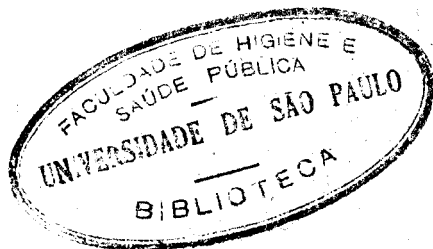


INSTITUTO DE HIGIENE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE HIGIENE E SAUDE PÚBLICA DO ESTADO
DIRETOR: PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

BOLETIM N. 79

Reação de fixação do complemento na tripanosomose americana experimental da cobaia, feita com antígeno de cultura de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Tipo Kelser).

F. A. Cardoso
ASSISTENTE



1943
IMPrensa OFICIAL DO ESTADO
SÃO PAULO

INSTITUTO DE HIGIENE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE HIGIENE E SAUDE PÚBLICA DO ESTADO
DIRETOR : PROF. G. H. DE PAULA SOUZA

BOLETIM N. 79

Reação de fixação do complemento na tripanosomose americana experimental da cobaia, feita com antígeno de cultura de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Tipo Kelser).

F. A. Cardoso
ASSISTENTE

1943
IMPRESA OFICIAL DO ESTADO
SÃO PAULO

TRABALHO DO INSTITUTO DE HIGIENE
DA UNIVERSIDADE DE S. PAULO

(Diretor: Prof. Dr. G. H. de Paula Souza)

**Reação de fixação do complemento na tripanosomose
americana experimental da cobaia, feita com anti-
geno de cultura de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909
(Tipo Kelsler) (*)**

F. A. CARDOSO,

Livre-docente de Higiene da Faculdade de Medicina
Assistente do Instituto de Higiene

INTRODUÇÃO

Ultimamente tem sido despertado o interêsse médico para a importância epidemiológica da moléstia de CHAGAS, com as recentes investigações realizadas em vários países sul-americanos, que resultaram no descobrimento de número verdadeiramente considerável de casos.

Entre nós, se bem que a existência de extensas zonas com triatomas infectados indique vasta disseminação da tripanosomose americana em nosso meio rural, o número de casos revelados tem sido pequeno, mais por falta de pesquisas em larga escala, bem orientadas, que por outra causa qualquer.

A inexistência de um meio fácil e seguro de diagnóstico desta moléstia tem sido, no entanto, o principal fator da falta de conhecimento exato sobre a sua extensão. O diagnóstico, tanto clínico como de laboratório, ainda é difícil.

Para o primeiro, o complexo oftalmo-ganglionar é um grande auxiliar na pesquisa de casos agudos. Porém, os casos crônicos passam, na maioria, despercebidos. E, no estado atual

(*) Os resultados da parte experimental deste trabalho foram apresentados à Seccção de Higiene, Moléstias Tropicais e Infecciosas da Associação Paulista de Medicina, na sessão de 4 de maio de 1940.

dos nossos conhecimentos sobre esta moléstia, o diagnóstico clínico é, geralmente, apenas um diagnóstico de suspeita, que requer confirmação por parte do laboratório.

Os recursos que êste nos oferece ainda não são completos. Os métodos parasitológicos, baseados na descoberta do parasita no sangue, os únicos em que, até agora, podemos confiar, tropeçam todos num grande obstáculo: a irregularidade do aparecimento ou mesmo a ausência do tripanosoma no sangue dos doentes.

Disponos, é verdade, além dos métodos parasitológicos diretos de pesquisa do protozoário no sangue — o exame a fresco, o esfregaço corado e a gota espessa — de outros, indiretos, muito mais sensíveis, baseados no enriquecimento do material suspeito. São a tentativa de cultura em meios adequados, a inoculação em animais sensíveis e o xenodiagnóstico de BRUMPT. No entanto, além da falibilidade a que estão sujeitos pelo motivo acima referido, são processos que exigem um espaço de tempo relativamente longo para se obter o resultado, o que não os torna práticos.

Isto fez com que se recorresse aos processos sorológicos, em busca de um meio realmente prático e totalmente eficiente para o rápido diagnóstico da moléstia.

Os primeiros trabalhos nesse campo foram sobre a reação de fixação do complemento. Mais tarde tentaram-se outros métodos sorológicos. PACKCHIANIAN (1940) obteve resultados satisfatórios com a reação de aglutinação em animais infectados experimentalmente com o **T. cruzi**.

