

DAS REAÇÕES DE IMUNIDADE NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Júlio MUNIZ e Adair Cherpinsky MORAES

RESUMO

Os autores fazem uma revisão crítica dos diferentes métodos e técnicas imunológicas utilizados no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, resumindo sua experiência nesse campo.

Resumo do Editor

INTRODUÇÃO

Doença parasitária capaz de evoluir muitas vezes sem grande sintomatologia, a tripanosomiase americana é, entretanto, uma das que possuem hoje seguros métodos de laboratório para sua identificação.

Assim é que, além daqueles que visam a demonstração direta do parasito ou o seu isolamento, tais como: o exame a fresco do sangue ou em preparações coradas, a hemocultura, a inoculação em animais, o xenodiagnóstico e a biopsia, temos os chamados métodos indiretos baseados nas reações de imunidade.

Por constituírem os fundamentos sobre os quais se baseiam esses processos e para melhor interpretação dos resultados que porventura eles possam fornecer, é de importância termos sempre presente não só o modo de evoluir da parasitemia, como também das reações humorais provocadas no organismo pelo agente infeccioso no decorrer da enfermidade.

Sabemos que o *S. cruzi* não é um parasito sanguícola, como a maioria dos tripanosomas de vertebrados, que vivem e multiplicam-se no sangue sempre sob a forma de tripanosoma. Ao contrário disso ele se localiza fora da corrente circulatória em diferentes órgãos e tecidos, onde permanece e se multiplica, após assumir a forma de leishmânia. É dessa maneira que ele se perpetua no organismo (VIANNA ^{apud} 3).

As chamadas formas de tripanosoma metabólico que ocorrem no sangue e que se originam diretamente dos elementos leishmaniídeos, quando não são destruídas pelos elementos de defesa, voltam a se fixar em outros pontos do organismo, onde se transformam novamente nos elementos que lhes deram origem. Essa é a evolução que sofre no organismo o parasito.

Embora se possa obter *in vitro*, a metamorfose do elemento leishmaniídeo oriundo da forma metacíclica, em tripanosoma de tipo metabólico, desconhece-se qual o determinismo que regula essa transformação no organismo e quais os fatores que possam nela intervir (MUNIZ & FREITAS ²⁴).

A parasitemia pode tornar-se patente 12 a 15 dias após a formação dos primeiros aglomerados de parasitos no ponto de penetração e oriundos das formas metacíclicas infectantes, aglomerados esses já constituídos por elementos leishmaniídeos em multiplicação e em torno dos quais se estabelece um processo inflamatório de tipo normérgico mais ou menos intenso.

A invasão da corrente circulatória pelas formas de tripanosomas de tipo metabólico oriundos desse foco inicial, representa a generalização do processo infeccioso. Tal fato marca o fim do período de incubação e o início da fase aguda da doença com o aparecimento dos primeiros sintomas.

Com a constituição de novos focos em diferentes pontos do organismo no decorrer de alguns dias, a parasitemia tende a aumentar, para logo em seguida se estabilizar, mantendo-se sem grandes variações por um período que oscila entre 40 a 60 dias, em média.

Os índices parasitêmicos no homem mesmo na fase aguda são baixos, ocorrendo os mais elevados geralmente em crianças de tenra idade.

Devido às reações de defesa que se processam com a evolução da doença, a parasitemia tende a cair cada vez mais, atingindo níveis extremamente baixos e evoluindo de modo muito irregular.

Esse quadro parasitológico é o que caracteriza a fase crônica da enfermidade.

Enquanto na fase aguda os chamados métodos diretos que visam a demonstração do parasito dão sempre resultados positivos, já na fase crônica eles fornecem resultados muito inconstantes, mesmo quando repetidos.

Quanto ao modo pelo qual evolui a imunidade humoral nas diferentes fases da infecção, os resultados obtidos com o emprêgo de técnicas usadas no estudo das reações antígeno-anticorpo revelam a ocorrência precoce no sangue de anticorpos específicos relacionada na maioria das vezes com o início da parasitemia.

