

ANGELA CRISTINA VERISSIMO JUNQUEIRA

UM ESTUDO SOBRE O XENODIAGNÓSTICO, A HEMOCULTURA E A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 EM INDIVÍDUOS NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO CHAGÁSICA.

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

1996

Junqueira, Angela Cristina Verissimo

Um estudo sobre o xenodiagnóstico, a hemocultura e a reação em cadeia da polimerase na detecção do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 em indivíduos na fase crônica da infecção chagásica / Angela Cristina Verissimo Junqueira. - Belo Horizonte: UFMG/ICB, 1996.

ix, 189 p.: il

Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais. ICB

1. DOENÇA DE CHAGAS 2. *TRYPANOSOMA CRUZI* 3. XENODIAGNÓSTICO
4. HEMOCULTURA 5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) I. Título

ANGELA CRISTINA VERISSIMO JUNQUEIRA

UM ESTUDO SOBRE O XENODIAGNÓSTICO, A HEMOCULTURA E A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA DETECÇÃO DO *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 EM INDIVÍDUOS NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO CHAGÁSICA.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Parasitologia

Orientador: Dr. Egler Chiari

Co-orientador: Dr. Patrick Wincker

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

1996

Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Medicina Tropical e de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Contou com o apoio da Fundação Nacional de Saúde (FNS), através do Programa de Controle de Doenças Endêmicas do Nordeste (PCDEN); da Fundação Universidade Federal do Piauí (FuFPi); do Hospital Estadual Deolindo Couto do Município de Oeiras (Piauí); da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho aos meus pais, por tudo que semearam de bom, e cujo maior legado para os seus filhos foi: dignidade; luta e generosidade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Egler Chiari, pela total liberdade durante o desenvolvimento desta tese, fator decisivo ao meu amadurecimento profissional, e enorme compreensão na espera da parte escrita da mesma.

Ao Doutor Patrick Wincker, co-orientador, que, apesar do curto tempo de convivência, porém enriquecedor, iniciou-me nos caminhos desconhecidos da biologia molecular.

Ao Professor José Rodrigues Coura, exemplo de competência e de dignidade, que, através da sua determinação e acompanhamento do projeto, possibilitou realizar este trabalho nas condições precárias de uma área de campo.

Ao Doutor Carlos Médicis Morel que, junto com a sua equipe, possibilitou o processamento de todas as amostras pelo método da PCR no Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Endêmicas.

Ao Diretor do Instituto Oswaldo Cruz, Doutor Claudio Tadeu Daniel Ribeiro, que, através da sua administração eficiente e digna, determinou a agilização de grande parte da verba necessária à execução de todo o projeto.

Ao Doutor Fernando Correia Lima, Diretor do Hospital de Doenças Infecto-contagiosas (HDIC), por toda colaboração prestada em Teresina.

Aos Professores Marco Pezzi e Carlos Maurício de Figueiredo Antunes, coordenadores do Curso de Pós-graduação em Parasitologia, pelo apoio e respeito dispensados.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação em Parasitologia pelos ensinamentos. Em especial à Professora Norma Mello, sempre presente com palavras de incentivo nos momentos em que as mesmas tornavam-se imprescindíveis.

Aos Professores José Adail Fonseca de Castro e Francisco Itamar e à estudante de Biologia Izeneide Barros de Araújo, companheiros no exaustivo trabalho de campo, pelas ponderações e tranqüilidade nos momentos mais difíceis, comuns em situações improvisadas e encontradas neste "continente" chamado Brasil.

Às Biólogas Moleculares Constança Britto e Maria Angélica Cardoso, pelos ensinamentos iniciais que foram fundamentais para a execução e eficiência do protocolo da PCR. E aos estagiários André Santoro e Patrícia M. S. Carneiro, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do IOC, que muito auxiliaram na etapa da revelação do DNA amplificado.

Aos técnicos Antonio Edmilson Castro, Júlio César Miguel e Maria Cecília Galhardo pela eficiência na realização de todos os testes sorológicos.

Ao Estatístico Nelson Chagas que me socorreu na "enigmática" Estatística.

Às minhas companheiras de laboratório Neide Carrara Fernandes, Valéria dos Santos Celano, Laura Cristina Santos e Rose Kelly Aguiar pela colaboração no preparo do meio de cultivo e no exame das ninfas do xenodiagnóstico.

Ao meu irmão Cleber Verissimo Junqueira de quem recebi grande apoio, como também pela digitação de toda a tese e correção exaustiva da redação final da mesma, a você, meu irmão de sangue e amigo por opção, minha profunda gratidão.

À minha sempre amiga Maria Nilci Machado Pedroza, secretária do Departamento de Medicina Tropical, pela revisão bibliográfica e pelo constante apoio.

A Afonso da Costa Viana e a Orlando Carlos Magno, técnicos do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, que muito colaboraram na leitura das hemoculturas.

Ao Doutor Márcio Boia, amigo e colega no Departamento de Medicina Tropical do IOC, pelo incentivo recebido e pelos ensinamentos básicos para utilização do programa EPI-INFO.

Às Doutoradas Elza Segura e Vanize Macedo por terem me enviado gentilmente duas bibliografias imprescindíveis para a tese.

À Maria Cecília Costa que, muito amavelmente, durante o período no qual a biblioteca de Manguinhos esteve fechada, atendeu às minhas solicitações bibliográficas, existentes na BIREME, em São Paulo.

Aos guardas da antiga Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), atualmente Fundação Nacional de Saúde (FNS), que nos auxiliaram na visita às casas para coleta das amostras no trabalho de campo na Caatinga do Piauí.

À Maria José da Silva de Souza e ao José de Souza Nogueira, amigos de sempre, que se empenharam na manutenção da colônia de triatomíneos na minha ausência do laboratório.

À Sumara Aparecida Guilherme Ferreira, secretária do Curso de Pós-graduação em Parasitologia do ICB, pela atenção e gentileza dispensadas durante todo o curso.

Aos meus colegas de pós-graduação: Antonia; Antonio; Ester; Gil; Gilmara; Glória; Márcia; Margareth; Meriam; "Tim" e Vanessa pelo retorno à convivência estudantil, muito estimulante na minha revitalização profissional.

À Célia Quirino, companheira de moradia, pelo apoio e harmoniosa convivência durante o período em que estive em Belo Horizonte.