MAYER e PIFANO (1941), realizaram um trabalho sobre a intradermorreação, em que o método parece ser de valor diagnóstico. Concluíram que a intradermorreação, realizada com o antígeno por eles preparado “apresenta grande valor prático para o diagnóstico da moléstia de CHAGAS, sendo mais segura do que a reação de MACHADO...” Entretanto, não realizaram um estudo comparativo sobre o valor das duas reações, não sendo justificável, porisso, a conclusão apresentada.

Em trabalho recente, nós, em colaboração com PESSOA (1942), experimentando a possibilidade da utilização da intradermorreação para o diagnóstico da moléstia de CHAGAS, chegamos a resultado contrário ao obtido por MEYER e PIFANO.

Em nossas experiências feitas sobre casos humanos da moléstia de CHAGAS e animais inoculados com **T. cruzi**, as tentativas de intradermorreação com antígeno de cultura de **T. cruzi** foram sistematicamente negativas.

De todos êsses métodos sorológicos descritos, o que, até agora, tem sido mais estudado, é, porém, o da fixação do complemento. Os estudos sôbre essa reação partiram do Brasil; com os trabalhos de GUERREIRO e MACHADO (1913), VILLELA e BICALHO (1923) e LACORTE (1926), em que êsses autores concluíram haver, de um modo geral, uma especificidade da reação, tendo os antígenos empregados sido preparados a partir de órgãos, baço ou coração, geralmente de animais de laboratório infectados artificialmente pelo *T. cruzi*. A variação da extensão da infecção dêsses órgãos e do poder do antígeno, assim como a dificuldade da sua preparação e conservação limitaram o emprego dêsse método.

Mais recentemente, KELSER (1936) realizou um trabalho com o fim do desenvolvimento de um antígeno mais satisfatório, que pudesse ser preparado com um alto poder antigênico, mais fácil e uniformemente. Obteve o seu antígeno diretamente de cultura artificial do *T. cruzi* em meio de BONACCI, por meio de técnica fácil, que será descrita posteriormente. KELSER concluiu pela especificidade da reação com o seu antígeno, após tê-la realizado com mais de quatrocentos espécimes de sôro, inclusive alguns de portadores de moléstia de CHAGAS, e ter encontrado resultados positivos nos casos conhecidos da moléstia e negativos em todos os outros, não tendo havido reação cruzada nos casos de WASSERMANN positivo.

Em investigação levada a efeito no Panamá, JOHNSON e KELSER (1937) aplicaram o método da reação da fixação do complemento para a descoberta de casos da moléstia de CHAGAS. Do total de 1.251 sôros examinados, 37 acusaram reação positiva, e 11, suspeita. Concluíram, também, que havia especificidade da reação e ausência de reação cruzada com os sôros positivos para a reação de WASSERMANN.

KELSER (1936) julga o emprego do meio de cultura de BONACCI, fórmula IV, para a preparação do seu antígeno, muito importante. Êste meio é de fato, ao nosso ver, o meio de eleição para a conservação do *T. cruzi*, devendo ser preferido aos de NOGUCHI, PONSELLE e NNN, que têm sido também aconselhados.

Afim de verificar o comportamento da reação de fixação do complemento com o antígeno de KELSER em cobaias normais e em cobaias infectadas experimentalmente pelo *T. cruzi*, se há ou não preferência quanto à intensidade da positividade da reação para o antígeno homólogo, se existe variabilidade do valor antigênico dos antígenos preparados com amostras diversas, se os anticorpos são de aparecimento precoce ou não e a sua persistência, realizámos o presente trabalho.

PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para a inoculação das cobaias, assim como o preparo do antígeno, empregamos sempre culturas do **T. cruzi** em meio de BONACCI, fórmula IV (BONACCI, 1934).

A confecção desse meio compreende a preparação de um agar nutritivo e a sucessiva incorporação a este de outras substâncias de enriquecimento. É realizada segundo a técnica seguinte: o agar nutritivo se prepara com um caldo de carne, uma parte em duas de água, a que se junta peptona de WITTE, na proporção de 2,5 % e cloreto de sódio, 0,7 % e agar, 1 %. A mistura é neutralizada ao tornesol, aquecida a 115° C, durante 20 minutos e filtrada em algodão. Reparte-se em frascos de ERLLENMEYER, na quantidade de 100 cc. de mistura em cada um. Esteriliza-se na autoclave a 110° C pelo tempo de 20 minutos.

Uma vez obtido o agar nutritivo, é ele fundido e resfriado a 50° C. Juntam-se-lhe 0,5% de glicose e 5% de sangue total de cobaia jovem. A mistura é então distribuída em tubos esterilizados de 19 mm. de diâmetro e deve ser solidificada em posição inclinada.

