGAS, demonstrando stricta especificidade.

O antigeno, é, porém, muito labil. Em pouco tempo, mesmo em baixa temperatura, o seu poder fixador decahe, e cresce o poder impediente, o que o torna logo imprestavel.

Posteriormente A. LEÃO (1), a cujo cargo se achava a secção de WASSERMANN do Instituto, procedeu á reacção em outra serie de doentes.

A. LEÃO utilizou-se tambem do coração e do baço de animaes infectados (cães jovens) para obter o antigeno. Experimentou o extracto alcoolico, que

não julga utilizavel, e aconselha o extracto aquoso, cuja technica modificou assim: O orgão triturado é posto em 10 vezes o seu peso de agua destillada phenicada durante um mez, na temperatura ambiente; filtrado depois em algodão é o liquido addicionado do NaCl em proporção que o torne isotonico.

O antigeno assim preparado foi usado com bons resultados, não mostrando poder fixador nem em presença de sôro de individuos normaes, nem de syphiliticos. Como porém, torna-se rapidamente impediente, A. LEÃO recommenda a technica seguinte para se obter um antigeno estavel: seccar rapidamente o orgão, reduzi-lo a pó, e guardar em baixa temperatura. No momento de usar, macerar o pó na proporção de 1,0 gr. para 100 c.c. de agua physiologica phenicada a 0,5 %, triturar fortemente, e passar em fina camada de algodão. Obtem-se assim uma emulsão opalescente que é o antigeno.

Nas experiencias de A. LEÃO o antigeno de baço mostrou-se mais sensivel que o de coração e é aquelle que acha recommendavel.

A reacção foi feita com o sôro de 15 doentes da molestia de CHAGAS e um de filariose, sendo parallelamente feita a reacção de WASSERMANN; sôros W. positivo e W. negativo serviram de testemunho negativo para o antigeno.

Eis os resultados obtidos:

Reg. N. 116: f. cardiaca. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 104, f. cardiaca. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 94, f. indeterminada. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 93, achondroplasia. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 102, f. cardiaca. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 95, f. cardiaca. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

(1)—Trabalho inedito.

Reg. N. 96, f. indeterminada. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 109, f. indeterminada. WASSERMANN: negativo. Reacção: negativa.

Reg. N. 112, f. nervosa. WASSERMANN: negativo. Reacção: positiva.

Reg. N. 111, f. cardíaca, mãe do doente 112. W.: duvidoso. R.: positiva.

Reg. N. 106, f. nervosa e hypothyreoidiana, infantilismo. W.: positivo R.: negativa.

Reg. N. 107, f. hypothyreoidiana. W.: duvidoso. R.: negativa.

Reg. N. 122., f. cardíaca. W.: positivo. R.: positiva.

Reg. N. 118, f. cardíaca, hypothyreoidiana. W.: positivo. R.: positiva.

Reg. N. 103, f. cardíaca, W.: negativo. R.: positiva.

Reg. N. 126, filariose. W.: positivo. R.: negativa.

Sôros WASSERMANN positivo W.: negativo—Resultado negativo.

Tendo no momento sob nossa observação cerca de 40 doentes de molestia de CHAGAS com fórmulas clinicas variadas, e dispondo de uma raça de *Trypanosoma Cruzi* summamente virulenta, nada mais opportuno que se valer de tão propicia occasião para applicar nesses casos a reacção de BORDET e GENGOU e, se possível, firmar de vez a questão, o que parece termos conseguido, vindo os nossos resultados accrecer a importancia que esse meio de diagnostico deve ter na trypanosomiase americana.

Nos nossos ensaios procuramos modificar o modo de preparar o antígeno de fórmula a evitar os inconvenientes encontrados. Destes já assignalamos a labilidade notada por M. DA CUNHA e um de nós, e A. LEÃO; de outro lado, ora o coração se mostrou mais activo,

ora o baço; ás vezes o antígeno no momento da reacção se mostra de pouco valor. Procurando evitar esses tropeços, examinamos previamente o órgão para verificar o seu grau de parasitismo; fazemos o antígeno mixto de coração e baço, e juntamos glicerina ao liquido de maceração com o fim de melhor fazer a extracção e melhor conservar as propriedades do antígeno.

A technica foi a seguinte: O animal (cão joven) muito infectado é necropsiado logo depois da morte pela infecção, ou de sacrificado pelo chloroformio ou gaz de illuminação. O coração e o baço são retirados com cuidados de asepsia, libertados dos coagulos, lavados rapidamente em sôro physiologico; reduzidos a pequenos fragmentos e triturados no gral com, ou sem, auxilio de areia lavada e esterilizada. A uma parte de polpa assim obtida, junta-se a mistura seguinte:

Agua destillada 2 partes.

Glicerina pura 1 parte.

Phenol q. s. para que fique na mistura a 0,5 %, e deixa-se macerar por 48 horas na temperatura ambiente. No fim desse tempo a mistura é passada em gaze, e deixada repousar no frigo algum tempo. Forma-se um sedimento, e o liquido que sobrenada é colhido para servir de antígeno.

Dosado o poder anti-complementar, será utilizado na metade da dose maxima não impiedente e na metade da dose minima impiedente.

Esse antígeno deu optimos resultados, o que nos leva a aconselhar o seu uso na pratica commum. A dosagem do poder impiedente é operação absolutamente indispensavel, e sem ella ficarão despidos de qualquer valor todos os resultados. Essa dosagem se fará com solução de antígeno a 1:10 e 1:100, e de accordo com o quadro abaixo.

Tubos	Antigeno a 1:10 ou a 1:100	Complem. dosado	Agua phy- siologica		Systema he- molytico.	
1	1 cc	1 cc	—	Estufa a 38°C duran- te uma hora e meia.	1 cc	Estufa a 38°C. Leitu- ra do resul- tado 2 hs. depois.
2	0,9	1 —	0,1 cc		1 —	
3	0,8	1 —	0,2 —		1 —	
4	0,7	1 —	0,3 —		1 —	
5	0,6	1 —	0,4 —		1 —	
6	0,5	1 —	0,5 —		1 —	
7	0,4	1 —	0,6 —		1 —	
8	0,3	1 —	0,7 —		1 —	
9	0,2	1 —	0,8 —		1 —	
10	0,1	1 —	0,9 —		1 —	
11	—	1 —	1,0 —		1 —	
12	—	—	2,0 —		1 —	

A importancia dessa operação não se refere sómente ao poder impediante, e é tambem justificada por esse facto que, quando se empregam quantidades muito diminutas de antigeno, fica reduzido o poder fixador. Assim é que, v. g., o nosso antigeno numero 1 deu hemolyse parcial com 0,4 da solução a 1:10, total com 0,1. Nas reacções empregamos, portanto, a solução a 1:100 nas doses de 0,7 e 0,5, sendo de notar que com 0,2 o poder antigenico já não era bastante intenso, Ha, pois, uma dose optima, que deve ser pesquisada. Sendo o antigeno o elemento mais importante da reacção, d'elle dependerão os resultados.

Os anticorpos foram fornecidos pelo sôro do sangue do doente, obtido por punção venosa, inactivado pelo aque-

cimento a 56° c. durante meia hora antes do emprego, ou pelo liquido cephalo racheano obtido por punção lombar e usado sem previa inactivação. Quando o sôro a examinar continha anticorpos impediates repetiamos mais tarde a reacção deixando-o antes 24 horas em contacto com uma suspensão de sulfato de baryo a 1 % em agua physiologica, na dose de 0,4 para um c.c. de sôro. As hemolysinas naturaes podem ser eliminadas collocando em contacto uma gotta de sangue de carneiro com o sôro que as contiver, deixando dez minutos na estufa a 37° C. centrifugando e decantando.