CAATINGA

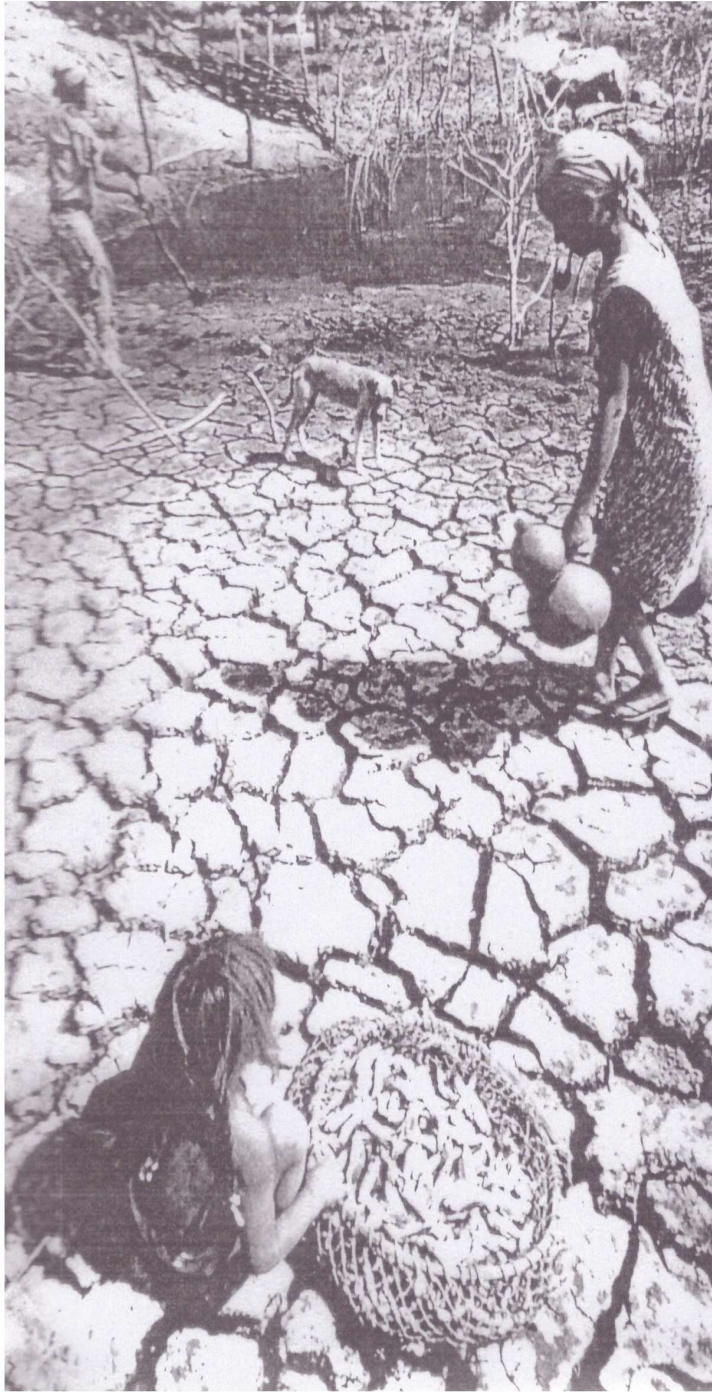


Foto reproduzida por Genilton José Vieira

Essa capacidade de renascer com a natureza é onde está o grande potencial do povo do sertão que, por descaso ou incompetência dos nossos representantes administrativos, não é devidamente valorizado e respeitado.

A esse povo sofrido, com quem convivi durante parte da realização desta tese, dedico estas palavras.

"... Essa natureza pouco clemente pode mudar profundamente mais rápido do que se pode imaginar. É indescritível a transformação do sertão após uma boa semana de chuva. É preciso ver o sertão, castigado pela seca, depois de algumas chuvas. A natureza inóspita torna-se, de um momento para outro, muito acolhedora. As relvas e as árvores reverdecem, o retorno dos pássaros traz aos habitantes a alegria de viver e o esquecimento imediato da seca inclemente ... "

FREI HERMÍNIO BEZERRA DE OLIVEIRA

In Formação Histórica da Religiosidade Popular no Nordeste - Tese de Mestrado pela Universidade Católica de Louvain. Edições Paulinas – São Paulo - 1985.

SUMÁRIO

1.	RESUMO.....	1
2.	INTRODUÇÃO.....	2
2.1.	JUSTIFICATIVA.....	58
3.	OBJETIVOS.....	59
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
4.1.	INDIVÍDUOS SELECIONADOS.....	60
4.1.1	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DO GRUPO DE INDIVÍDUOS.....	60
4.1.2.	ÁREA DE PROCEDÊNCIA DOS INDIVÍDUOS.....	60
4.1.3.	TAMANHO DA AMOSTRA.....	61
4.2.	TÉCNICAS EMPREGADAS NO DIAGNÓSTICO.....	61
4.2.1.	SOROLÓGICAS.....	61
4.2.2.	XENODIAGNÓSTICO.....	63
4.2.2.1	ESPÉCIE DE TRIATOMÍNEO EMPREGADA.....	63
4.2.2.2.	APLICAÇÃO DAS NINFAS.....	63
4.2.2.3.	QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA PELAS NINFAS....	63
4.2.2.4.	LEITURA DO XENODIAGNÓSTICO.....	64
4.2.3.	HEMOCULTURA.....	65
4.2.3.1.	MEIO DE CULTIVO.....	65
4.2.3.2.	PROCESSO DE CULTIVO.....	65
4.2.3.3.	PERÍODO E FORMA DE LEITURA.....	66
4.2.4.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	66
	Etapa A - COLETA DA AMOSTRA A SER AMPLIFICADA.....	67
	Etapa B - ISOLAMENTO DO DNA DO SANGUE COLETADO.....	67
	Etapa C - AMPLIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	68
	Etapa D - VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO.....	71
	Etapa E - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DA β -GLOBINA.....	73
	Etapa F - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DO <i>T. cruzi</i> PROVENIENTES DE XENODIAGNÓSTICOS POSITIVOS.....	73
4.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
4.3.1.	CÁLCULO DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS.....	75
4.3.2.	PROCEDIMENTO DE COLETA DA AMOSTRA.....	75
4.3.3.	TESTES ESTATÍSTICOS APLICADOS AOS RESULTADOS.....	75

5.	RESULTADOS.....	76
5.1.	TESTES SOROLÓGICOS.....	76
5.2.	XENODIAGNÓSTICO.....	76
5.2.1.	POSITIVIDADE GLOBAL.....	76
5.2.2.	POSITIVIDADE DAS NINFAS.....	77
5.2.3.	NÚMERO DE NINFAS ALIMENTADAS APÓS A APLICAÇÃO.....	78
5.2.4.	NÚMERO DE NINFAS EXAMINADAS.....	78
5.2.5.	QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA PELAS NINFAS.....	79
5.3.	HEMOCULTURA.....	80
5.3.1.	POSITIVIDADE GLOBAL.....	80
5.3.2.	POSITIVIDADE POR TUBO.....	80
5.3.3.	RELAÇÃO DA POSITIVIDADE COM O PERÍODO DO EXAME.....	80
5.4.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	81
5.5.	CRUZAMENTO DO RESULTADO DO XENODIAGNÓSTICO, DA HEMO- CULTURA E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	82
5.6.	TABELAS E GRÁFICOS.....	85
5.7.	FIGURAS.....	104
6.	DISCUSSÃO.....	114
7.	CONCLUSÕES.....	148
8.	SUMMARY.....	150
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
10.	ANEXO.....	172

1. RESUMO

A sensibilidade da hemocultura, do xenodiagnóstico e da reação em cadeia da polimerase (PCR) por amplificação do kDNA do *Trypanosoma cruzi* foi comparada em 101 pacientes com sorologia positiva para infecção chagásica crônica em uma área endêmica no Nordeste do Brasil. Empregando-se os 3 métodos, conseguimos detectar a presença do *T. cruzi* em 65 pacientes (64,3%), sendo a PCR positiva em 60 (59,4%), a hemocultura em 26 (25,7%) e o xenodiagnóstico em 36 (35,6%). Destes 65 casos, a PCR não comprovou positividade em apenas 5 dos pacientes, que apresentaram xenodiagnóstico e/ou hemocultura positivos, quatro destes foram estudados em detalhes. As discrepâncias não foram devidas à inibição da reação da PCR, uma vez que nessas amostras conseguiu-se amplificar a seqüência humana da β -globina e também não foram devidas à variação da seqüência do kDNA, porque as cepas de *T. cruzi* isoladas por xenodiagnóstico daqueles pacientes foram amplificadas pela PCR. Conclui-se que nenhum parasita estava presente nos 5 ml de sangue colhidos para a PCR naqueles casos, enquanto pelo menos um parasita estava presente nos 3 ml de sangue (em média) ingeridos pelos insetos no xenodiagnóstico. Isto sugere que a quantidade de sangue colhida para a PCR é importante em pacientes com baixa parasitemia. Finalmente, em nossa experiência, a PCR foi mais sensível que o xenodiagnóstico e este mais sensível que a hemocultura no diagnóstico da infecção chagásica crônica. Verificamos a necessidade de experimentos com a finalidade de determinar o volume ideal de sangue a ser coletado pela PCR.

2. INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 é um protozoário pertencente a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, que desenvolve o seu ciclo evolutivo em dois hospedeiros: um vertebrado e o outro invertebrado, onde assume diferentes formas evolutivas (HOARE, 1972). Esta espécie de protozoário, assim como outros kinetoplastidas, contém uma organela característica, chamada cinetoplasto (*kinetoplast*). O DNA contido nesta organela, ou kDNA, constitui-se de moléculas organizadas em forma de maxicírculos e minicírculos, cuja função parece ser codificar RNA ribossomais e proteínas envolvidas na transdução da energia na mitocôndria (SIMPSON, 1987) e codificar RNAs "guia" necessários para a edição de RNAs mitocondriais (STURM & SIMPSON, 1990).