AMOSTRAS USADAS NA OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS

Para a verificação da preferência ou não para o antígeno homólogo, quanto à intensidade da positividade da reação, e da variabilidade do valor antígeno dos antígenos preparados com amostras diversas, foram empregadas 4 amostras diferentes do **T. cruzi**, por nós designadas de amostras 13, 14, 15 e 16.

A amostra 13, amostra 'CABORE', gentilmente enviada pelo Dr. E. DIAS, do Instituto Osvaldo Cruz (Rio de Janeiro), estava na 30.^a passagem em meio de NOGUCHI. A 14, que obtivemos graças à amabilidade do Dr. A. VIANA MARTINS, do Instituto Biológico Ezequiel Dias (Belo Horizonte), fôra isolada de tatu, proveniente de Lassance, Minas Gerais, e contava 17 passagens em cães novos e 7 passagens em meio de BONACCI. A 15, isolada por nós de um caso humano agudo (Caso T. C.) (V. CARDOSO e ROSENFELD, 1940), por xenodiagnóstico, em junho de 1939, contava várias passagens em cobaia e camundongo. Fora isolada em meio de PONSELLE e semeada em meio de BONACCI, A 16, isolada por nós de **Triatoma infestans**, proveniente de Monte Santo, Minas Gerais, contava várias passagens em cobaia.

Com a amostra 13 foram inoculadas 6 cobaias; com a 14, 10; com a 15, também 10 e com a 16 inoculámos 5 cobaias. De cada uma das amostras foi preparado o antígeno respectivo; empregámos, unicamente, culturas em tubos.

PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

Os tubos de meio, preparados como já foi descrito, foram inoculados com uma gota de uma cultura rica, verificada ao microscópio. Após esperar, em geral, 10 dias, para o pleno desenvolvimento das culturas, e após verificação microscópica da riqueza e pureza das mesmas, procedemos à preparação do antígeno de acôrdo com a técnica de KELSER, que é a seguinte: 0,75 cc. de água destilada estéril são adicionados a cada cultura. Por meio de uma pipeta capilar é homogeneizada a mistura dos organismos no líquido adicionado e a suspensão passada para tubos de centrifugação de fundo cônico.

Na retirada do material dos tubos o máximo cuidado deve ser empregado em não arrastar, juntamente com a suspensão, partículas do meio de cultura, e KELSER aconselha o emprêgo de água destilada para a suspensão dos tripanosomas, ao invés de solução fisiológica, com o fim de serem hemolisadas hemácias que porventura sejam retiradas.

Após a colocação nos tubos de centrifugação do conteúdo de vários tubos de cultura os tripanosomas são separados do líquido por centrifugação em alta velocidade, mais ou menos 4.000 rotações por minuto, durante meia hora. O líquido sobrenadante é cuidadosamente retirado por meio de pipeta capilar e a cada tubo são adicionados 8 cc. de solução fisiológica estéril para a lavagem dos microorganismos. Para isso, êstes são, primeiramente, suspensos na solução por meio de alça de platina e, em seguida, procede-se a nova centrifugação em alta velocidade por meia hora.

A solução fisiológica sobrenadante é então retirada e à massa de microorganismos são adicionados 2 volumes de glicerina a 50 %, em solução fisiológica, realizando-se nova suspensão por meio de uma alça de platina.

Esta suspensão constitue o antígeno **stock** e deve ser conservada em baixa temperatura, na geladeira.

**TÉCNICA DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO
DO COMPLEMENTO (*)**

DOSAGEM DO ANTÍGENO

Preparado o antígeno, realizámos a dosagem do seu poder hemolítico e anticomplementar, para a determinação, respectivamente, da unidade hemolítica e da unidade anticomplementar.

A unidade hemolítica foi determinada pela técnica expressa no quadro I.

DETERMINAÇÃO DA UNIDADE HEMOLÍTICA

Tubos	Antígeno 0,2 cc	Sol. fisioló- gica		Glóbs. a 5 % (1)		RESULTADO
1	Puro *	1,1		0,2		Não há hemólise
2	1:2	"	Uma hora a 37° em banho-maria	"	Meia hora a 37° em banho-maria	" " "
3	1:3	"		"		" " "
4	1:4	"		"		" " "
5	1:5	"		"		" " "
6	1:7	"		"		" " "
7	1:9	"		"		" " "
8	1:11	"		"		" " "
9	1:15	"		"		" " "
10	1:20	"		"		" " "

(1) Usamos sempre 0,2 cc. de glóbulos de carneiro a 5 %, lavados segundo a técnica comum; os 5 % são retirados do depósito.