Para complemento foi usado o sôro fresco de cobaias, diluido ao decimo e assim dosado:

Tubos	Complemento	Soro physiologico	Systema hemolytico
1	1 cc	1 cc	1 cc
2	0,9	1,1	1 —
3	0,8	1,2	1 —
4	0,7	1,3	1 —
5	0,6	1,4	1 —
6	0,5	1,5	1 —
7	0,4	1,6	1 —
8	0,3	1,7	1 —
9	0,2	1,8	1 —
10	0,1	1,9	1 —
11	—	2,0	1 —



O resultado é lido após permanencia de 30 minutos na estufa a 38°C. Se, v. g., ha hemolyse completa no tubo 7, parcial no 8, aproveitamos a diluição do tubo 6, isto é, 0,5 da solução ao decimo; como na reacção o complemento entra com 1 c.c. devemos diluir-o proporcionalmente de accôrdo com o resultado fornecido pela dosagem. No exemplo citado, a solução a 1:10 será diluida em parte igual de sôro physiologico, de tal modo que seriam aproveitados 0,05 de complemento puro.

Nem todos dão á dosagem do complemento o valor que ella merece, por julgarem sufficientes a dosagem de um dos elementos do systema hemolytico: o sôro hemolytico. E' outra a nossa opinião. Ha sôros contendo pequena quantidade de anticorpos immunizantes, e em que estes se associando ao antigeno só conseguem fixar uma parte do complemento, de tal modo que no tubo de reacção ha ainda uma hemolyse parcial provocada pelo complemento restante. Ora, com o emprego de 1 c.c. da solução ao decimo, isso pode se dar com mais facilidade ainda e em maior

proporção, de modo que um sôro na verdade fracamente positivo, se tornará evidentemente negativo.

Na reacção, ao envez de empregarmos o sangue de carneiro e sôro hemolytico separadamente, demos sempre preferencia ao emprego de globulos sensibilizados previamente.

Assim, dosado o sôro hemolytico segundo a technica usual e feita a diluição de modo a ser empregada dose dupla da minima productora de hemolyse total no volume de 3 c.c. da dosagem, de cada 100 c.c. da diluição eram retirados 5 e substituidos por igual volume de sangue de carneiro desfibrinado e lavado trez ou quatro vezes em sôro physiologico esterilizado.

Esse systema hemolytico será usado em todos os tubos de reacção, ou de testemunhas, a menos que estas só exijam hematias a 5 %. Em relação a elle, e sempre na mesma dose de um c.c. serão dosados o antigeno e o complemento.

Preparado todo o material, será procedida á reacção propriamente, obedecendo ao seguinte quadro:

Tubos	Soro a examinar	Antigeno a 1:100 (1)	Comp. dosado	Solução physiol.		Systema hemolytico
1	0,2	0,7	1 cc	0,1	Estufa a 38°C durante uma e meia hora.	1 cc
2	0,2	0,5	1 —	0,3		1 —
3	0,1	0,7	1 —	0,2		1 —
4	0,1	0,5	1 —	0,4		1 —
5	0,4	—	1 —	0,6		1 —
6	0,4	—	1 —	0,6		Sangue a 5 %—1cc
7	—	1,0	1 —	—		Syst. hem. 1cc.
8	—	—	1 —	1,0		« « 1cc.

(1) Está visto que a diluição e a dose variam com cada antigeno.

Procedendo, ao mesmo tempo, á reacção com varios sôros, como é de boa technica, as testemunhas 7 e 8 da primeira, servirão a todas as outras.

Trabalhando com liquido cephalo racheano e sabendo que elle contem menos anticorpos que o sangue, é bom empregar-se maior dose, de 1,0 e 0,5 cc, como fizemos. A leitura dos resultados se fará depois de 2 hs de contacto, na estufa a 38°C.

O schema abaixo resume os nossos resultados:

N. do doente	Nome	Diagnostico clinico	Wassermann	Reacção
51	Umbelina	Mol. de CHAGAS, f. cardiaca	Negativo (1921)	Positivo
94	Moreira	« « « « «	Negativo (1922 e 23)	Positivo
160	Benedicto	« « « « «	Positivo	Positivo
140	Maria Monteiro	« « « « »	Negativo	Negativo
48	Heliodora	« « « « indeterminada. Bocio; disturbios menstruaes.	Negativo	Positivo
141	Conceição	Mol. de CHAGAS, f. cardiaca	Negativo	Positivo
143	Luiza	« « « « «	Negativo	Negativo
154	Antonio	« « « « «	Positivo	Positivo
155	Bispo	« « « « «	Negativo	Positivo
158	Virgilio	« « « « «	Positivo	Positivo
149	Virginia	« « « « «	Negativo	Positivo
156	Araujo, pae de Donatilia, f. nervosa.	« « « « «	Positivo	Positivo
153	Dionisio	« « « « «	Negativo	Positivo
161	Geremias	« « « « «	Negativo	Positivo
162	Bemvindo	« « « « «	Negativo	Positivo
163	Tiburcio	« « « « «	Negativo	Positivo
159	José Soares	« « « « «	Positivo	Positivo
166	Manoel A. Costa	« « « « «	Negativo	Positivo
139	Ant. <sup>a</sup> Menezes	« « « « indeterminada, desenvolvimento retardado, amenorrhéa.	Positivo	Positivo
107	« Pereira	Mol. de CHAGAS, f. hypothyreoidiana.	Negativo	Positivo
167	Argemiro	Mol. de CHAGAS, f. nervosa.	Negativo	Positivo
112	Olympio	« « « « «	Positivo em 923 e negat. em 922	Positivo
97	José	« « « « «	Negativo	Positivo
106	America	« « « « « e hypothyreoidiana; infantilismo.	Positivo	Positivo
114	Theodora	Mol. de CHAGAS, f. nervosa e hypothyreoidiana.	Negativo	Positivo
123	Avelina	Mol. de CHAGAS, f. nervosa	—	Positivo
113	Joanna	« « « « «, hypothyreoidismo.	Negativo	Positivo
124	Josepha	Mol. de CHAGAS, f. nervosa e hypothyreoidiana.	Positivo	Positivo
93	Amador	Achondroplasia.	Negativo	Positivo
49	Geraldo Carvalho	Mol. de CHAGAS, f. residuaria	—	Positivo
138	Geralda Lopes	« « « « «	Negativo	Positivo
148	Geraldo Santos	« « « « «	Negativo	Positivo
146	Gilda	« « « « «	Negativo	Positivo

**Liquido cephalo racheano:**

N. do doente	Nome	Diagnostico clinico	Wassermann	Reacção
107	Ant. <sup>a</sup> Pereira	Vide acima.	Negativo	Negativo
137	Marcolina	Mol. de CHAGAS, f. cardiaca.	Positivo	Positivo
97	José	Vide acima.	Positivo	Positivo
118	Candida	Mol. de CHAGAS, f. nervosa.	—	Negativo
139	Ant. <sup>a</sup> Menezes	Vide acima.	Negativo	Positivo
167	Argemiro	« «	Negativo	Positivo

**Testemunhas:**

Reg. 168 (Sôro)—Bouba—W. negativo. Reacção negativa.

Reg. 168 (liq. ceph. rach.)—Bouba—W. negativo. R. negativa.

Reg. 169 (Sôro)—Pleuriz com derrame. Albuminuria—W. e R. negativos.

M. N. Urethrite, cystite, prostatite gonococcicas—W. e R. negativos.

Reg. 76 externo—Abcesso quente do pé—R. negativa.

Reg. 122 externo—Myxedema—W. e R. negativos.

Reg. 118 externo—Paludismo—W. e R. negativos.

Reg. 83 externo—Ulceras da perna. W. e R. negativos.

Reg. 79 externo—Abcesso do pé—W. e R. negativos.

Reg. 111 externo—Gastropathia. R. negativa.

A. F.—Meningite tuberculosa—R. negativa.

Em tres sôros sanguineos provenientes de doentes trypanosomados e correspondentes aos registros do Hospital O. CRUZ 137, 152 e 118, foi duvidosa a reacção devido aos anticorpos impedientes, que nem pelo contacto com sulfato de baryo desapareceram.