Entre os hospedeiros do *T. cruzi* está o homem, no qual ele desenvolve uma infecção cuja resultante é a doença de Chagas. Esta infecção é autóctone nas Américas, onde cerca de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas (MONCAYO, 1993). Em determinadas regiões da América Latina, a doença se apresenta com significativa importância, tanto pela alta prevalência como pela gravidade de algumas formas clínicas; previu-se que 90 milhões de pessoas estariam sobre risco das infecções (WHO, 1989). No Brasil, cerca de 5 milhões de indivíduos estão infectados, existindo uma estimativa de 20.000 novos casos por ano, segundo Schofield (DIAS, 1992; SCHOFIELD, 1992). Apesar de a maioria dos casos de infecção humana ter sido adquirida através da transmissão vetorial, um dos mecanismos para o aumento da prevalência tem sido a transmissão sangüínea. Esta nova problemática é decorrente da associação de 2 fatores: aumento do fluxo migratório de indivíduos infectados provenientes de áreas endêmicas da infecção chagásica para os grandes centros urbanos, que servem como doadores; e da falta de uma rigorosa triagem sorológica dos setores de hemoterapia existentes nesses centros (SCHMUÑIS, 1991).

Considerações Gerais Sobre os Procedimentos de Diagnóstico

A infecção pelo *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado, especificamente o homem, apresenta duas fases. A fase inicial ou fase aguda, caracterizada pela relativa facilidade com que se evidencia o parasita no sangue periférico e pelas manifestações clínicas gerais contemporâneas dos sinais de porta de entrada do parasita. Em contraste, na fase seguinte, ou

fase crônica, ocorre diminuição do número de parasitas na corrente sanguínea, sendo por isso difícil seu encontro no exame direto. Neste caso, utilizam-se exames indiretos e de enriquecimento para a sua detecção. Na fase crônica ocorre, ainda, um período de latência clínica, na maioria dos casos, cujas manifestações podem aparecer anos após a infecção (PRATA, 1968).

Em relação ao diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, ele pode ser dividido, didaticamente, em 3 categorias: sorológicos, parasitológicos e moleculares.

Os testes sorológicos têm como princípio metodológico a ligação antígeno (Ag) - anticorpo (Ac), cuja união pode ser revelada por vários procedimentos técnicos. A grande maioria destes testes utilizados na rotina se baseiam na pesquisa de Acs no soro, sendo menos usual a detecção de Ag. Seu emprego no diagnóstico da infecção chagásica é bem abrangente, o que se deve em grande parte a sua facilidade, rapidez de execução e custos relativamente baixos em relação a outros métodos, sendo o método de escolha nas triagens de doadores de sangue e nos inquéritos epidemiológicos.

Um dos estudos pioneiros que relatam a identificação de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro através de reação do complemento foi o de GUERREIRO & MACHADO (1913). Os autores, empregando como antígeno extratos parasitários obtidos do baço de cães jovens infectados experimentalmente, conseguiram detectar anticorpos anti-*T. cruzi* em 68 (66,6%) dos 102 ensaios praticados com soros de doentes de diversas formas da doença. A partir deste trabalho, surgiram uma série de outros com o objetivo de aprimorar a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* em material biológico. Em uma revisão realizada por FERREIRA (1992), são relatados os seguintes testes sorológicos até o momento empregados no diagnóstico do *T. cruzi*: fixação do complemento; precipitação; floculação; aglutinação; imunofluorescência e ensaios imunoenzimáticos. Dentre os citados, os três últimos têm sido, atualmente, os testes de escolha para a detecção de anticorpos.

Os testes sorológicos, apesar de largamente difundidos no diagnóstico da infecção chagásica, apresentam alguns problemas a nível de reprodutibilidade, de especificidade e de sensibilidade. O primeiro deles é decorrente da falta de padronização dos reagentes e de um correto procedimento técnico, acarretando resultados discrepantes entre os laboratórios. PRATA *et alii* (1975), ao compararem os resultados da reação de fixação de complemento em 3 laboratórios, observaram divergências entre os 3: 15% dos soros tinham reações divergentes entre o 2º e 3º laboratório; 22% entre o 1º e o 3º e 29% entre o 1º e o 2º. A maneira de resolver tais situações tem sido a standardização das técnicas.

Normalmente, o perfil de anticorpos séricos contra componentes estruturais do *T. cruzi* é caracterizado pela presença de títulos detectáveis de imunoglobulinas M (anticorpos IgM) no início da infecção (CAMARGO & AMATO NETO, 1974), que tendem a desaparecer progressivamente à medida que são substituídos por outra classe de anticorpos, as imunoglobulinas G (IgG), que permanecem na grande maioria dos casos por toda a vida (CAMARGO, 1992). Ocasionalmente, pode se verificar flutuações nos títulos de anticorpos na fase crônica, determinando resultados transitoriamente negativos (RASSI *et alii*, 1969), e casos de indivíduos sorologicamente negativos porém parasitologicamente positivos (LUQUETTI, 1987; PLESS *et alii*, 1992). Na maioria dos casos, essa limitação de sensibilidade, bem como a de especificidade, dos testes sorológicos está condicionada ao tipo de antígeno utilizado na reação. Quando se empregam antígenos totais como extratos ou formas de *T. cruzi*, que representam uma complexa heterogeneidade antigênica, é comum o aparecimento de resultados falsos positivos, resultantes da presença de antígenos comuns a outros trypanosomatídeos, particularmente *Leishmania sp* (CAMARGO & REBONATO, 1969) e *T. rangeli* (GUHL & MARINKELLE, 1982). Para evitar a reação cruzada, tem-se procurado empregar frações antigênicas bem definidas, imunodominantes e de máxima especificidade, que podem ser obtidas por vários procedimentos técnicos. Entre os procedimentos desenvolvidos está a obtenção de antígenos purificados através de cromatografia de gel-filtração, de trocas iônicas ou de afinidade com lectinas ou anticorpos monoclonais, esses, porém, se mostraram insatisfatórios quanto a reprodutibilidade e obtenção de grandes quantidades para o uso em larga escala (ARAÚJO, 1992; CAMARGO, 1992). Uma outra forma de isolamento de frações antigênicas tem sido realizada através da tecnologia da biologia molecular (FRASCH & REYES, 1990), que se baseia na inserção em vetores (fagos ou plasmídeos) de gens que codificam uma fração antigênica do parasita e que serão expressos após introduzidos em uma bactéria ou levedura. Acrescentando-se a estas tecnologias, recentemente vem-se pesquisando a reatividade de peptídeos sintéticos, derivados de seqüências repetidas de aminoácidos encontrados em antígenos recombinantes, na detecção de anticorpos anti *T. cruzi* (VERGARA *et alii*, 1992). Todas estas frações antigênicas, desenvolvidas por diferentes tecnologias, tiveram a sua utilização restrita ao ciclo fechado dos centros de pesquisa que na grande maioria determinou a sensibilidade e especificidade destas frações em amostras de soro provavelmente não representativas das diversas regiões endêmicas da América Latina e Central. Com o objetivo de avaliar a reatividade dos antígenos caracterizados por diversos laboratórios frente a uma série de soros codificados de pacientes chagásicos e não chagásicos, MONCAYO & LUQUETTI (1990) coordenaram um estudo com

apoio OMS, envolvendo 9 laboratórios situados na Argentina, Brasil, Colômbia e Estados Unidos da América. Eles verificaram que 11 antígenos tiveram altas taxas de sensibilidade e especificidade, sendo as taxas de sensibilidade um pouco mais baixas que a especificidade, com exceção da fração AgA4. Provavelmente esta diferença seja decorrente da variação antigênica encontrada nas populações de *T. cruzi* circulantes (ARAÚJO, 1992).

Os testes sorológicos convencionais também demonstram limitações no acompanhamento de indivíduos tratados na fase crônica da infecção, uma vez que verificou-se títulos de anticorpos em situações onde uma "aparente" cura parasitológica existiria (RASSI & LUQUETTI, 1992). Métodos especiais, como a Lise Mediada pelo Complemento (LMCo ou *Complement-Mediated Lysis* = CoML), têm sido empregados no monitoramento de cura (KRETTLI & BRENER, 1982), porém apresentam dificuldade de serem adotados na rotina laboratorial, uma vez que exige o manuseio com formas tripomastigotas vivas. Em um trabalho mais recente, KRAUTZ *et alii* (1992), empregando antígeno de superfície liberado por tripomastigotas em meio de cultura (AgShed) no ensaio imunoenzimático, demonstraram que este procedimento pode substituir a reação de LMCo no acompanhamento de pacientes tratados.