No decorrer da fase aguda, a concentração de anticorpos pode atingir níveis elevados como indicam os títulos aglutinantes de 1/5.000, 1/10.000, 1/20.000 e reações de precipitina intensas processando-se rapidamente.

Com a diminuição crescente da parasitemia, fato que coincide com o início da fase crônica da doença, observa-se uma queda no teor de anticorpos.

Essa queda que se processa na maioria dos casos gradativamente e mais raramente de maneira abrupta, traz em consequência uma diminuição acentuada da primitiva concentração, podendo ela atingir então níveis extremamente baixos revelados somente pelas reações do tipo de fixação do complemento.

A maneira pela qual evolui a imunidade humoral na tripanosomíase americana, de-

monstra que o *S. cruzi* se comporta em relação ao organismo humano, como um componente dotado de acentuado poder antigênico, como nenhum outro parasito, patogênico para o homem, pertencente ao ramo *Protozoa*.

Das diferentes técnicas sorológicas utilizadas no diagnóstico da tripanosomíase americana, a fixação do complemento é a mais empregada. Ela é que fundamenta na maioria das vezes o diagnóstico nos casos crônicos dessa doença. Foi introduzida, no diagnóstico da parasitose, por GUERREIRO & MACHADO¹².

Sabemos que de tôdas as reações imunológicas é a mais sensível, e baseia-se na capacidade que possui o complemento de se combinar com complexo antígeno-anticorpo. Dêsse modo reações imunológicas podem ser constatadas quando outras manifestações visíveis da combinação antígeno-anticorpo, tais como, a precipitação e a aglutinação se mostram ausentes, e com a vantagem de nela poderem ser empregados antígenos solúveis e insolúveis. Segundo DOERR⁸ ela é 10 vezes mais sensível que a reação de precipitina.

As quantidades e concentrações dos diferentes componentes que entram em sua execução devem ser rigorosamente testadas e uma série de contrôles deve acompanhar a sua execução, servindo para demonstrar que a fixação representa uma reação específica de imunidade.

A maioria das técnicas usadas emprega de 1½ a 2½ unidades de complemento 100% de hemólise ou 4 a 5 unidades 50% de hemólise; devendo a unidade de complemento ser determinada em presença do antígeno.

Embora a reação possa ser mais sensível usando-se menos complemento, uma margem acima da unidade deve ser usada com o fim de eliminar as reações positivas falsas, devido a um ligeiro efeito anticomplementar e para prevenir erros oriundos nas medidas.

A sensibilidade pode ser aumentada usando-se um teor maior de hemolisinas. De regra, empregam-se 4 unidades hemolíticas para sensibilizar as hemátias, não devendo ser utilizados na reação soros com teor hemolítico abaixo de 1/1.000.

A suspensão de hemátias a 5% deve ser ajustada de maneira a conter 1 milhão de hemátias por mm³.

Em vez de usar soluto fisiológico no preparo de diferentes reagentes utilizados na reação, é preferível utilizar uma solução salina tamponada de Veronal, contendo cloreto de cálcio e cloreto de magnésio.

A atividade do soro a examinar pode ser determinada procedendo-se a uma série de diluições e empregando-se uma quantidade constante de antígeno e de complemento.

O grau de fixação pode ser representado por símbolos como: +++++, +++, ++, +, 0; ou em termos de percentagem de hemólise: 0%, 25%, 50%, 75%, 100%.

A fase propriamente de fixação pode ser realizada à temperatura de 37° ou 0°C, sendo a temperatura um importante fator.

No primeiro caso, 1½ a 2 horas representam o máximo de tempo, para que não ocorra deterioração do complemento, enquanto que no segundo caso o tempo pode variar de 4 a 24 horas.