Procedemos tambem á reacção usando sôro de animaes infectados experimentalmente, cujos resultados são interessantes.:

1—Macaco (*Pseudocebus apella*) inoculado e reinoculado ha mais de seis mezes com *Tryp. Cruzi*, sem que nunca

apparecesse no sangue o parasito. Resultado: positivo.

2—Macaco da mesma especie, não inoculado. Resultado: negativo.

3—Mico (*Callithrix jacchus*) inoculado recentemente com *Tryp. Cruzi* e contendo numerosos parasitas no sangue. Resultado: negativo.

4—Mico da mesma especie, novo. Resultado: negativo.

5—Mico da mesma especie, novo. Resultado negativo.

6—Cão inoculado com *Tryp. Cruzi* ha 8 mezes. Teve tryp. no sangue e paresia dos membros posteriores, de que se curou. Resultado positivo.

7—Cão inoculado com *Tryp. Cruzi* alguns mezes antes. Resultado negativo.

8—Cão normal. Resultado negativo.

9—Cão normal. Contem o sôro hemolysinas naturaes.

10 a 18—Nove cães inoculados em datas diversas. Todos com forte poder impediente.

Com a mesma technica preparamos antígeno mixto de coração e baço de cão normal, e o empregamos com resultado analogo ao de outros pesquisadores: esse antígeno não revelou poder fixador em presença do sôro de doentes da molestia de CHAGAS.

Em 33 reacções feitas com o sôro de doentes da molestia de CHAGAS e 6 com o liquido cephalo racheano, apenas 3 no primeiro caso e 2 no segundo deram resultado negativo. Convem assig-nalar que os doentes n.º 54, 97, 106,

116 e 162 tinham trypanosomos no sangue, demonstrados pela inoculação em cobaias.

As reacções feitas com 11 individuos normaes ou com outras doenças deram sempre resultado negativo, e a reacção de WASSERMANN, feita parallelamente mostra que nenhuma relação de dependencia ha entre ellas. As reacções negativas feitas com antigeno de cão normal completam a demonstração da especificidade da reacção.

Interessantes são os resultados das reacções em animaes. O macaco de infecção chronica forneceu reacção positiva, o mico no periodo de infecção aguda, negativa: tal qual na infecção natural do homem.

Ainda uma vez o cão mostrou ser pouco adequado a esse genero de pesquisas. A frequencia de sôros impedi- entes, com o systema hemolytico usado, é um tropeço grande, e no pequeno numero de reacções aproveitaveis, o resultado não foi concludente.

O antigeno conservou-se bem durante quatro mezes (de tanto data o nosso antigeno n.º 1) e mostrou sempre o mesmo poder fixador, que era grande, correspondendo ao que esperavamos quando modificamos o processo de preparação. E' muito interessante notar aqui que o nosso antigeno se portou de modo inverso ao que tem sido observado por outros pesquisadores em relação aos antigenos que descrevem: com o tempo diminue muito o poder impediante, sem que essa mudança atinja o poder antigenico.

Considerados em seu conjuncto as reacções que citamos feitas com sôro e liquido cephalo racheano de 67 doentes de molestia de CHAGAS de fórmula aguda e fórmulas chronicas de typos diversos, impressiona logo o pequeno numero de resultados negativos. Nas series de MARQUES DA CUNHA e um de nós temos negativa a reacção de:

João—fórma nervosa, provavelmente congenita.

Heliadora—fórma indeterminada; bo- cio.

Geraldo—fórma indeterminada; bo- cio.

Tres num total de 19. Inconstantes 2, as dos casos agudos em actividade.

Na serie de A. LEÃO: 2, num total de 15:

Reg. N.º 109, fórmula indeterminada.

Reg. N.º 107, fórmula hypothyreoi- diana.

Dos casos que serviram ás nossas pesquisas com sôro em 33 reacções tive- mos negativas 3:

Reg. N.º 107, f. thyreoidiana.

Reg. N.º 140, f. cardiaca.

Reg. N.º 143, f. cardiaca.

Nos 6 casos em que empregamos o liquido cephalo rachiano tivemos 2 ne- gativas:

Reg. N.º 107, f. hypothyreoidiana.

Reg. N.º 118, f. nervosa.

Dous casos que na serie de M. DA CUNHA deram resultados negativos, for- neceram com o nosso antigeno resultado positivo; o caso de A. LEÃO deu reacção identica, quer com o sôro, quer com o li- quido cephalo racheano.

Tomando o total, das reacções te- mos em 67 negativas 8, o que dá uma percentagem de 11,9. As observações fo- ram feitas, em sua grande maioria, nos casos de fórmula cardiaca e fórmula nervo- sa; convem que sejam multiplicadas em outras fórmulas chronicas. As reacções das fórmulas agudas confirmaram as primeiras pesquisas feitas por MACHADO: em- quanto dura o periodo agudo activo, ella é negativa ou inconstante; passado este, apparece fortemente positiva.

O numero de reacções no liquido cephalo racheano inda é pequeno para conclusões definitivas; em todo caso con- vem assignalar que na fórmula nervosa, em 4, tres foram positivas.

Nenhum dos experimentadores obte-

ve reacção positiva em doença outra que não na molestia de CHAGAS. Foram experimentados sôros de syphiliticos, de atacados de boubá, de leishmaniose, de impaludismo, de schistosomose, de filariose, etc., sempre com resultado negativo, bem como negativo o de affecções como o bocio e o myxedema esporadicos, de que temos um exemplo de cada.

Do exposto, julgamos poder formular as conclusões seguintes:

I)—A reacção de fixação do complemento é, dos methodos de laboratorio, o mais pratico e o mais sensível para o diagnostico das fórmás chronicas da molestia de CHAGAS.

II)— O antigeno preparado com extracto aquoso de baço e coração de animaes (cães jovens) infectados é estritamente especifico.

III)—O extracto aquoso glycerinado mixto de coração e baço parece ser o que maior numero de qualidades resume.

IV)—O valor do antigeno parece guardar relação directa com o gráo de parasitismo do orgão utilizado, pelo que é conveniente examinar previamente o orgão nesse sentido.

V)—O extracto aquoso de animaes (cães jovens) não infectados pelo *Tryp. Cruzi* não fornece antigeno de poder fixador.

VI)—Não ha correlação entre a reacção, tal como é feita na molestia de CHAGAS, e a reacção de WASSERMANN, cujos resultados são inteiramente independentes uns dos outros.

VII)—A estricção especificidade da reacção merece reservas em relação a outras trypanosomiasés, de um lado, e a antigenos preparados com outros trypanosomos, de outro.

#### V) OUTRAS PESQUISAS APPLICADAS Á MOLESTIA DE CHAGAS.

Já nos referimos ás pesquisas histopathologicas e ao pouco que se pode

esperar dellas no que concerne o diagnostico durante a vida.

A cuti-reacção e a intradermo-reacção foram tentadas por MARQUES DA CUNHA e um de nós, servindo do antigeno de coração como reagente, sem que fossem obtidos resultados apreciaveis. Tambem a sôro-precipitação deante do antigeno, bem como os ensaios em relação ao poder protector do sôro, não deram senão resultados negativos.

Repetimos com o antigeno aquoso glycerinado a intradermo-reacção em 16 doentes e os resultados confirmaram os dos ensaios anteriores.

Os exames hematologicos em relação ás modificações globulares não trazem indicações uteis ao diagnostico, e o exame do liquido cephalo racheano se não dá nenhum elemento positivo, tem, contudo, pelas suas indicações negativas, grande valor no diagnostico entre as fórmás nervosas de trypanosomiase e de syphilis.

Os exames de BURLE DE FIGUEIREDO (1) e os nossos, do liquido cephalo racheano, somente no sentido do diagnostico da syphilis, deram resultados concordantes.:

I) aspecto limpido e incolor.

II) tensão muitas vezes augmentada.

III) reacção de NONNE-APELT e de ROSS JONES, para pesquisa de globulinas, negativas.

IV) não ha augmento de leucocytos de nenhuma especie.