Mesmo com todo o avanço ocorrido desde o primeiro trabalho de GUERREIRO & MACHADO (1913) no diagnóstico sorológico da infecção chagásica, ainda se faz necessário o emprego de um ou mais métodos de diagnóstico nos casos em que o resultado sorológico se apresenta duvidoso; ou positivo, em caso de suspeita de reação cruzada; ou negativo, porém com quadro clínico indicativo de doença de Chagas. Nestas situações, o teste confirmatório ideal é aquele que demonstra fragmentos ou o próprio parasita no material clínico (ARAÚJO, 1992). Os métodos de detecção do parasita, ao contrário das técnicas de detecção de anticorpos, permitem também estabelecer o grau de parasitemia no hospedeiro vertebrado; e, ao demonstrar o agente causal, torna possível o monitoramento dos ensaios terapêuticos. Um exemplo disto foi o trabalho SCHENONE *et alii* (1970) que, ao tratar um grupo de pacientes com derivado nitrofurfurilidínico, não conseguiu presenciar o parasita existente anteriormente ao tratamento, em contrapartida, níveis perceptíveis de Acs continuavam existindo.

Um método alternativo para a detecção direta do parasita tem sido a pesquisa de frações antigênicas do *T. cruzi* nos fluídos corporais, seja na forma livre ou de complexos imunes circulantes. Alguns pesquisadores vêm investigando a presença de antígenos solúveis de *T. cruzi* no soro e na urina de hospedeiro (FERREIRA, 1992). Dois trabalhos recentes relataram esta forma de investigação, o de PETRAY *et alii* (1992) e UMEZAWA *et alii*

(1993). No primeiro, os autores, ao pesquisarem a presença de antígenos (CAg) e complexos imunes circulantes (CIC) em 74 amostras de soro de pacientes com anticorpos anti-*T. cruzi*, conseguiram detectar CAg e CIC em, respectivamente, 49 (66,21%) e 43 (58,11%); e em 2 casos sorologicamente não reativos, se detectou inespecificamente CIC e CAg. Na outra investigação, UMEZAWA *et alii* (1993), ao incubarem amostras de urina de 60 pacientes na fase crônica da doença de Chagas com soro anti-H49, observaram que 60 % das amostras apresentavam antígeno específico de 150 - 160 kDa. Os dois trabalhos confirmaram a infecção em cerca de 60% dos indivíduos, o que demonstrou uma baixa sensibilidade em relação a pesquisa de anticorpos.

A outra linha de procedimentos adotada para a detecção do *T. cruzi* é a dos métodos parasitológicos. Eles se baseiam na demonstração do parasita, sob a forma de tripanossoma, no sangue e outros líquidos orgânicos ou então sob a forma de "leishmânia" (amastigota) nos tecidos (SIQUEIRA, 1968). Conforme o procedimento seguido para a detecção do *T. cruzi*, esses métodos são classificados em diretos e indiretos.

Os métodos parasitológicos diretos são empregados nos casos agudos ou de reativação da infecção (imunossupressão), quando há um grande número de parasitas circulantes no organismo hospedeiro. Entre os métodos diretos estão: o exame ao microscópio do sangue a fresco e do esfregaço corado de sangue. Menos usualmente costuma-se fazer a pesquisa em outro fluido biológico como, por exemplo, o líquido. Também dentro desta classificação se encontram os processos de concentração do parasita, que têm a peculiaridade de aumentar a sensibilidade da pesquisa, como o exame da gota espessa, onde duas a três gotas de sangue são colocadas sobre uma lâmina, que após secagem passa por um processo de coloração antes do exame microscópico (FREITAS, 1952) . Outros métodos de concentração são realizados, como os que empregam a centrifugação do sangue, entre estes se destacam o de Strout e o do microhematócrito. No método de Strout, deixa-se o sangue coagular para obtenção do soro, que é centrifugado em rotação lenta e seu sedimento pesquisado (STROUT, 1962; FLORES *et alii*, 1966). No segundo, o sangue é colhido através de tubo capilar, centrifugado e a seguir examinada a camada leucocitária ao microscópio (WOO, 1971; FEILIJ *et alii*, 1983). Mais recentemente, AMATO NETO *et alii* (1996) têm investigado o valor do sistema *Quantitative Buffy Coat* na detecção do *T. cruzi* em animais experimentalmente infectados, obtendo resultados animadores.

Os métodos parasitológicos indiretos, ou de enriquecimento, costumam ser usados na fase crônica da infecção, onde a pobreza de formas tripomastigotas no sangue periférico torna difícil sua demonstração diretamente no líquido biológico. Essa detecção pode

ser realizada por 3 procedimentos: inoculação em animais de laboratório, xenodiagnóstico e hemocultura.

A inoculação em animais, dos 3 métodos anteriormente relatados, é o menos usualmente empregado no diagnóstico da infecção chagásica (CHIARI, 1992), sendo mais utilizado nos estudos de patogenicidade das populações ou clones de *T. cruzi*. Isto provavelmente se deva a baixa eficácia do método como demonstrado por FREITAS (1947) e PIFANO (1960) em dois estudos distintos. FREITAS (1947), por exemplo ao inocular 238 camundongos, um grupo com sangue total citratado ou desfibrinado e o outro grupo com sedimento de sangue citratado, ambos coletados de 38 indivíduos com fixação do complemento ou xenodiagnóstico positivo, conseguiu através da inoculação comprovar em apenas 4 destes indivíduos a presença do *T. cruzi*. Também PIFANO (1960) não conseguiu melhores resultados quando selecionou 40 indivíduos na fase crônica da doença de Chagas e de cada um retirou sangue para inocular em igual número de cães jovens e cobaias. O autor só encontrou parasitemia em 5 cães dos 40 e em nenhuma das 40 cobaias inoculadas. A falta de praticidade contribuiu para a pouca utilização dessa forma de diagnóstico, principalmente em levantamentos epidemiológicos, onde o transporte de um grande número de animais vivos é inviável, pois requer uma mão-de-obra significativa, além de cuidados especiais com os mesmos.

XENODIAGNÓSTICO

O xenodiagnóstico é o processo indireto de demonstração do parasito mais largamente usado na detecção do *T. cruzi* nos casos crônicos da doença de Chagas e, conseqüentemente, um dos mais relatados na literatura. O xenodiagnóstico pode ser direto (tradicional - *in vivo*) ou indireto (artificial - *in vitro*). No xenodiagnóstico direto, triatomíneos são acondicionados em pequenas caixas e essas colocadas diretamente sobre a pele do indivíduo ou outro hospedeiro; enquanto que no xenodiagnóstico indireto, os triatomíneos ingerem o sangue (coletado previamente) do indivíduo ou de outro hospedeiro vertebrado por meio de "mamadeira" ou frascos apropriados de modelos diversos, que são revestidos com uma fina membrana natural ou artificial que permite o contato da peça bucal do inseto com o sangue contido no frasco. Passadas algumas semanas após alimentação, em ambos os procedimentos, os triatomíneos são examinados por compressão abdominal ou por dissecação de tubo digestivo (SIQUEIRA, 1968). Na forma indireta o sangue requer um aquecimento, pois verificou-se que o termotropismo é um dos fatores que influenciam a atração para a

picada e conseqüentemente a ingestão de sangue pelo vetor (NICOLLE & LWOFF, 1944). A técnica do xenodiagnóstico indireto tem a grande vantagem de ser menos traumática que a do xenodiagnóstico tradicional, além de impedir reações cutâneas provocadas pela saliva do triatomíneo (SILVA, 1958; SALGADO *et alii*, 1963; MOTT *et alii.*, 1980)

A técnica de xenodiagnóstico foi introduzida por BRUMPT em 1914, que, ao estudar a evolução de protozoários de peixes, verificou que sanguessugas passavam a apresentar uma quantidade abundante de *trypanosoma* quando se alimentavam em peixes onde não se havia detectado nenhum protozoário através do exame direto. Com essa descoberta, BRUMPT idealizou o xenodiagnóstico que seria o "diagnóstico por meio de hóspede" (BRUMPT, 1914). Nesta linha de investigação, ele sugeriu a possibilidade de se utilizarem ninfas de triatomíneos para se detectar o agente etiológico da doença de Chagas em hospedeiros suspeitos de portarem o protozoário.