No método quantitativo usado por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER³¹, usa-se um quociente que exprime a relação entre a quantidade de complemento necessária para determinar 50% de hemólise, quando em presença do soro a examinar e do antígeno, e a quantidade de complemento necessária para determinar 50% de hemólise, quando em presença somente do soro. Quociente maior que a unidade é considerado como evidência de uma reação de imunidade.

Na execução dessa técnica, conhecidos os graus de hemólise parcial que ocorreram quer no tubo de reação (com 3, 6 e 12 unidades), como no tubo testemunho (com 1 unidade), procede-se à determinação do número de unidades de complemento necessário para obter-se 50% de hemólise.

Para isso, divide-se por meio de fatores de conversão, deduzidos pela fórmula de von Krogh e que constam de tabelas especiais, o número das unidades que determinaram hemólises parciais quer nos tubos de reação como no testemunho do soro.

Em relação ao antígeno, embora não haja divergência quanto ao uso das formas de cultivo do *S. cruzi*, várias têm sido as téc-

nicas propostas para o seu preparo, tais como: formas de cultivo lavadas e suspensas em soluto glicerinado; formas de cultivo lavadas e suspensas em mertiolato a 1/10.000; formas de cultivo lavadas e liofilizadas; formas de cultivo tratadas pelo método de Boer & Cox; formas de cultivo dessecadas a 55°C, tratadas pelo éter sulfúrico e depois extraídas com uma solução tamponada pH 8,6-8,7, que após centrifugação é dessecada e mantida em baixa temperatura; antígeno alcoólico e antígeno metílico.

Referências à ação anticomplementar desses antígenos têm sido assinaladas na literatura, fato esse que certos autores procuram relacionar com o método empregado no preparo desse componente.

Entretanto (MUNIZ & SOUZA²⁶) tiveram ocasião de demonstrar que a ação anticomplementar apresentada pelos antígenos do *S. cruzi* é inerente à própria constituição antigênica do parasito, cujos elementos oriundos das culturas mostram-se capazes de reagir com amboceptores líticos naturais (properdina de Pillemer?) existentes nos soros humanos, como dos cobaios e de outros animais, fixando dessa maneira o complemento. Tal fato já havia sido pôsto em evidência por MUNIZ & BORRIELLO²⁰ ao estudarem a ação lítica de soros de animais infectados com o *S. cruzi*, que soros normais, quer do homem como do cobaio, eram capazes de lisar quando em presença do complemento a quase totalidade das formas de *critídias* existentes nos cultivos em meios artificiais, enquanto que as formas *metacíclicas* e os elementos *leishmanióides* resistiam a essa ação.

Apesar da grande importância, sob diferentes pontos de vista, esse fato não tem sido levado em conta nos estudos relacionados com o comportamento dos antígenos preparados com formas de cultivo do *S. cruzi*, embora seja do conhecimento de todos que mais de 85% das formas encontradas nos cultivos, quer em meios sólidos como em meios líquidos, sejam representadas por formas de *critídias*.

Fora dos casos em que reações de grupo podem ocorrer, como no caso da leishmaniose tegumentar, a reação de fixação é específica, como falam os trabalhos realizados

fora dos países onde grassa endêmicamente a doença.

As pesquisas de LIEM & VAN THIEL¹⁴, realizadas na Holanda, e de DAVIS & SULLIVAN⁵, feitas nos Estados Unidos, são conclusivas nesse sentido.

É verdade que os primeiros autores fazem uma referência que necessita maiores investigações, pois, de 6 soros examinados de *Ulcus molle*, 4 deram resultados positivos, o mesmo ocorrendo com o sôro de coelho previamente imunizado com a "Vacina de Dmelcos", que é uma vacina preparada com *Haemophilus ducreyi*, como assinalam também que de 146 soros com Wassermann positivo, 4 foram capazes de reagir com antígeno de *S. cruzi*. Fato semelhante tem sido verificado por outros autores em relação a soros com Wassermann positivo.

Já tivemos ocasião, em diferentes trabalhos, de chamar a atenção para a alta complexidade do antígeno *S. cruzi* e o cuidado com que se deve manejar algumas das técnicas empregadas nesse tipo de reação, visando uma maior sensibilidade, mas que podem levar a resultados inespecíficos.