QUADRO I

Pelos resultados obtidos, vimos que o antígeno não tem poder hemolítico. A unidade hemolítica seria a menor quantidade do antígeno que produzisse hemólise.

Para a determinação da unidade anticomplementar usámos a técnica apresentada no quadro II.

(*) A técnica que usámos é a seguida na Secção de Bacteriologia e Imunologia do Instituto de Higiene, chefiada pelo Dr. Lucas de Assumpção.

DETERMINAÇÃO DA UNIDADE ANTICOMPLEMENTAR

Tubos	Antígeno 0,2 cc	Complemento 1:10 (1) 0,3 cc em 0,5	Sol fisiológica		Glóbulos sensibillizados 2U (2)		RESULTADO	
1	Puro	0,5	0,6		0,2		Ausência de hemólise	
2	1:2	"	"		"		Hemólise parcial	
3	1:3	"	"	Uma hora a 37° em banho-maria	"	Meia hora a 37° em banho-maria	" "	
4	1:4	"	"		"		"	" "
5	1:5	"	"		"		"	Hemólise quasi total
6	1:7	"	"		"		"	Hemólise completa
7	1:9	"	"		"		"	" "
8	1:11	"	"		"		"	" "
9	1:15	"	"		"		"	" "
10	1:20	"	"		"		"	" "
11	1:30	"	"		"		"	" "
12	—	"	0,8		"		"	" "
13	—	—	1,3		"		"	Ausência de hemólise

(1) 0,3 cc da diluição 1:10 do complemento no volume de 0,5 cc, completado com solução fisiológica.

(2) 2 U = duas unidades hemolíticas.

QUADRO II

Considerando como unidade anti-complementar a menor porção do antígeno com a qual se dá pequena inibição de hemólise, no nosso caso ela foi de 0,2 cc da diluição a 1:5. Deve ser empregado na reação 1/3 dessa unidade, isto é, 0,2 cc. da diluição a 1:15.

DOSAGEM DO COMPLEMENTO

A dosagem do complemento em presença do antígeno, para a determinação da unidade complementar, foi sempre feita antes de se realizar a reação de fixação do complemento, e no mesmo dia. O quadro III mostra a técnica empregada.

DETERMINAÇÃO DA UNIDADE COMPLEMENTAR

Tubos	Comple- mento 1:10	Antígeno (1)	Sol. fisioló- gica		Glóbulos sensibiliza- dos 2 U		RESULTADO
1	0,05	0,2	1,05	Uma hora a 37° em banho-maria	0,2	Meia hora a 37° em banho-maria	Hemólise parcial
2	0,10	„	1,00		„		„
3	0,15	„	0,95		„		„
4	0,20	„	0,90		„		„
5	0,25	„	0,85		„		Hemólise total
6	0,30	„	0,80		„		„
7	0,35	„	0,75		„		„
8	0,40	„	0,70		„		„

(1) Dose escolhida para servir nas reações definitivas, isto é, 1/3 da unidade anti-complementar.

QUADRO III

A unidade complementar (U. C.) é a menor quantidade com a qual se dá a hemólise total. No nosso caso foi de 0,25 da diluição do complemento a 1:10. Tomámos sempre a dose seguinte, denominada unidade complementar corrigida (U. C. C.), no nosso caso 0,30. Para facilidade de distribuição completámos o volume para 0,5 cc. com solução fisiológica.

TÉCNICA DA REAÇÃO

Verificado não ter o antígeno poder hemolítico e determinadas a unidade anticomplementar do antígeno e a unidade complementar corrigida do complemento, passámos às reações de fixação do complemento, das quais damos, no quadro IV, um exemplo.

TÉCNICA DA REAÇÃO DE FIXAÇÃO
DO COMPLEMENTO

Tubos	Antígeno (1)	Soro inativado	Complemento 1/10 U. C. C. em 0,5 cc. (2)	Sol. fisiológica	Glóbulos sensibili- zados 2 U	RESULTADO
1	0,2	0,1	0,5	0,5	0,2	+++ (3)
2	0,2	0,2	0,5	0,4	0,2	++++
3	0,2	—	0,5	0,6	0,2	H (4)
4	—	0,2	0,5	0,6	0,2	H
5	—	—	0,5	0,8	0,2	H

(1) 0,2 cc. da diluição a 1:15 de acordo com a determinação da unidade anticomplementar.