Inicialmente, o xenodiagnóstico foi recebido com um certo ceticismo, como relatado por FREITAS (1947). Os pioneiros, no Brasil, na utilização da técnica e na demonstração do seu valor no diagnóstico das formas crônicas da moléstia de Chagas foram TORRES (1915) e DIAS (1935) e, na Venezuela, TORREALBA (1934). Na investigação realizada por TORRES (1915) em 4 indivíduos, 3 cães e 2 gatos submetidos à alimentação com ninfas de *Triatoma megista* (*Panstrongylus megistus*), foi possível detectar em 2 indivíduos e 1 gato a presença de *T. cruzi*. A partir de então, uma série de outros pesquisadores introduziram em suas investigações o xenodiagnóstico e, até a época atual, ele vem sendo empregado na detecção e isolamento do *T. cruzi* no homem e em reservatórios, por representar um procedimento técnico de simples execução, apesar da infra-estrutura necessária à obtenção dos exemplares de triatomíneos a serem aplicados.

Demonstrou-se, ao longo desses anos de uso do xenodiagnóstico tradicional *in vivo*, que a técnica pode apresentar resultados variáveis de sensibilidade, decorrentes tanto da diferença de susceptibilidade entre as espécies vetoradas empregadas no exame frente às populações de parasita das espécies vetoradas empregadas no exame, como do procedimento metodológico adotado e de características intrínsecas do hospedeiro investigado (URRIBARRÍ, 1970; CERISOLA *et alii*, 1974; SALGADO, 1976; ZELEDON, 1976; MINTER *et alii*, 1978, CAMARGO & TAKEDA, 1979 e CASTRO *et alii*, 1983).

Destacaremos, a seguir, os pontos mais relevantes nos protocolos de xenodiagnóstico que geram as variações de sensibilidade:

A) ESPÉCIE DE TRIATOMÍNEO APLICADA

Em relação a este parâmetro, não existe um consenso de qual ou quais espécie(s) vetora(s) que deva(m) ser empregada(s) no xenodiagnóstico. Contudo, relataremos as principais investigações desenvolvidas neste sentido, a fim de estabelecermos um critério de escolha para usarmos no protocolo.

Os estudos iniciais de DIAS (1940a, b, c) indicaram que a espécie de triatomíneo transmissora mais importante na região de origem do indivíduo ou hospedeiro a ser submetido ao xenodiagnóstico tinha importância na sua sensibilidade. Ele se baseou, para isso, em vários experimentos. Em um deles (DIAS, 1940c), o pesquisador, ao infectar cães com *T. cruzi* de origem venezuelana e aplicar neles uma série de xenodiagnósticos utilizando *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus*, verificou uma maior positividade do *R. prolixus*, principal espécie vetora na Venezuela. Com uma amostra brasileira de *S. cruzi* (*T. cruzi*), foram inversos os resultados obtidos infectando-se o *P. megistus* e o *T. infestans* em percentagens significativamente maiores do que o *R. prolixus* (DIAS, 1940a). FLOCH & LAJUDIE (1945), assim como DIAS (1940a, b, c), reforçaram a idéia de que o parasita se desenvolveria melhor na espécie de triatomíneo vetora na região onde o mesmo foi isolado. Entretanto, eles demonstraram que, além da regionalidade, o triatomíneo teria que mostrar-se vetorialmente importante na transmissão do *T. cruzi*. A hipótese de DIAS (1940a, b, c) foi também endossada pelos dados de RYCKMAN (1965), que demonstrou que o *Triatoma proctrata*, espécie vetora de origem norte-americana, ao se infectar com uma cepa do *T. cruzi* originária desta mesma região geográfica, apresentou maior densidade de formas metacíclicas do que a espécie *T. infestans*, originária da América do Sul, infectada paralelamente com a mesma cepa. O resultado foi oposto quando as cepas de *T. cruzi*, inoculadas nos animais que serviram para repasto infectante, eram de origem sul-americana, a mesma do *T. infestans*. O parâmetro da densidade de formas metacíclicas utilizado por RYCKMAN (1965) pode não ter sido o adequado, uma vez que PERLOWAGORA-SZUMLEWCZ & MOREIRA (1994) demonstraram que algumas espécies vetorais apresentam uma alta densidade parasitária, porém produzem poucas formas metacíclicas. LITTLE *et alii* (1966), ao realizarem um estudo comparativo de susceptibilidade entre o *Triatoma barberi* e o *T. infestans* frente a cinco diferentes cepas de *T. cruzi* isoladas de vetores capturados no México, demonstraram taxas mais altas de infecção nos exemplares de *T. barberi*, espécie vetora nativa daquele país, do que nos de *T. infestans*, espécie ainda não relatada na região. No Panamá, SOUZA (1971), ao realizar o xenodiagnóstico em pacientes

provenientes desse país, com as duas espécies locais *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius pallescens*, mostrou que estas foram mais sensíveis para detectar o *T. cruzi* que o *T. infestans*, a outra espécie aplicada em paralelo. CERISOLA *et alii* (1971), na Argentina, ao compararem a sensibilidade de detecção do *T. cruzi* das espécies: *T. infestans*, *Triatoma pallidipennis*, *P. prolixus*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus herreri*, *R. prolixus zeledon* e *R. pallescens*, em 3 pacientes na fase crônica, conseguiram os melhores resultados com *T. infestans*, importante espécie vetora no país. Investigando o grau de susceptibilidade de grupos de exemplares de *R. prolixus* frente a duas cepas, uma isolada na Venezuela e outra no Brasil, URDANETA-MORALES & RUEDA (1977) obtiveram uma densidade parasitária maior e eliminação mais precoce e representativa de formas tripomastigotas metacíclicas nas fezes do grupo de *R. prolixus* infectados com a cepa de origem venezuelana, a mesma de onde provieram os exemplares deste triatomíneo. MINTER *et alii* (1978), ao realizarem xenodiagnósticos empregando as espécies *P. megistus*, *T. infestans* e *R. prolixus*, em 29 pacientes com doença de Chagas e 6 gambás naturalmente infectados, provenientes de uma área endêmica do Estado da Bahia (Brasil), onde o *P. megistus* era o vetor domiciliar local, encontraram uma superioridade na taxa de detecção do *T. cruzi* com o *P. megistus* do que com as outras duas espécies, *R. prolixus* e *T. infestans*. Todavia, o *T. infestans* foi mais efetivo para detectar o parasita em um macaco Rhesus infectado experimentalmente com a cepa Peru, isolada de uma região onde esta espécie tem importante papel vetorial.

Nem sempre a maior taxa de positividade das ninfas empregadas em xenodiagnósticos realizados em animais experimentalmente infectados ou em pacientes com a infecção crônica mostrou ter relação com o emprego de espécies triatomínicas de origem regional comum à cepa de *T. cruzi* inoculada ou do paciente submetido ao exame. ZELEDÓN & VIETO (1957), ao investigarem a susceptibilidade do *T. dimidiata*, *T. infestans*, *Triatoma phyllosoma*, *R. prolixus* e *R. pallescens* a uma cepa costarriquenha de *T. cruzi*, isolada de um exemplar capturado de *T. dimidiata*, expressivo vetor na Costa Rica, encontraram percentagem menor de infecção nas ninfas desta espécie local do que nas outras quatro testadas comparativamente. Em um estudo comparativo realizado entre *R. prolixus* e o *T. pallidipennis* em provas de xenodiagnóstico praticadas em 219 casos crônicos na Venezuela, PIFANO *et alii* (1973) comprovaram que a espécie que ingeriu maior quantidade de sangue durante a aplicação, *T. pallidipennis*, foi positiva em um número maior de pacientes, 77 casos (35,15%), do que a espécie transmissora local, *R. prolixus*, que comprovou a infecção em apenas 58 casos (26,48%). Com estes dados, os autores concluíram que o mais importante fator que condiciona a positividade do xenodiagnóstico é a quantidade de sangue sugado. Isto nem

sempre reproduziu-se; no trabalho de CERISOLA *et alii* (1974), anteriormente descrito, o *T. infestans* foi uma das espécies que menos ingeriu sangue e, no entanto, apresentou a maior positividade, ao contrário do *T. dimidiata* que, apesar de ingerir a maior quantidade, não conseguiu detectar um parasita. Valendo a pena ressaltar que a casuística de CERISOLA *et alii* (1974) foi composta de um pequeno número de exemplares, apenas 40 ninfas de cada espécie num total de 3 xenodiagnósticos praticados.