V) reacção de WASSERMANN negativa.

A verificação do trypanosomo no sangue circulante dos doentes de fórmula chronica da molestia de CHAGAS tem um grande interesse scientifico, e damos, por isso, para finalizar, ligeiras notas clinicas dos nossos cinco casos positivos.

Obs. 1—Timotheo Carvalho, 35 annos, casado, pardo, residente em Las-

(1) Pesquisas ineditas.

sance (Lavado). Caso de fôrma cardiaca, cuja descripção detalhada será feita em trabalho posterior. Em 11-1-923 foram inoculadas 2 cobaias cada uma com 10 c.c. de plasma sanguineo concentrado como atraz ficou dito. Um delles morreu dois dias depois, por causa outra. Os exames repetidos quasi diariamente do sangue de outra cobaia revelaram em 11-II-923 a presena do *Tryp. cruzi*.

Obs. 2—America, n.º de reg. 106, entrada para o Hospital OSWALDO CRUZ em 20-IX-922, brasileira de Contria (Minas), 26 annos.

Tem aspecto de uma creana de 10 a 12 annos. Não fornece informaoes e nem produz som articulado. Face symetrica, fronte pequena, lisa, sem rugas; nariz em sella. Bocio bastante desenvolvido, sendo o lobulo direito do tamanho de uma laranja, o medio um pouco menor e o esquerdo de cerca de tres cents. de diametro. Não ha pellos genitales, nem axillares. Thorax de desenvolvimento proporcional; glandulas mammarias muito pouco desenvolvidas.

Altura 115 cents; alt. do mento 96, alt. da furcula 92, do umbigo 64, do pubis 53, A. P. cephalico 17,7; transverso cephalico 14,7; arco naso-inion 1,5; diam. biauricular 11,0; bigonion 8,5. Peso 23 kls. 100.

Paniculo adiposo e musculatura pouco desenvolvidos. Pelle de c r parda, cicatrizes vaccinaes no brao direito. Plantas dos p s e das mãos humidas. Ganglios palpaveis sub-maxillares, cervicaes, epitrochleanos, inguinaes e cru-raes. Mucosas normaes.

Lingua com todos os movimentos; dentes bons, sendo que os dois caninos superiores se implantam para fóra da linha alveolar. Abobada palatina muito pouco concava.

Intelligencia rudimentar, parece não entender a m r parte do que se lhe diz; ordens são às vezes executadas, porém,

com difficuldade. Percebe alguma mimica; não parece haver perturbaao da affectividade; a memoria são difficilmente pode ser pesquisada.

Em duas cobaias inoculados com 10 c.c. de sangue, cada um, em 24-III-923, verificou-se a presena do *Tryp. Cruzi* em 20-IV. Reacao de WASSERMANN no sangue: positiva (fortemente); idem no liquido cephalo-rachideo: negativa.

Obs. 3—José M. S., reg. do Hosp. O. CRUZ n.º 97, 12 annos, brasileiro, residente em Muquem (Lassance, Minas), preto.

Desenvolvimento retardado; ausencia de pellos na face e no corpo. Face ligeiramente asymetrica, com desvio para a esquerda. Dentes bons, bem implantados. Bocio; hypertrophia dos tres lobulos da thyreoide: o medio como um ovo de gallinha, o esquerdo um pouco maior, e o direito como uma azeitona. Estado de nutriao soffrivel. Thorax bem conformado.

Quando em marcha, inclina para a frente o tronco, trazendo as pernas em semi-flexão sobre as coxas, e os p s se collocam no solo em equinismo, de tal modo que recahe o peso do corpo nas pontas, e os calcanhares mal se apoiam. Quando em estaao erecta tambem permanecem as pernas em ligeira flexão. Intelligencia rudimentar. Ouve regularmente, sem entender na maioria das vezes o que se diz. A sua resposta   quasi sempre o mesmo signal de cabea, como de affirmac o. Falta-lhe a palavra articulada.

Micropolyadenopathia, inclusive dos ganglios epitrochleanos, que se mostram do tamanho de um grão de ervilha. As plantas dos p s e das mãos humedecidas pelo suor.

R. de W. no liquido cephalo rachiano—negativa.

Obs. 4—Bemvindo S. M., reg. n.º 162, entrado em 11-II-923 e sahida em 5-III-923, com 43 annos, casado,

residente de Lassance. Tem sete irmãos, dos quaes 3 têm bocio. De 2 annos para cá sente fadiga «uma molleza», mal estar, preguiça, somnolencia.

Aspecto geral bom, bem conformado, soffrivelmente nutrido, bôa musculatura. Ganglios epitrochleanos, axillares e inguinaes augmentados. Ligeiro edema dos membros inferiores. Face symetrica. Tem na lingua uma cicatriz de chifrada de boi.

Thorax bem conformado. App. respiratorio normal.

Pulso: 75 batimentos em 1' (sentado). Extrasystoles frequentes. Coração: sopro mesosystolico audivel com maior intensidade no foco aortico. 2º bulha desdobrada. Augmento de volume do coração, revelado pela radioscopia e percussão.

Ventre flaccido; baço nem palpavel, nem perccutivel; figado com limite superior na 7ª costella e bordo inferior perceptivel no rebordo costal. Reflexos pupillares á luz, á distancia, e consensuaes, presentes. R. de W. no sangue: negativa. R. de fix. do compl. positiva. Duas cobaias inoculados com 10 c.c. de sangue em 26—II—923, mostraram a presença do tryp. em 24—III—923.

Obs. 5—Geremias M., entrada em 11—II—923 e sahida em 31 do mez seguinte, reg. nº. 161, 46 annos, brasileiro, residente em Lassance (Minas).

Diz ter tido rheumatismo desde ha 16 annos. Constantemente diarrhéas, colicas, gastralgia independente de alimentação, cephalalgia inconstante.

Individuo mal nutrido e pouco musculoso. Face magra e asymetrica, com

ligeiro desvio para a direita, da commisura labial, onde são mais accentuadas as rugas. Bocca com mucosa normal, maus dentes; incapacidade de assobiar pela falta de dentes. Não tem augmento da thyreoide. Thorax symetrico, sem anomalias. Ventre flaccido. Membros bem proporcionados. Ganglios inguinaes palpaveis.

Apparelho respiratorio normal.

Figado da 6ª costella ao rebordo costal.

Reflexos cutaneos, tendinosos, pupillares, normaes.

App. circulatorio: sente oppressão, palpitações espontaneas raras, sensação de arythmia. Ligeiro edema dos membros inferiores. Insomnia. Não ha abaulamento ou retracção do precordio. Pulso molle, com mediana amplitude, ligeiramente irregular; apresenta uma arythmia bathmotropica Tmx. 13,5 Tmn. 7 (tensiophono de Vacquez). Ponta no 5º espaço, a 2 cms. abaixo do mammiolo, na linha mammilar, a 10 cms. da linha media. Borda direita a 3 cms. para a direita da linha media; altura 7,8.

Primeira bulha na ponta abafada e arrastada; no fóco tricuspide, idem; segunda bulha desdobrada no foco aortico e pulmonar, menos abafada. A primeira bulha, arrastada, coincide com um sopro surdo mais audivel na ponta.

Reacção de WASSERMANN, no sangue, negativa. Reacção de fix. do complemento: positiva. Inoculação de 10 c.c. de sangue, em cobaias, em 26—II—923, deu resultado positivo em 21—IV—923 para *Tryp. cruzi*.

### Explicação das estampas.

Fig. 1 — Electrocardiogramma de Bemvindo, D II, T 1/50. Mol. de CHAGAS, fôrma cardíaca. Presença do *Tryp. cruzi* no sangue do cobayo inoculado com sangue. Reacção de fix. do comp. positiva.

Fig. 2 — Electrocardiogramma em D II, T 1/50. Mesmo doente da fig. 1.

Fig. 3 — Electrocardiogramma de Timotheo (D II, T 1/25), fôrma cardíaca de mol. de CHAGAS. Inoculação de sangue em cobaya positiva. Fix. do comp. positiva.