(2) U. C. C. = unidade complementar corrigida (determinação feita no dia da reação).

(3) ++++ = ausência total de hemólise.

(4) H = hemólise completa.

QUADRO IV

Como essa foram feitas todas as reações, empregando-se sempre de cada espécime de soro duas quantidades diferentes, 0,1 e 0,2 cc., e controlando-se, naturalmente, cada grupo de reações pelos testemunhos necessários.

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

I

Para a verificação da especificidade da reação, realizada segundo a técnica atrás descrita, foi ela feita com os sôros de 46 cobaias, sendo 31 inoculadas e 15 normais, e o número total de reações praticadas foi de 73.

Das cobaias inoculadas, 16 tinham apresentado ou apresentavam no momento da reação o **T. Cruzi** no sangue periférico, podendo, pois, ser consideradas, sem dúvida alguma, como portadoras da tripanosomose americana experimental, e com os seus

sôros obtivemos reações positivas, à exceção de uma que deu uma reação duvidosa. A percentagem de positividade da reação de fixação do complemento foi, portanto, de 93,75 %. A maior parte dessas reações foi repetida, confirmando-se os resultados.

Das 31 cobaias inoculadas, as 15 restantes nunca haviam apresentadó o **T. cruzi** ao exame do sangue periférico, meio eficiente e fácil de se avaliar a infecção da cobaia; dessas 15, 14 deram um resultado negativo e, em uma, a reação foi positiva. Este caso poderia ser explicado por uma precocidade da reação, em relação ao achado do **T. cruzi** no sangue periférico da cobaia. A morte desta não nos permitiu continuar o seu exame sistemático, afim de se verificar se estava ou não infectada.

Com os soros das 15 cobaias normais, os resultados da reação de fixação do complemento com os antígenos 13, 14 e 15 foram todos negativos.

II

Em 12 das 15 cobaias inoculadas, cujos sôros deram reações nitidamente positivas, procurámos saber se houve uma preferência para o antígeno homólogo, isto é, o antígeno proveniente da mesma amostra com a qual elas haviam sido inoculadas. Analisando os resultados das reações dessas 12 cobaias, inoculadas com as amostras 14 e 15, em relação aos antígenos 13, 14 e 15, observámos o seguinte:

Com as cobaias inoculadas com a amostra 14, em 3 a reação foi mais intensa com o antígeno homólogo, 14, e em 1, a reação foi igualmente intensa com o antígeno 13 e com o 14.

Com as cobaias inoculadas com a amostra 15, obtivemos uma reação mais intensa com o antígeno 13, duas reações mais intensas com o 14, 3 igualmente intensas com os antígenos 13 e 14, e 1 igualmente intensa com os antígenos 14 e 15. Uma cobaia inoculada com esta amostra deu, numa primeira vez, uma reação mais intensa com o antígeno 13 e, numa segunda vez, com o antígeno 14.

Os resultados das reações realizadas com os sôros das cobaias inoculadas com a amostra 14 revelariam uma certa preferência para o antígeno homólogo, porém, com as cobaias inoculadas com a amostra 15, obtivemos justamente o contrário. Assim, concluímos não haver preferência, quanto à intensidade da positividade da reação, para o antígeno homólogo.

III

Pelo resultado das reações realizadas com os sôros das cobaias infetadas com as amostras 14 e 15 com os antígenos 13, 14 e 15, vemos a variabilidade do poder antigênico segundo as diferentes amostras, e ressalta, como o melhor antígeno, o preparado com a amostra 14, seguindo-se-lhe o da amostra 13 e, finalmente, o da 15, este de fracas propriedades antigênicas.

Com efeito, das 11 reações positivas feitas com os três antígenos, 13, 14 e 15, as percentagens de positividade respectivas de cada antígeno foram as seguintes:

Antígeno 14 = 11 sobre 11, ou 100 %.

Antígeno 13 = 9 sobre 11, ou 81,81 %.

Antígeno 15 = 2 sobre 11, ou 18,18 %.

Do cômputo acima eliminámos as reações duvidosas.

Como conclusão, podemos dizer que a reação de fixação de complemento com o antígeno de KELSER deve ser realizada somente no caso de se possuir uma amostra de **T. cruzi** de alto poder antigênico, e que, portanto, este deve sempre ser primeiro verificado.