Uma outra série de trabalhos foram realizados no sentido de testar o valor de uma espécie originária do México, o *D. maximus* (corretamente denominado *D. maxima*) em xenodiagnósticos. CUBA-CUBA *et alii* (1978) elaboraram uma série de 38 xenodiagnósticos aplicados em igual número de pacientes crônicos com o objetivo de comparar o grau de infecção das ninfas de I e III estágio de *D. maxima* em relação as ninfas de III estágio de *T. infestans*. Eles conseguiram mostrar que 10 ninfas de *D. maxima* (III) além de diagnosticarem um número um pouco maior de pacientes, que 40 ninfas de *T. infestans*, respectivamente, 25 (65,7%) e 23 (60,5%), foram mais expressivas em adquirir a infecção. Cerca de 36% das ninfas de *D. maxima* tiveram infecção e apenas 10% das de *T. infestans* apresentaram *T. cruzi*. Em outros experimentos, BARRETO *et alii* (1978), testando a susceptibilidade do *D. maxima* no IV e V estágio ninfal à infecção por 3 cepas sul-americanas de *T. cruzi*, conseguiram que praticamente todos os exemplares se infectassem, ocorrendo apenas exceção com a cepa Mambaí. Neste mesmo trabalho ficou demonstrado que tanto exemplares de *D. maxima* como os de *T. infestans*, ambos no IV e V estágio, foram capazes de detectar a infecção no mesmo número de pacientes, sendo que os xenodiagnósticos aplicados com a primeira espécie apresentaram mais ninfas positivas que com a segunda. Em um grupo mais expressivo de pacientes na fase crônica da infecção, exatamente 50 indivíduos com xenodiagnóstico prévio positivo e mais outros 50 com apenas a sorologia positiva, MARSDEN *et alii* (1979) resolveram verificar a eficiência das ninfas no I estágio de *D. maxima* na rotina do xenodiagnóstico. Eles empregaram 40 ninfas de *D. maxima* e comparativamente mais 40 ninfas de *T. infestans* no III estágio. Os resultados mostraram uma taxa de positividade de, respectivamente, 70% (35 em 50) e 66% (33 em 50) para *D. maxima* e *T. infestans* no primeiro grupo, com xenodiagnóstico prévio positivo, e 44% (22 em 50) para as duas espécies no segundo grupo, com 3 reações sorológicas positivas. Dando seqüência as investigações, CUBA-CUBA *et alii* (1979), ao submeterem 200 pacientes positivos, em 3 reações sorológicas, a xenodiagnósticos com ninfas de I e III estágio de *D. maxima* e no III estágio de *T. infestans*, mais uma vez comprovaram a eficiência da primeira espécie sobre a segunda. Eles também comprovaram que 10 ninfas de *D. maxima* no I estágio detectaram mais

pacientes que 10 ninfas no III estágio de *T. infestans*, sendo no entanto menos sensível que 10 ninfas de *D. maxima* no III estágio. Complementando com os dados de ALVARENGA & BRONFEN (1984), que submeteram as espécies *T. infestans*, *P. megistus* e *D. maxima* frente à infecção com duas diferentes cepas (Y e Cl) de *T. cruzi* e empregando como parâmetros a diferenciação e a multiplicação do parasita no tubo digestivo dos insetos, pode-se reforçar a indicação do *D. maxima* para o xenodiagnóstico. Nesta investigação o *P. megistus* mostrou-se também um bom vetor, com ele conseguiu-se manter um maior grupo de exemplares infectado com a cepa Y aos 60 dias do que com as outras duas espécies de triatomíneos (*T. infestans* e *P. megistus*).

Na linha de investigação da busca de uma espécie de triatomíneo adequada para ser empregada nos protocolos de xenodiagnóstico, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MULLER (1982, 1987), PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ *et alii* (1988, 1990) investigaram o comportamento de onze espécies vetoras no IV estágio ninfal (*P. megistus*, *Rhodnius neglectus*, *R. prolixus*, *Triatoma sordida*, *Triatoma pseudomaculata*, *T. infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *T. dimidiata*, *Triatoma rubrovaria*, *Triatoma pessoai*, *Triatoma vitticeps*) frente à infecção a sete diferentes cepas ou isolados de *T. cruzi* (Berenice, Cl, Y, Fl, São Felipe, Gávea, Colombiana). Estas cepas que foram inoculadas experimentalmente em cobaias haviam sido isoladas de diferentes regiões no Brasil, com exceção da cepa Colombiana (originária de uma região da Colômbia). Após esses quatro trabalhos, o grupo de investigadores verificou que, das 11 espécies vetoras testadas, 3 delas mostraram-se boas candidatas ao xenodiagnóstico, sendo estas *P. megistus*, *T. rubrovaria* e *T. vitticeps*. Os dados obtidos tendem a apoiar a hipótese de que os parâmetros: prevalência; intensidade e persistência da infecção estariam ligados ao tipo de biótopo de origem do triatomíneo, uma vez que vetores classificados como domésticos (ex. *T. infestans*) mostraram resultados inferiores aos triatomíneos enquadrados como silvestres ou selvagens, em relação aos parâmetros anteriores, o que não confirma a experiência dos autores que acreditam ser as espécies vetoras locais as que apresentam melhores resultados de positividade. Os autores justificam a não inclusão da espécie *D. maxima* neste grande estudo, por terem tido dificuldade em adaptar a espécie em seu laboratório de criação. O mesmo problema temos tido em adaptar esta espécie em nosso laboratório. Os exemplares, geralmente, nascem com má formação; por isso, são eliminados, dificultando o aumento da criação.

Bem menos abordado que o parâmetro susceptibilidade, a problemática da criação parece ser um outro ponto importante a ser considerado na escolha de uma ou mais espécies de triatomíneos para o xenodiagnóstico em larga escala. Também, a característica de

resistência a variações ambientais de temperatura e umidade, bem como a sobrevivência a condições adversas de transporte a longas distâncias, normalmente comuns em levantamentos realizados longe do laboratório de procedência dos exemplares que foram utilizados no xenodiagnóstico, devem ser ponderadas no momento da escolha de uma espécie vetora. Porém, esses pontos não são normalmente considerados e conseqüentemente não abordados, merecendo com isso mais investigações.

B) NÚMERO DE TRIATOMÍNEOS APLICADOS E REPETIÇÃO DO XENODIAGNÓSTICO

O rendimento do xenodiagnóstico pode ser elevado se aumentarmos o número de ninfas aplicadas ou promovermos a repetição do exame, havendo, no entanto, um limiar estabelecido pela própria parasitemia do indivíduo, independente no caso da quantidade de triatomíneos aplicados. Isto foi objetivamente demonstrado por MAEKELT & ALCAÑIZ (1960) ao acompanharem o curso da infecção de um cão, experimentalmente infectado, fazendo com que ninfas de *R. prolixus* alimentassem sobre este em diferentes períodos. Durante o acompanhamento ficou caracterizada, à medida que a infecção transcorria para a fase crônica, a capacidade de detecção do parasita através do xenodiagnóstico ia decaindo. Entretanto, ao aumentarem o número de exemplares aplicados e as repetições do exame (xenodiagnósticos sucessivos), os autores conseguiram elevar a sensibilidade do método, chegando-se a obter com 10 e 20 exemplares aplicados a cada exame, respectivamente, 40% e 94% de detecção. Esta alteração tanto no número de exemplares como no de exames possibilitou que o parasita existente em baixa concentração pudesse ser captado.

Inicialmente utilizava-se um pequeno número de exemplares em cada aplicação, geralmente em torno de 12 (TORRES, 1915; TORREALBA, 1934; DIAS, 1936; PIFANO, 1960 e SOTO & SOTO, 1968). Foi então que SCHENONE *et alii* (1968) resolveram verificar qual o número mínimo de exemplares a serem empregados em um xenodiagnóstico, que promoveria um resultado representativo de positividade em pacientes crônicos. O método de estudo consistiu em utilizar pequenas caixas de madeira para acondicionar as ninfas (modelo por eles idealizado), contendo 7 ninfas de *T. infestans* no III estágio, com três a quatro semanas de jejum. Mensalmente de forma simultânea foram aplicadas 2 caixas por dia, durante três dias sucessivos (6 caixas ao final de três dias) em 15 indivíduos com sorologia positiva, perfazendo ao final do estudo 486 caixas. O resultado mostrou uma positividade ascendente de 46,1% com uma caixa, 54,7% com duas e 69,1% com seis caixas. Em uma

amostragem maior e abrangente, SCHENONE *et alii* (1974), colocando em prática o mesmo procedimento anterior, demonstraram o rendimento deste protocolo em 818 pessoas com infecção chagásica, sendo 36 casos congênitos, 18 agudos e 764 crônicos. A detecção do parasita mais uma vez cresceu com o aumento do número de caixas: 41,9% com uma caixa, 52,0% com um par de caixas, 61,8% com dois pares e 67,1% com três pares. Mais recente, SCHENONE *et alii* (1991) investigaram através do xenodiagnóstico 1181 indivíduos com teste de hemaglutinação indireta positivo para *T. cruzi*. Cada um desses indivíduos submetido ao xenodiagnóstico recebeu de 1 a 8 caixas, contendo 7 ninfas cada de *T. infestans* no III estágio e com jejum prévio de 15 dias. Praticando a leitura da mesma forma que nos dois trabalhos anteriores, eles conseguiram um índice de positividade aplicando quatro, cinco e seis caixas de respectivamente 48,7; 50,0; e 51,6%, valores inferiores a 48,7% foram obtidos com 1, 2, 3, caixas e, paradoxalmente, com 7 e 8 caixas. O interessante destes resultados é que acima de 6 caixas a sensibilidade do xenodiagnóstico não cresceu e a diferença entre 4 a 6 caixas não foi superior a 2%.