Fig. 4 — Electrocardiogramma em D II, de Geremias, caso de mol. de CHAGAS, f. cardíaca. Inoc. positiva. R. de fix. do comp. positiva.

Fig. 5 — Electrocardiogramma em D II, Geremias, mesmo doente de fig. 4.

Fig. 6 — Electrocardiogramma em D III, Geremias, mesmo doente da fig. 4.

Fig. 7 — Electrocardiogramma em D III, mesmo doente da fig. 4.

Fig. 8 — Reg. 97, José Mol. de CHAGAS. Verificação de trypanosomos no sangue circulante, por inoculação. R. de fix. do comp.: positiva.

Fig. 9 — Reg. 97, José. Grupo de membros da familia de José. Nesta phot. se vê melhor o bocio que na fig. 8.

Fig. 10 — Reg. 106, America. Caso de mol. de CHAGAS em que a inoc. em cobayas deu resultado positivo. R. de fix. do comp.: positiva.



### BIBLIOGRAPHIA.

- 1—MACHADO & GUERREIRO —Da reacção de BORDET e GENGOU na molestia de C. CHAGAS como elemento diagnostico. *Brasil Medico*, nº 23, de Junho 15, 1913.
  - 2—BAYMA, T. —Molestia de C. CHAGAS—*Ann. Paul. Med. Cir.*, 1914, vol. 4, nº 3, p. 57 e *Rev. Med. São Paulo*, 1914, anno 17, nº 1, p. 3.
  - 3—BRUMPT. —Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de CHAGAS. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 1914, t. 7, nº 10, p. 706.
  - 4—BRUMPT. —*Precis de Parasitologic.*
  - 5—MAYER, M. —Ueb. Vererbung von Schizotrypanum im Zwischenwirt. *Muench. Med. Wochenschr.* 1922, nº 40, p. 444.
  - 6—TEJERA, ENRIQUE G. —Primer caso de Trypanosomose americana en el Estado Miranda. *Gaz. Med. CARACAS*, 1919, vol. 26, nº 11, p. 113.
  - 7—TEJERA, ENRIQUE G. —La Trypanosomosis americana o enfermedad de CHAGAS en Venezuela (nota preliminar), *Gaz. Med. CARACAS*, 1910, v. 26, nº 10, p. 104.
  - 8—TEJERA, ENRIQUE G. —La Trypanosomose americaine ou Maladie de CHAGAS au Venezuela. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 1919, V. 12, Nº 8, p. 509.
  - 9—TORRES, M. —Mol. de C. CHAGAS, Transmissão do Tryp. Cruzei pela picada do *Triatoma Megista* (nota preliminar). *Brasil-Medico*, 1913, anno 27, nº 31, p. 361.
  - 10—TORRES, M. —Alguns factos que interessam á epidemiologia da mol. de CHAGAS. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 1915 t. 7, fac. 1, p. 120.
-