IV

Em 24 reações positivas que praticámos, incluindo nesse número as repetições, os prazos decorridos da inoculação à reação foram, respectivamente, de 16, 21, 29, 29, 29, 33, 33, 36, 40, 42, 43, 49, 52, 57, 69, 76, 76, 76, 77, 79, 173, 193 e 197 dias.

A reação positiva mais precoce foi observada 16 dias após a inoculação, sendo que, nessa cobaia, os tripanosomas haviam aparecido pela 1.^a vez no sangue periférico, 15 dias depois da inoculação.

A reação positiva mais persistente foi observada 197 dias depois da inoculação, sendo de notar que, nesta cobaia, os tripanosomas não mais haviam sido encontrados no sangue periférico desde 123 dias antes do dia em que a reação foi realizada.

Podemos, pois, concluir pela precocidade do aparecimento dos anticorpos e sua persistência após o desaparecimento dos tripanosomas do sangue circulante.

Agradecemos ao Dr. Lucas de Assunção, 1.^o assistente e Chefe de Serviço do Instituto de Higiene, ao Dr. Dácio de Almeida Cristovão e a D.^a Odete Porto o auxílio que nos prestaram na feitura deste trabalho.

SUMÁRIO

O autor preparou antígeno para a reação de fixação de complemento, segundo a técnica de KELSER, partindo de culturas de 3 amostras de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Com esse antígeno o autor praticou 73 reações com o sêro de cobaias inoculadas com 4 amostras de *T. cruzi*, e com o sêro de cobaias normais. Chegou às seguintes conclusões: a) a reação é positiva nas cobaias portadoras de infecção experimental pelo *T. cruzi* e negativa nas que não o são; b) não há preferência, quanto à intensidade da positividade da reação, para o antígeno homólogo; c) o poder antigênico dos antígenos varia segundo as diferentes amostras que serviram à sua preparação; daí a necessidade do emprêgo unicamente de amostras de alto poder antigênico no preparo do antígeno destinado à reação da fixação do complemento; d) os anticorpos são de aparecimento precoce e persistentes mesmo após o desaparecimento dos tripanosomas do sangue circulante.

SUMMARY

The author prepared an antigen for complement fixation test, in accordance with the Kelsner technic, using for this purpose 3 strains of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. With the sera of guinea pigs, previously inoculated with 4 strains of *T. cruzi*, 73 tests were made and also normal guinea pig sera were used. Conclusions: a) the test was positive in guinea pigs with experimental infection and negative in normal animals; b) no preference was noted for homologous antigen, which could be measured by differences in test intensity; c) the different strains used in the test did not show the same degree of antigenic power; it is therefore important to employ only strains having high antigenic power; d) antibodies appear early and may persist until after the disappearance of trypanosomes in the circulating blood.

BIBLIOGRAFIA

- BONACCI, H. (1934) — “Nuevo medio de cultivo para el *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909”, Rev. d. Inst. bact., Buenos Aires 6: 242-247, mai. '34.
- CARDOSO, F. A. e ROSENFELD, G. (1940) — “Moléstia de Chagas no Estado de São Paulo, Rev. clin. S. Paulo 7: 155-173, '40.
- GUERREIRO, C. e MACHADO, A. (1913) — “Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico”. Brasil méd. 27: 225-226, 15 jun. '13.
- JOHNSON, C. M. e KELSER, R. A. (1937) — “The incidence of Chagas, disease in Panama as determined by the complement-fixation test”. Am J. Trop. Med. 17: 385-392, mai. '37.
- KELSER, R. A. (1936) — “A complement fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen”. Am. J. Trop. Med. 16: 405-415, jul. '36.
- LACORTE, J. G. (1926) — “A reação do desvio do complemento na moléstia de Chagas”. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 20: 197-210, '27.
- MAYER, M. e PIFANO, F. (1941) — “O diagnóstico da moléstia de Chagas por intra.dermorreação com cultura de *Schizotrypanum cruzi*”. Brasil méd. 55: 3-5, 3 mai. '41.
- PACKCHANIAN, A. (1940) — “Experimental production of agglutinins for *Trypanosoma cruzi*”. Pub. Health Rep. 55: 2.116-2.124, 15 nov. '40.
- PESSOA, S. B. e CARDOSO F. A. (1942) — “Nota sobre a imunidade cruzada na leishmaniose tegumentar e na moléstia de Chagas”. Hospital, Rio, 21: 187-193, fev. '42.
- VILLELA, E. e BICALHO, A. (1923) — “As pesquisas de laboratório no diagnóstico da moléstia de Chagas”. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 16: 13-29, '23.
-