Por isso preferimos utilizar na sua execução duas unidades de complemento 100% e considerar como inexpressivas fixações parciais com uma percentagem acima de 50% de hemólise, no tubo contendo a maior quantidade de sôro com que costumamos trabalhar (0,2 ml).

CHAFEE & col.² referem que um tratamento preliminar pelo éter das formas de cultivo do parasito a serem utilizadas no preparo de antígenos, reduz a frequência das reações sorológicas falsas, e sugerem que lipídios como cardiolipina ou semelhantes a êles ocorram na estrutura do *S. cruzi*.

Qualquer conclusão a respeito das vantagens dêste ou daquele processo no preparo de antígenos visando maior especificidade será inconsistente antes de serem feitas pesquisas sôbre a maneira de se comportarem, sob o ponto de vista imunológico, as diferentes frações que compõem a estrutura do *S. cruzi*, obtidas por meio de técnicas de fracionamento.

Em nosso laboratório no Instituto Oswaldo Cruz, em rotina de diagnóstico, inicialmente usávamos o antígeno de DAVIS⁴, mas depois

passamos a empregar formas de cultivo do *S. cruzi* previamente liofilizadas e assim mantidas em baixa temperatura, até o momento de serem usadas, quando são suspensas em solução salina tamponada de Veronal com Mg e Ca.

Sôbre o valor da reação de fixação no diagnóstico da tripanosomíase americana, a quase totalidade dos autores que dela se têm ocupado é acorde em reconhecer representar ela o meio mais seguro para evidencição dos casos crônicos, não sendo superada nesse particular por nenhuma reação de tipo imunológico.

Embora possam ocorrer variações quanto à sua intensidade, relacionadas talvez com uma maior ou menor atividade do parasito, ela permanece positiva no decorrer da fase crônica da doença, mesmo que esta evolua sem nenhuma sintomatologia.

Temos casos de pessoas infectadas há 30 anos, reagindo fortemente.

Quanto ao seu comportamento na fase aguda ou subaguda da doença, pelo que nos foi dado observar até hoje em cerca de 70 casos, ela se mostra sempre positiva.

Resultados publicados por outros pesquisadores assemelham-se aos por nós obtidos.

Assim, DIAS⁷ refere em trabalho estatístico, que em 131 casos, apresentando tripanosoma no sangue pelo exame direto, a reação de fixação com antígeno de Davis foi positiva em 94,6% (124 casos), negativa em 3,1% (4 casos) e duvidosa em 2,3% (3 casos).

RASSI & col.²⁹ empregando a técnica quantitativa de Wadsworth, Maltaner & Maltaner em 18 casos agudos, obtiveram os seguintes resultados: positiva em 16, nos quais o tempo de doença variou entre 13 e 31 dias; em 1 o sôro se mostrou anticomplementar e no restante a reação foi duvidosa (título 1,5).

Discordantes, entretanto, são os resultados publicados por FREITAS⁹, que em 14 casos agudos e subagudos obteve com a técnica quantitativa e um antígeno por êle preparado, 50% de resultados negativos, e os de PELLEGRINO & BRENER²⁸ que também, em 14 casos agudos, obtiveram fixações negativas em 7, positivas em 6 e duvidosa em 1.

Nos casos dêstes dois autores não se pode atribuir as reações negativas à ausência de

anticorpos específicos, pois todos os soros reagem à reação de precipitina, sendo que 5 de maneira intensa.

De acôrdo com o ponto de vista defendido por FREITAS⁹ e por PELLEGRINO & BRENER²⁸, com base nos resultados por êles obtidos, a maior percentagem de reações de fixação positivas (97,2%) ocorre justamente na fase da doença em que a concentração de anticorpos específicos é mais baixa.

A discordância desses resultados com os acima enumerados é de difícil interpretação.