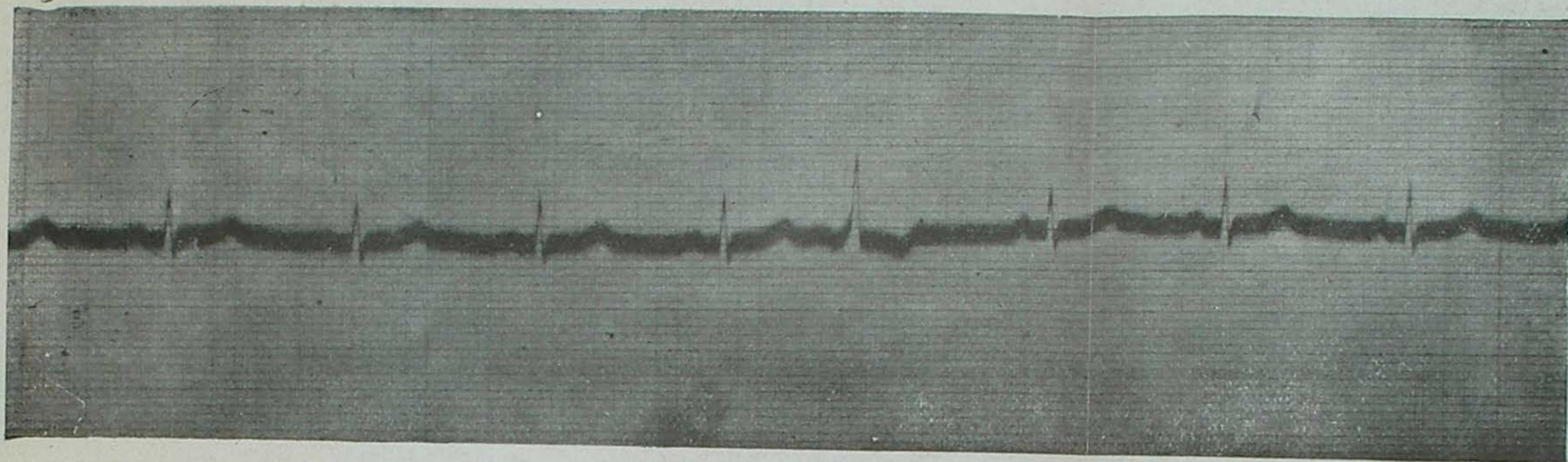


Fig. 1

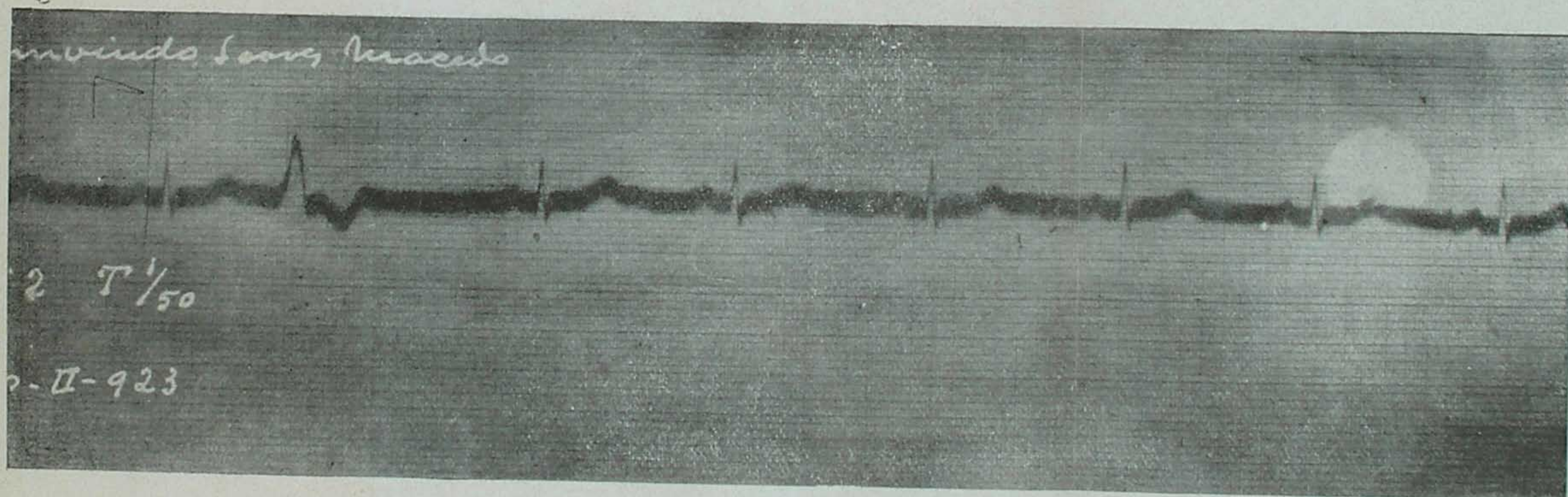


Fig. 2

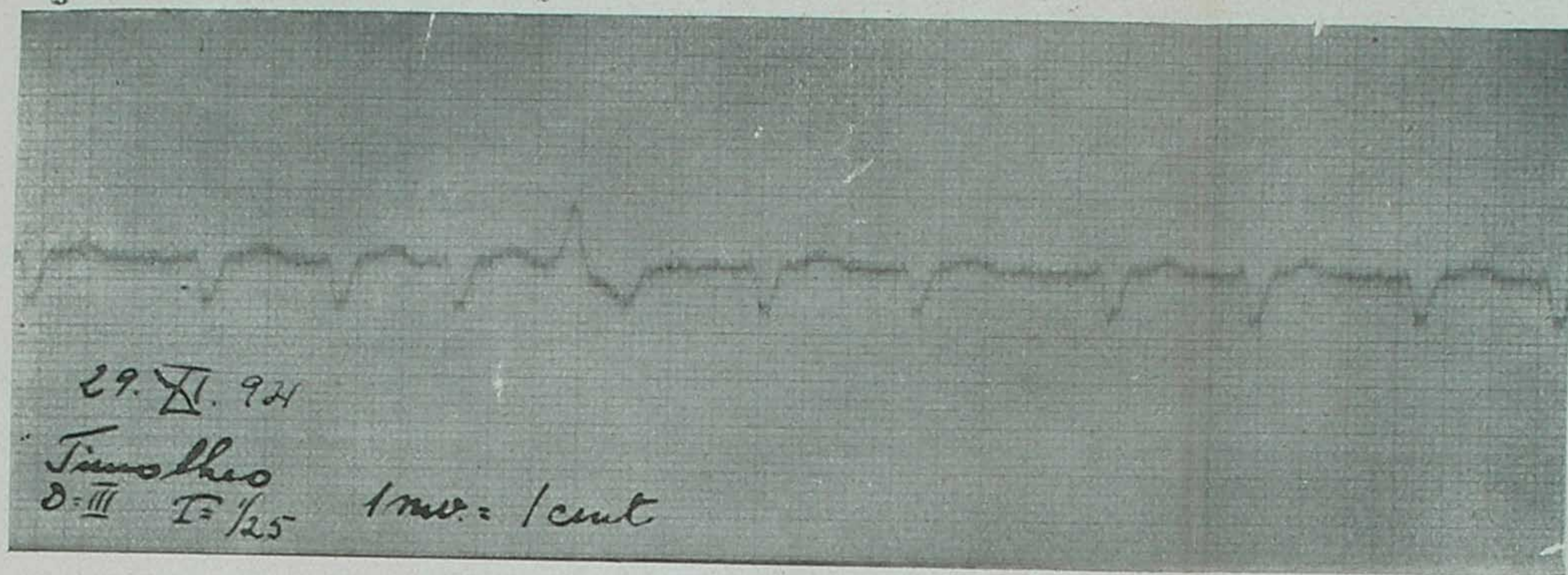


Fig. 3