CERISOLA *et alii* (1972) promoveram uma investigação para determinar a sensibilidade do xenodiagnóstico e a sua relação com o número de triatomíneo empregado. Em 92 pacientes na fase crônica da infecção e com três reações sorológicas positivas, eles aplicaram 8 caixas contendo 10 ninfas de *T. infestans* no III estágio com jejum de um mês e conseguiram os seguintes resultados: uma caixa, 27,9%; duas caixas, 36,4%; três caixas, 40,9%; quatro caixas, 43,8%; cinco caixas, 45,9%; seis caixas, 47,5%, sete caixas, 48,0% e oito caixas, 50,0%. A partir desses dados ficou padronizado o emprego de 40 ninfas distribuídas em 4 caixas de madeira nos protocolos de pesquisa da maioria dos trabalhos científicos, e que foi endossado pelo Grupo de Estudo do CNPq (1974) em doença de Chagas, no Brasil.

Outro ponto a ser abordado neste item é a repetição do xenodiagnóstico e sua relação com o aumento da sensibilidade de detecção do *T. cruzi*. A necessidade da realização de mais de um xenodiagnóstico tornou-se evidente para FREITAS (1947), ao comprovar que, nos 32 pacientes em que praticou o método 3 vezes, a presença do parasita mostrou-se no primeiro xenodiagnóstico em 17 pacientes (53,1%); no segundo, em mais 9 (28,1%) e somente no terceiro nos 6 (18,7%) restantes. Esses dados foram reforçados por RAMOS *et alii* (1949) ao estudar 72 casos de miocardite chagásica, dos quais 59 haviam se submetido a xenodiagnóstico, e comprovou-se a infecção em 22 (37,4%) deles, após a insistência em repetir o exame. Sendo o xenodiagnóstico positivo em um caso apenas após a nona repetição e em outro na oitava, em dois após sexta e em três na quinta. Estes dados fizeram os autores

concluírem que o xenodiagnóstico, principalmente quando não repetido numerosas vezes, apenas permite diagnosticar uma pequena percentagem de casos com a infecção. CANÇADO *et alii* (1973) em seu trabalho sobre bases para a avaliação de ensaios terapêuticos em doença de Chagas, ao submeterem chagásicos crônicos a xenodiagnósticos mensais consecutivos por períodos até de três anos, verificaram ser variável a positividade do xenodiagnóstico: enquanto uns pacientes exibiam todos os exames positivos (100%), outros mostravam graus menores de positividade, havendo até os que nunca apresentaram xenodiagnóstico positivo. Porém CANÇADO *et alii* (1973) não relataram os dados percentuais do xenodiagnóstico periódicos. CASTRO *et alii* (1983) e COURA *et alii* (1991) direcionaram parte de suas investigações para determinar a importância da realização de novos xenodiagnósticos no mesmo paciente. CASTRO *et alii* (1983) ao submeterem 303 pacientes a três xenodiagnósticos com intervalos de três dias a mais de um ano, observaram que no primeiro exame 125 (41,2%) deles tinham resultado positivo, no segundo exame, outros 59 (19,5%) e no terceiro mais 26 (8,6%) deles tornaram-se positivos, o que fez no final dos três xenodiagnósticos uma positividade de 69,3%. Com resultados inferiores a estes, COURA *et alii* (1991) conseguiram comprovar *T. cruzi* com apenas um xenodiagnóstico em 46,3% dos pacientes, com mais um xenodiagnóstico em 6,9% e na aplicação de um terceiro em 4,5%, com isto os dois xenodiagnósticos adicionais possibilitaram aumentar a detecção de 46,3% para 57,7%. Os percentuais tanto num trabalho como no outro não mostraram um aumento muito expressivo com a realização de mais xenodiagnósticos.

C) ESTÁDIO EVOLUTIVO DOS TRIATOMÍNEOS

Todas as fases evolutivas dos triatomíneos têm a capacidade de reproduzir a infecção, porém existe um ou outro indicativo para se empregar determinados estádios. A grande maioria dos autores empregam ninfas no III, IV e V (CAMARGO & TAKEDA, 1979), fazendo-se exceção nos xenodiagnósticos em que a espécie empregada é o *D. maxima*, neste caso optou-se pela primeira fase após eclosão do ovo.

Em seu trabalho clássico sobre "O Xenodiagnóstico", BRUMPT (1914) utilizou ninfas no III estágio da espécie *Triatoma megista* (*Panstrongylus megistus*) nas alimentações infectantes realizadas em cobaias, sem no entanto dar uma indicação do porquê da escolha. Provavelmente TORRES (1915) tenha sido o primeiro a verificar a diferença de infecção entre os diferentes estádios, ao relatar o alto índice de infecção dos insetos adultos capturados em área de campo, o que segundo ele deveria ser atribuído a maior número de chances que este

teve em se infectar. Para DIAS (1936) a idade do vetor teria importância e deveria preferir-se insetos de III e IV estádios, não só pela quantidade relativamente grande de sangue que poderiam sugar, mas pela pequena mortalidade nestas fases e longo tempo que poderiam esperar até serem examinados. O mesmo autor (DIAS, 1940a) recomendou que ninfas famintas fossem selecionadas para o xenodiagnóstico, pois teriam maior probabilidade de realizarem uma sucção mais rápida e mais completa que as ainda parcialmente cheias. No entanto, FREITAS (1947) recomendou que se utilizassem ninfas dos dois últimos estádios, dando preferência para as de V estágio, porque, pelo tamanho, ingeririam maior volume de sangue. Neste mesmo estudo, FREITAS (1947) ressalta o fato de se escolherem ninfas que não houvessem mudado recentemente de "pele" e que estivessem famintas, sendo melhor a seleção daquelas em jejum de 15 a 30 dias. SOTO & SOTO (1968) também deram preferência a ninfas no V estágio: por serem mais vorazes; alimentarem-se até a repleção completa; suportarem melhor o jejum antes do exame; e de terem maior probabilidade de captarem o parasita pela maior quantidade de sangue que ingeriam. Eles, assim como FREITAS (1947), deixavam as ninfas em jejum de, no mínimo, 30 dias, para assegurarem que as mesmas se alimentariam no hospedeiro suspeito. SALGADO (1969), como os autores anteriores, fez uso das ninfas no V estágio para avaliar os pacientes submetidos a ensaios terapêuticos. Na mesma corrente de DIAS (1936), SCHENONE *et alii* (1968) e ROHWEDDER *et alii* (1970) demonstraram a predileção por ninfas na III e IV fases evolutivas, as quais submetiam a um jejum de três a quatro semanas antes de as usarem no xenodiagnóstico. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & CRUZ (1972), em um primeiro estudo sobre a capacidade de sugar de cinco espécies de triatomíneos em todas as fases do ciclo evolutivo, ressaltam a grande capacidade de ingestão das ninfas de V estágio e sugerem que a probabilidade de encontrar o parasita utilizando este estágio do vetor seria muito maior que usando os outros estádios. Numa publicação mais abrangente com seis espécies vetoras e complementar a anterior, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ (1973) relatou que as formas bem jovens foram capazes de ingerir consideráveis quantidades de sangue e as fêmeas demonstraram sugar mais sangue que os machos. A autora também sugere que pequenos volumes de sangue poderiam ser contrabalançados com a presença de uma alta susceptibilidade ao parasita, ou aumentando o número de exemplares na aplicação. CANÇADO *et alii* (1973) também padronizaram o uso de ninfas no V estágio e cujo último oferecimento de alimentação date pelo menos de 30 dias no acompanhamento da parasitemia em pacientes tratados e no grupo controle. CERISOLA *et alii* (1974) passaram a recomendar o III estágio de *T. infestans*, após observarem que eles sugavam

até 5 vezes mais do que o seu peso, tendo, segundo eles, por isso, maior chance de sugar um parasita.