De qualquer maneira, tal fato deve constituir exceção e não regra geral, como dão a entender certas publicações.

Os primeiros estudos relacionados com o emprêgo da prova de aglutinação, no diagnóstico da tripanosomíase americana, constam do trabalho por nós publicado em 1944, juntamente com G. FREITAS⁹, no qual demonstramos que em 6 soros de casos agudos estudados, os títulos aglutinantes variavam entre 1/2.560 e 1/10.240, enquanto que em 24 soros de casos crônicos os títulos variavam entre 1/160 a 1/2.560.

Posteriormente²³, numa casuística de cerca de 211 casos crônicos diagnosticados pela reação de fixação do complemento, pudemos verificar que títulos mais baixos que 1/160 podiam ser observados (15%), tornando difícil nesses casos decidir sobre a positividade da reação, em vista de soros de indivíduos não portadores da infecção poderem aglutinar formas de cultivo do *S. cruzi* nessas diluições.

Embora valiosa, a técnica de aglutinação sofre umas tantas restrições quanto ao seu emprêgo, como método de rotina, pela necessidade de nela serem utilizadas suspensões vivas do parasito, o que exige a manutenção constante, no laboratório, de cultivos em condições de serem usados. Além disso torna-se necessário o emprêgo de amostras que não sofrem aglutinação espontânea quando em presença de electrólitos.

O emprêgo de suspensões mortas tira de muito a sensibilidade do método.

Os soros a serem examinados devem ser primeiro inativados para ativar o fenômeno de lise. A leitura deve ser procedida após 2 horas a 37°C e decorridas 24 horas. Nos soros dotados de elevado poder aglutinante,

como os provenientes de casos agudos, pode-se observar não só aglutinação de tipo somático como flagelar.

A chamada "técnica em lâmina" proposta por SENEKEJIE³⁰, com leitura após 5 minutos, é desprovida de qualquer valor.

NUSSENZWEIG & FARIA²⁷ aplicaram a "prova de Coombs indireta", com o fim de obter maior sensibilidade e observaram que os resultados obtidos com ela em soros de casos crônicos assemelhavam-se aos fornecidos pela reação de fixação do complemento, mas que o seu emprêgo como técnica de rotina é dificultado pelas mesmas razões acima expostas em relação com a prova de aglutinação.

Conhecendo os elevados índices aglutinantes apresentados pelos soros oriundos de casos agudos, fomos levados a investigar a possibilidade de introduzir na técnica de diagnóstico dessa doença a reação de precipitina.

Em trabalho apresentado com Gilberto de FREITAS²², demonstramos ser possível obter das formas de cultivo do *S. cruzi* e de outros tripanosomídeos, por meio do método de Fuller, frações contendo poliósides, que se comportavam como ótimos precipitinogêneos, quando em presença de imune-soros preparados com êsses diferentes parasitos. Nesse mesmo trabalho assinalamos que soros de casos agudos de tripanosomíase americana se comportavam de igual maneira que o imune-soro, quando em presença da fração do *S. cruzi*.

Passando à aplicação prática, verificamos que a totalidade dos soros oriundos não só de casos agudos como de subagudos, por nós examinados, apresentava igual comportamento, enquanto que os soros dos casos crônicos nem sempre reagem.

Em trabalho posterior^{16, 23}, estabelecemos a técnica e ressaltamos o valor do método na identificação desses casos, nos quais pudemos obter 100% de positividade, em contraste com a percentagem de 25 a 30% obtida nos casos crônicos.

A obtenção dessa fração ativa possibilitou-nos o emprêgo no estudo dessa doença de novas técnicas, tais como: "aglutinação de partículas de colóide", "hemoaglutinação" e "hemólise condicionada".

No teste da "hemoaglutinação" utilizamos (MUNIZ^{15, 16, 17}) hemátias do próprio doente

ou do grupo O, com o fim de evitar a interferência de anticorpos de tipo heterófilo que ocorrem com certa constância nessa infecção, exigindo repetidas absorções do soro a investigar quando na prova hemáticas de carneiro são empregadas.