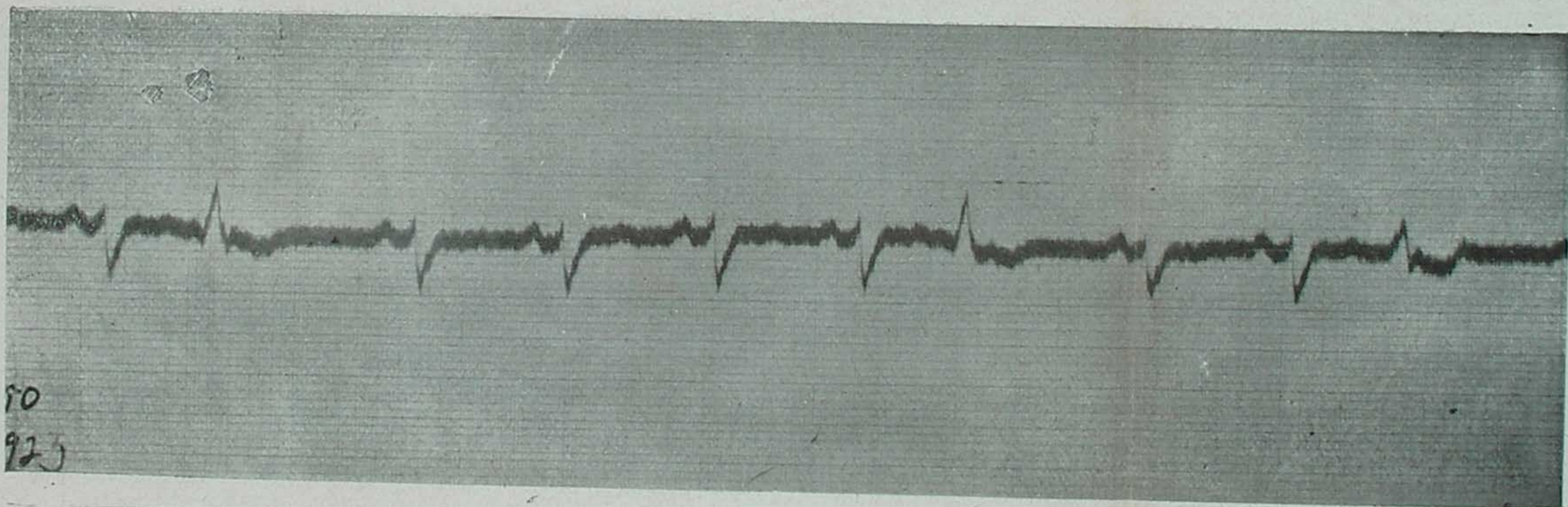


Fig. 4

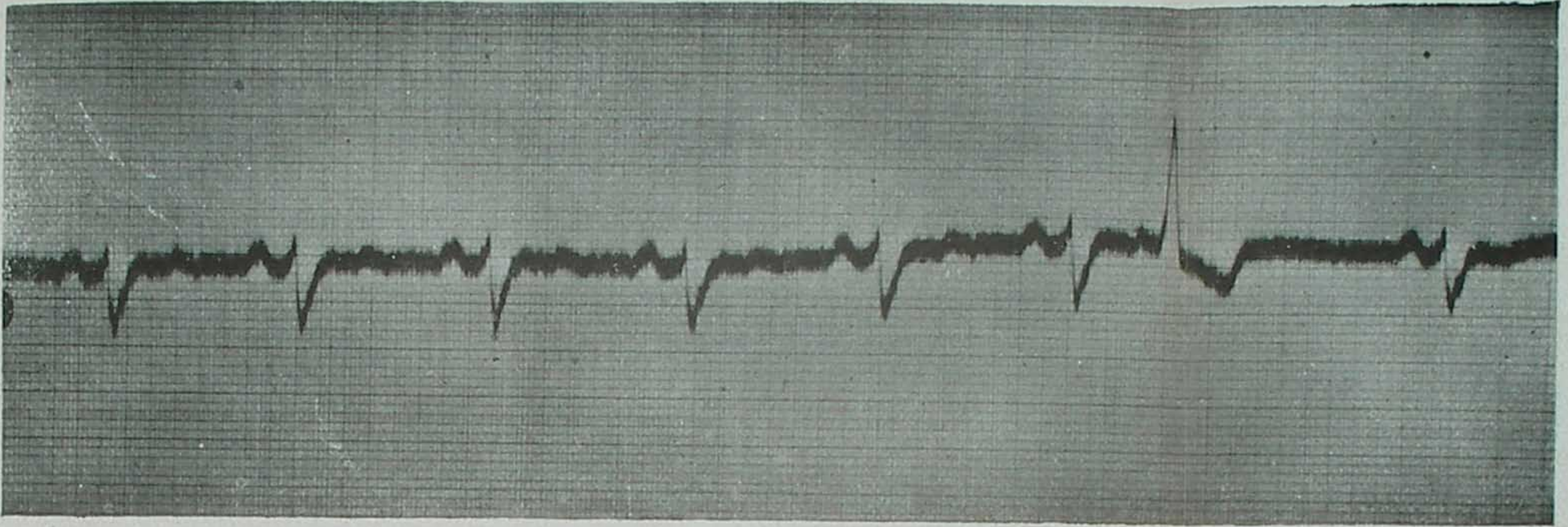


Fig. 5

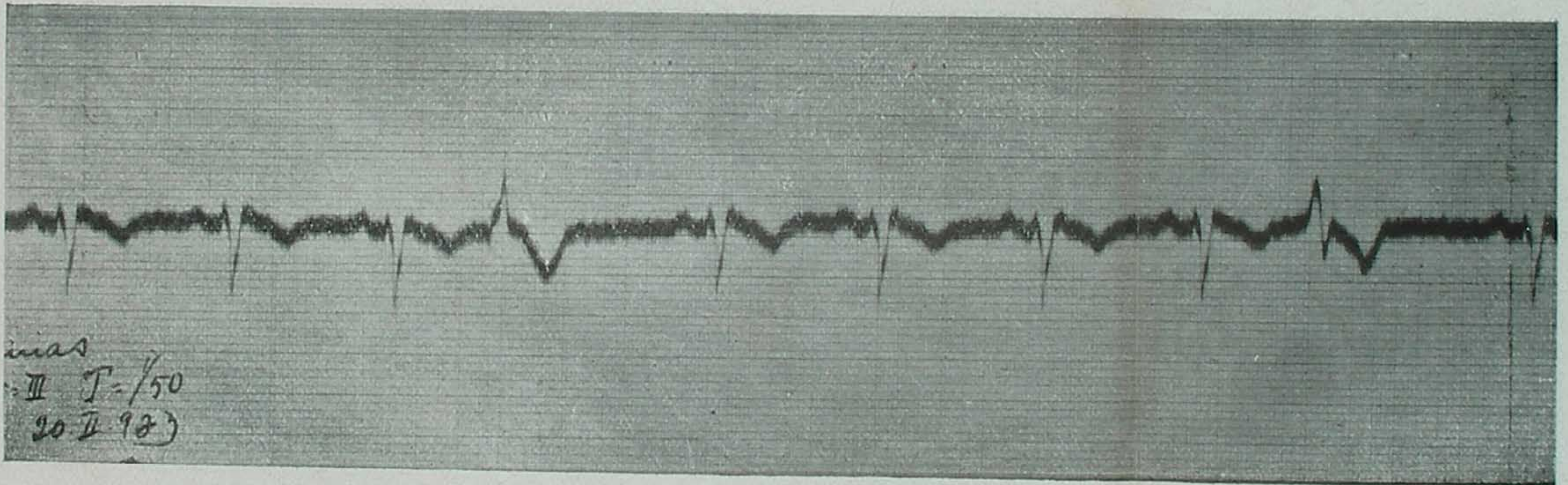


Fig. 6

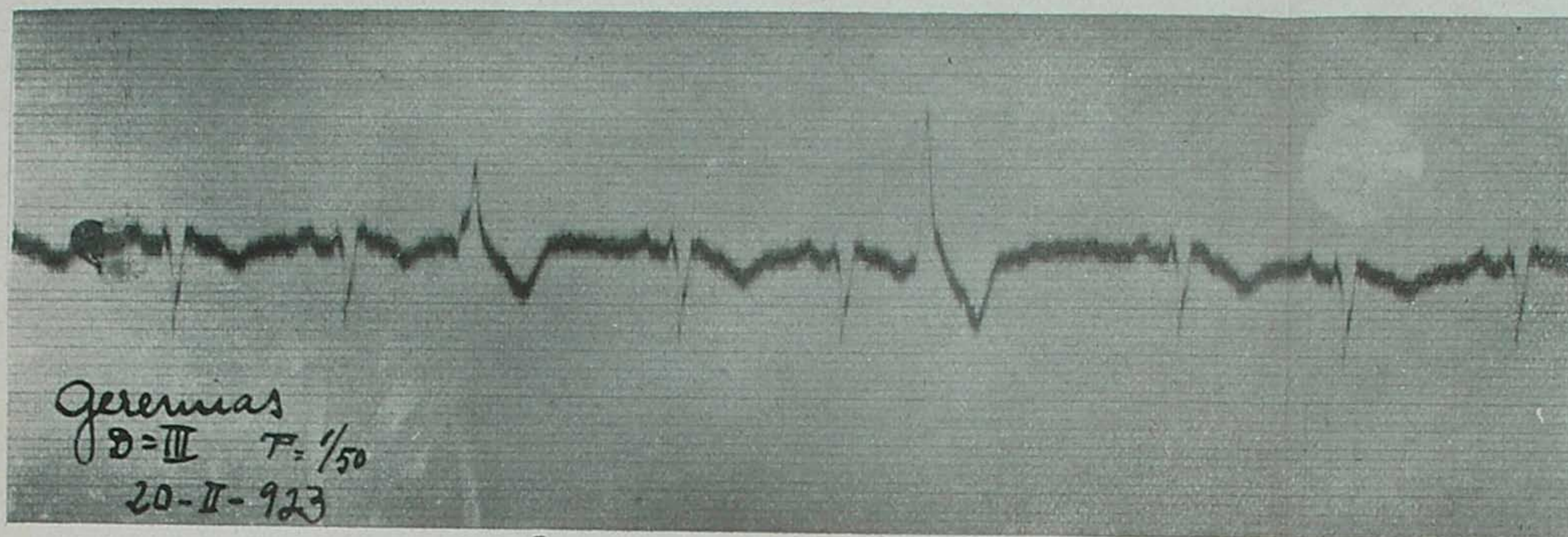