Em relação à pesquisa de lisinas específicas com fim diagnóstico, MUNIZ & BORRIELLO²⁰ tiveram ocasião de demonstrar que o emprego de formas de cultivo nesses ensaios, como havia proposto DENISSON⁶, invalidava completamente a prova, em vista da alta sensibilidade demonstrada pelas formas de crídiã, que constituem cerca de 85% dos elementos presentes nos cultivos do *S. cruzi* em meios artificiais, para lisinas naturais (*properdina* de Pillemer?) existentes nos soros humanos e de determinados animais.

Quanto aos testes cutâneos, temos a dizer que, embora as reações de hipersensibilidade desempenhem um papel da mais alta importância na patogenia do *S. cruzi*, a pesquisa de anticorpos especiais, sensibilizantes da pele do tipo "reagina", dão sempre resultados negativos, ao contrário do que ocorre na leishmaniose tegumentar.

Tudo leva a crer que o anticorpo responsável pelas reações de hipersensibilidade que ocorrem na tripanosomíase americana é um anticorpo ordinário, do tipo precipitina, conforme demonstramos com Penna de AZEVEDO¹⁹.

Embora não específica, a pesquisa de anticorpos heterófilos pode representar um método auxiliar na investigação dos casos agudos e subagudos, pois esse tipo de anticorpo ocorre com grande constância e geralmente em elevada concentração no início dessa enfermidade (GRAÑA¹¹, MUNIZ & FREITAS^{21, 22}, MUNIZ & SANTOS²⁵, GÓES & LOBO¹⁰, AMATO NETO & SILVA¹).

SUMMARY

Immunological reactions in the diagnosis of Chagas' disease.

The AA. make a critical review of the various methods and immunological techniques utilized for the serological diagnosis of Chagas disease, summarizing their experience in this field.

Editor's summary

REFERÊNCIAS

1. AMATO Neto, V. & SILVA, L. H. P. da — Anticorpos heterófilos na doença de Chagas: resultados obtidos em casos agudos e crônicos. Hospital, Rio de Janeiro 45:159-169, 1954.
2. CHAFEE, E. F.; FIFE Jr., E. & KENT, J. F. — Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. Amer. J. trop. Med. & Hyg. 5:763-771, 1956.
3. CHAGAS, C. — Le cycle de *Schizotrypanum cruzi* chez l'homme et les animaux de laboratoire. Bull. Soc. Pathol. éxot. 4: 467-471, 1911.
4. DAVIS, D. J. — An improved antigen for complement fixation in American trypanosomiasis. Publ. Health Rep. 58:775-777, 1943.
5. DAVIS, D. J. & SULLIVAN, T. S. — Complement fixation tests for American trypanosomiasis in Texas. Publ. Health Rep. 61: 1083-1084, 1946.
6. DENISSON, N. — Experimental studies on *Trypanosoma cruzi* infection and reticulo-endothelial blockade in rats. Amer. J. Hyg. 38:178-184, 1943.
7. DIAS, E. — Informações acerca de 300 casos de doença de Chagas com período inicial conhecido, fichados no Centro de Estudos de Bambuí. Hospital, Rio de Janeiro 47:9-17, 1955.
8. DOERR, R. — Las investigaciones sobre inmunidad. Revista de Occidente, Madrid, 1953.
9. FREITAS, J. L. P. de — Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. Arq. Hig. Saúde públ. 16:55-94, 1951.
10. GÓES, P. & LOBO, B. M. — Sobre o comportamento do anticorpo heterólogo ocorrente na doença de Chagas. Arq. brasil. Med. 40:307-318, 1950; também em: An. Microbiol. 1:69-77, 1951.
11. GRAÑA, A. — Anticuerpos heterófilos: clínica e inmunología. Buenos Aires, Espasa-Calpe Argentina, 1944.
12. GUERREIRO, C. & MACHADO, A. — Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Chagas como elemento diagnóstico. Brasil-méd. 27:225-226, 1913.
13. KABAT, E. A. & MAYER, M. M. — Experimental immunochemistry. Springfield, Charles C. Thomas, 1948.

14. LIEM, S. D. & van THIEL, P. H. — The complement fixation test for Chagas disease employing a dried culture antigen. Acta leiden. 15/16:259-274, 1940/41.
15. MUNIZ, J. — Action of red cells sensitized with the polysaccharid fraction of the *Schizotrypanum cruzi* in the presence of specific sera. Conditioned hemolysis, one case of immunity reaction. Newsl. Soc. Amer. Bacteriol., p. 1-9, 1949.
16. MUNIZ, J. — Do valor da reação de precipitina no diagnóstico das formas agudas e subagudas da doença de Chagas (tripanosomiasis americana). Brasil-méd. 61:261-267, 1947; também em: Mem. Inst. Oswaldo Cruz 45:537-549, 1947.
17. MUNIZ, J. — A hemólise condicionada como um fenômeno de ordem mais geral. Congr. internac. Microbiol., 5ª, Rio de Janeiro, 1950. p. 144-145.
18. MUNIZ, J. — On the value of conditioned hemolysis for the diagnosis of American trypanosomiasis. Hospital, Rio de Janeiro 38:685-691, 1950.
19. MUNIZ, J. & AZEVEDO, A. P. — Novo conceito de patogenia da doença de Chagas (tripanosomiasis americana). Hospital, Rio de Janeiro 32:165-183, 1947.
20. MUNIZ, J. & BORRIELLO, A. — Estudos sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícola do *Schizotrypanum cruzi*. Rev. brasil. Biol. 5: 563-675, 1945.
21. MUNIZ, J. & 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. Inst. Oswaldo Cruz 41:303-333, 1944.
22. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacarídeos de *Schizotrypanum cruzi* e de outros tripanosomídeos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os testes de floculação (sublimado e formol-gel). Rev. brasil. Biol. 4:421-438, 1944.
23. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. Brasil-méd. 60:337-341, 1946.
24. MUNIZ, J. & FREITAS, G. — Realização "in vitro" do ciclo do *S. cruzi*, no vertebrado, em meio de caldo-líquido peritoneal. Rev. brasil. Biol. 6:467-484, 1946.
25. MUNIZ, J. & SANTOS, M. C. F. — Heterophile antibodies in American trypanosomiasis: the presence of heterogenic component(s) in the antigenic structure of the *Schizotrypanum cruzi* shown by conditioned hemolysis reaction. Hospital, Rio de Janeiro 38:601-616, 1950.
26. MUNIZ, J. & SOUZA, J. G. — Da ação anti-complementar dos antígenos constituídos por formas de cultivo do *S. cruzi*. Congr. internac. Doença de Chagas, Rio de Janeiro, 1959. [no prelo]
27. NUSSENZVEIG, V. & FARIA, R. — Prova de antiglobulina no diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica. Hospital, Rio de Janeiro 47:81-92, 1955.
28. PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. — A reação de fixação do complemento na doença de Chagas. IV. Observações em casos agudos de esquizotripanose. Hospital, Rio de Janeiro 42:755-761, 1952.
29. RASSI, A.; BORGES, C.; REZENDE, J. M. de; CARNEIRO, O.; SALUM, J.; RIBEIRO, I. B. & PAULA, O. H. de — Fase aguda da doença de Chagas: aspectos clínicos observados em 18 casos. Rev. goiana Med. 4: 161-189, 1958.
30. SENEKJIE, H. A. — Immunologic studies in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: slide agglutination and intradermal test. Proc. Soc. exper. Biol. & Med. 52:56-59, 1943.
31. WADSWORTH, A.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of the complement fixation reaction with syphilitic serum and tissue extract: technic of the practical quantitative test. J. Immunol. 35:217-234, 1938.

Recebido para publicação em 22 janeiro 1962.