Fig. 7

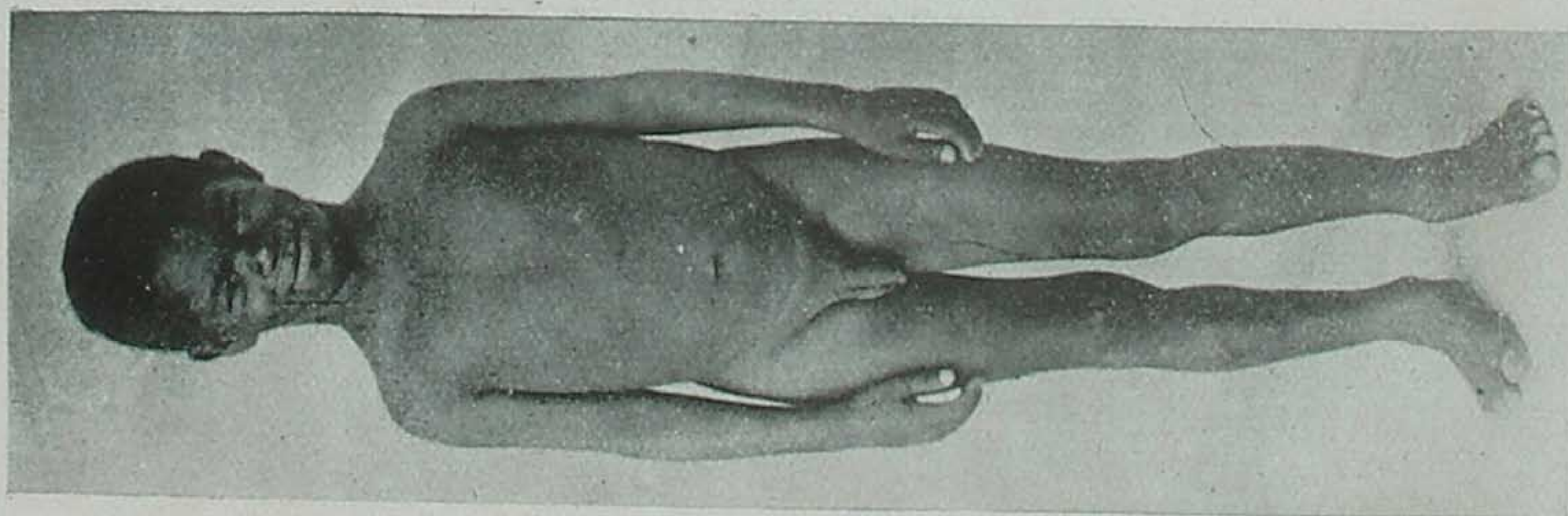


Fig. 8

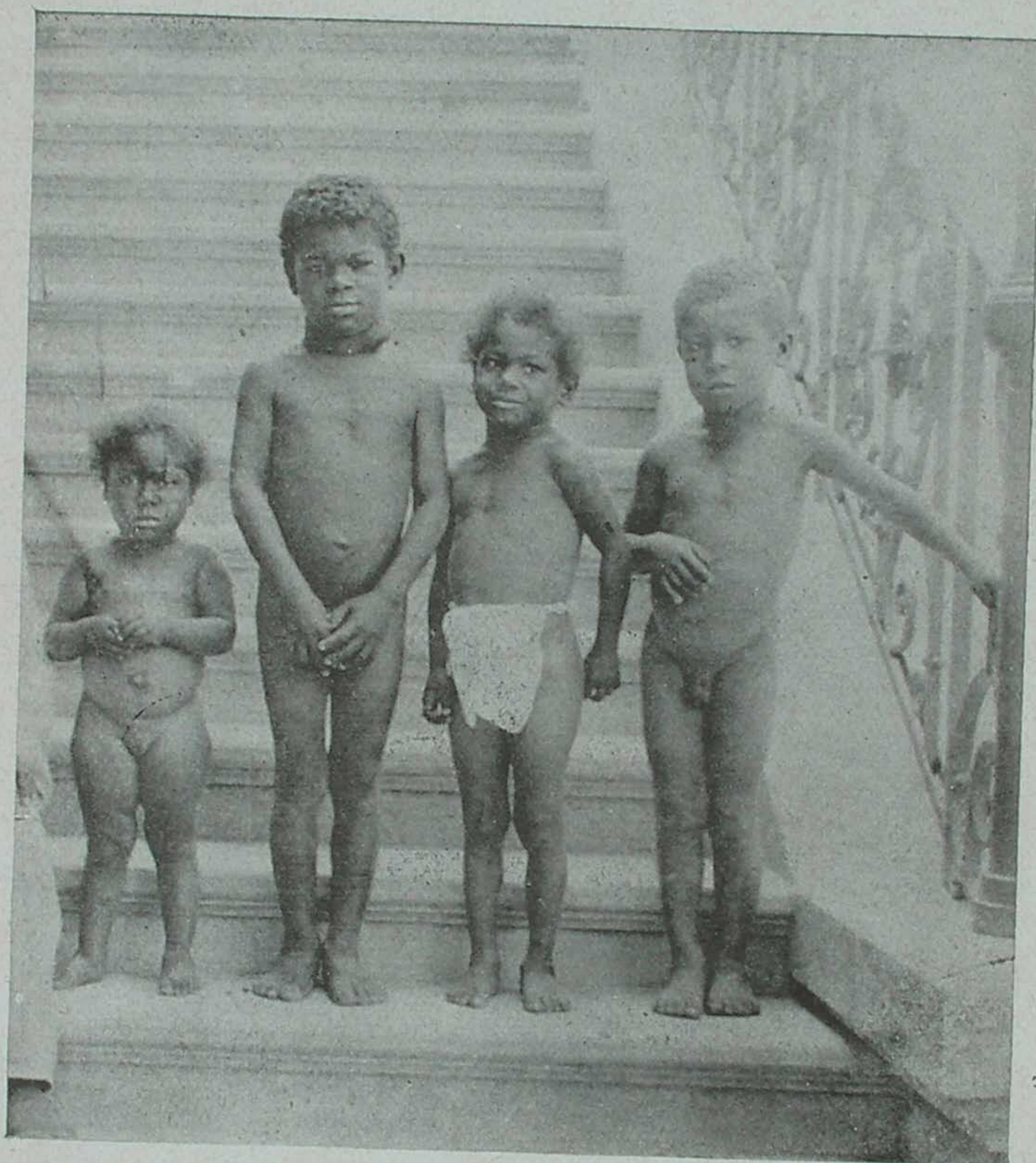


Fig. 9

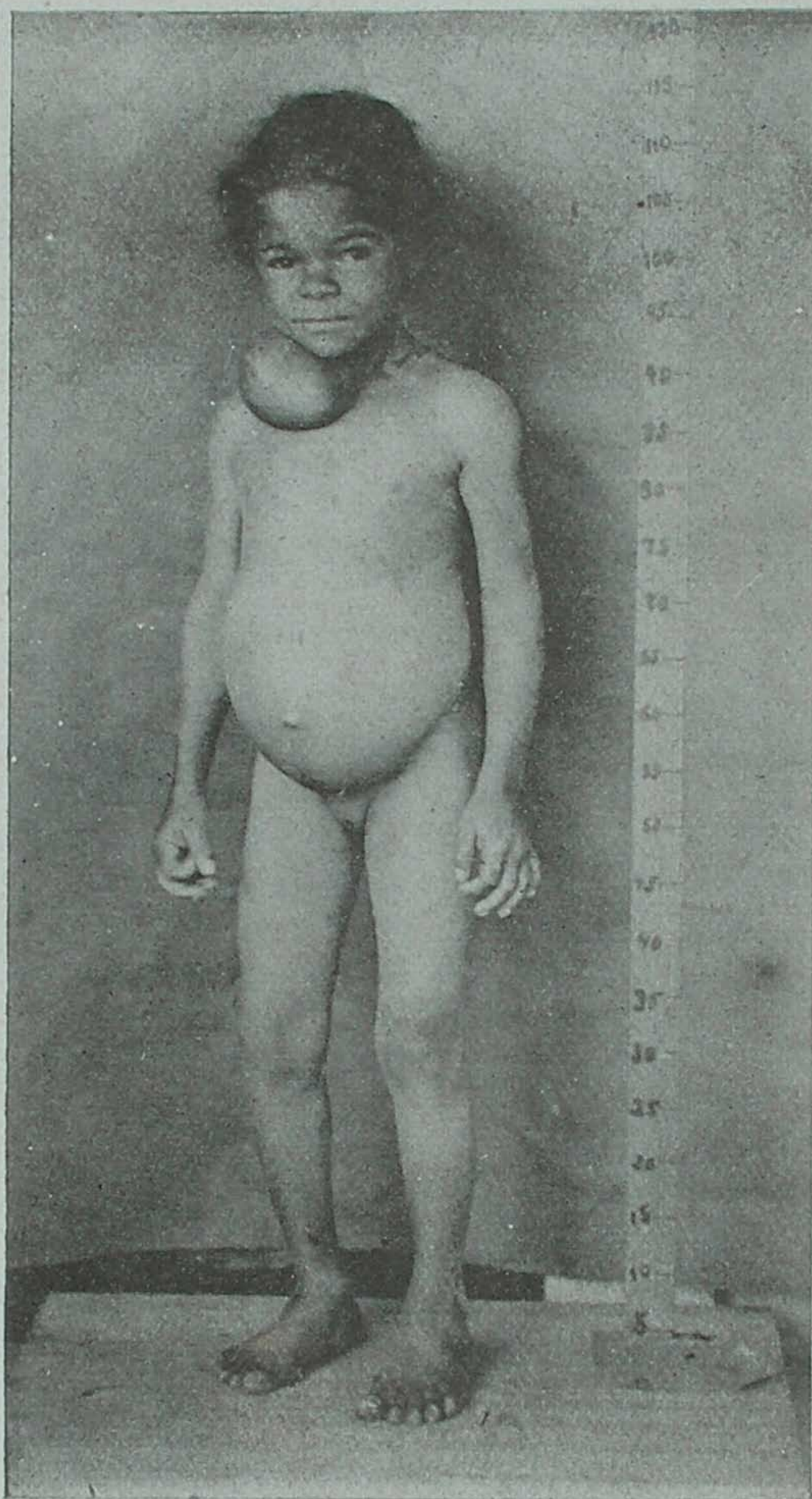


Fig. 10