Fugindo ao padrão de se utilizar os últimos estádios ninfais no xenodiagnóstico, MARSDEN *et alii* (1979) sugeriram a introdução, na rotina, de exemplares na primeira fase evolutiva da espécie *D. maxima*, uma vez que mostraram-se tão eficientes quanto os de III de *T. infestans* na detecção do *T. cruzi* em pacientes com infecção crônica. Os custos reduzidos e a rapidez para aquisição de ninfas no I estágio de *D. maxima*, além dos resultados expressivos, fizeram com que vários grupos introduzissem essas ninfas na rotina do xenodiagnóstico, o que foi reforçado e bem focado por MARSDEN (1986) na seção editorial da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. A eficiência demonstrada com essas ninfas de I estágio de *D. maxima* não reproduziu-se com as ninfas de I estágio de *P. megistus*, testadas por MINTER-GOEDBLOED & MINTER (1987) em xenodiagnósticos praticados em diferentes hospedeiros, principalmente quando empregou-se um pequeno número de exemplares.

Os trabalhos que se seguiram na literatura e que empregaram o xenodiagnóstico para a detecção do *T. cruzi* optaram por um ou outro estágio preconizado nos trabalhos inicialmente descritos, o que demonstra até o momento a falta de padronização quanto ao item "estádio".

Alguns estudos experimentais tentaram esclarecer qual o grau de susceptibilidade dos diferentes estádios evolutivos das diversas espécies de triatomíneos à infecção pelo *T. cruzi*. WOOD (1960), nos estudos sobre a produção de tripomastigotas metacíclicas, observou que os adultos de *T. protracta* eliminavam um maior número de parasitas do que as ninfas. PHILIPPS & BERTRAM (1967) ao aplicarem lotes de *R. prolixus* dos cinco estádios ninfais para se alimentarem em ratos com parasitemia patente, mostraram que a taxa de infecção dos exemplares declinou com o aumento da idade e do tamanho das ninfas. Quanto aos triatomíneos adultos não encontraram diferença de positividade entre os machos e as fêmeas. Entretanto ALMEIDA *et alii* (1973), ao investigarem a susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* dos estádios evolutivos de *R. neglectus*, verificaram um índice menor de infecção no I estágio (56%) e o maior no V estágio (82%) após alimentação em cobaias experimentalmente infectadas. Em relação a machos e fêmeas, os dados de ALMEIDA *et alii* (1973) endossaram os de PHILLIPS & BERTRAM (1967); o sexo dos exemplares não teve significado no índice de infecção o que foi confirmado, a seguir, por MILES *et alii* (1975). Contrariamente, MAUDLIN (1976) descreveu maior positividade nos machos do que nas fêmeas.

Com relação à eficácia de ninfas de I estágio na detecção do *T. cruzi*, MINTER *et alii* (1977), empregando exemplares de *P. megistus*, *T. infestans* e *R. prolixus*, nesta fase ninfal, nos xenodiagnósticos realizados em diferentes hospedeiros, concluíram que, devido ao fato de ingerirem pequena quantidade de sangue, o primeiro estágio teve valor limitado, quando aplicado em hospedeiros com baixa parasitemia. Em se tratando da espécie *D. maxima*, este valor mostrou-se diferente, conforme enfocamos anteriormente.

Todos esses dados indicam a necessidade de estudos complementares que esclareçam pontos ainda contraditórios na susceptibilidade dos diferentes estágios evolutivos dos triatomíneos ao parasita.

D) PERÍODO DE INCUBAÇÃO DO *T. cruzi* NOS TRIATOMÍNEOS

O período de incubação é estabelecido em função do crescimento do parasita dentro do vetor, sendo o suficiente para permitir que o *T. cruzi* se desenvolva em uma quantidade que torne fácil a sua detecção ao microscópio. DIAS (1940b) relata em seu trabalho intitulado "Técnica do Xenodiagnóstico na Moléstia de Chagas", que adotou como regra nunca dissecar os exemplares antes de decorrido um mês e considerava tempo ótimo entre o 40° e o 60° dia. Entretanto, verificou-se que este tempo ou período para exame pode ser maior ou menor, dependendo principalmente das condições de parasitemia do hospedeiro.

Na fase aguda, onde o número de parasitas é significativo, a pesquisa do *T. cruzi* poderá ser realizada mais precocemente do que na fase crônica. Segundo ROMAÑA & BRIONES (1954) em 133 casos agudos o exame dos triatomíneos foi positivo entre 2 a 10 dias depois de aplicado o xenodiagnóstico. Para ROHWEDDER *et alii* (1970) este tempo deve ser mais longo, uma vez que eles observaram um maior número de parasitas nos exemplares infectados em torno de 15 a 25 dias após o repasto.

No caso do número de parasitas ser muito escasso, como na fase crônica da infecção, é um consenso que se pratique a leitura entre 30 e 60 dias após a alimentação infectante. FREITAS (1950), ao realizar xenodiagnóstico com elevado número de triatomíneos em 19 casos crônicos da doença, comprovou por exame de dissecação as maiores percentagens de infecção aos 60 dias do que nos outros dois períodos de pesquisa, 30 e 90 dias. SCHENONE *et alii* (1968) estabeleceram que as ninfas devem ser examinadas mediante compressão abdominal e em *pool* aos 30, 60 e 90 dias a partir do dia da aplicação no hospedeiro suspeito, exceto quando resultassem positivas no primeiro e segundo exame. Nessa investigação, dos 1.637 xenodiagnósticos realizados nos 686 chagásicos crônicos, em 68,9% o

exame foi positivo aos 30 dias, 23,3% e 7,8% nos 60 e 90 dias após a aplicação. Do mesmo modo, CERISOLA *et alii* (1974), ao efetuarem a primeira leitura aos 30 dias, depois aos 60 dias e finalmente aos 90 dias, demonstraram que aos 30 dias foi possível detectar o parasita em mais de 50% dos casos positivos no xenodiagnóstico. Alguns autores preconizaram apenas um exame e por dissecação, como DIAS (1935, 1940b), PIFANO (1954) e SALGADO (1969). No trabalho de PIFANO (1954), empregou-se o xenodiagnóstico em pacientes crônicos e praticou-se uma única pesquisa do parasito no conteúdo intestinal obtido através da dissecação das ninfas entre 45 e 60 dias contando do primeiro dia do repasto; com este protocolo o autor conseguiu uma positividade de 65%. SALGADO (1969), também ao colocar em prática o xenodiagnóstico na seleção de pacientes submetidos a tratamento, estipulou uma única leitura aos 45 dias das ninfas aplicadas. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MULLER (1987), ao submeter cobaias infectadas com a cepa Y e na fase crônica a uma série de xenodiagnósticos com 9 espécies vetoras no IV estágio ninfal, comprovaram que a densidade parasitária nos primeiros 15 dias após a infecção foi baixa, porém que cresceu rapidamente nos 30 dias posteriores, por isso adotou o intervalo de 45 dias para o exame das ninfas alimentadas no hospedeiro na fase crônica.

Um outro fator a ser considerado no período de escolha do exame dos exemplares de triatomíneos é a temperatura de manutenção dos mesmos até o momento da leitura. WOOD (1954) observou que, em condições naturais de altas temperaturas, 28 a 34,5°C, ocorreu uma precocidade e aumento na eliminação de formas tripomastigotas metacíclicas pelo *T. protracta* em relação àqueles exemplares deixados em temperaturas baixas, 22 e 23°C. PHILLIPS (1960) também conseguiu detectar formas tripomastigotas metacíclicas em *R. prolixus* antecipadamente nas temperaturas elevadas (30 e 35°C) e tardiamente nas mais baixas (20°C). Em uma análise mais detalhada, NEVES (1971) acompanhou a influência das temperaturas de -5°C, 0°C, 5°C, 10°C, 22°C, 23°C, 28°C, e 37°C na evolução do *T. cruzi* em ninfas de IV e V estágio de *T. infestans*. Ele comprovou que a -5°C, 0°C, 5°C e 10°C havia inibição da evolução do parasito; a 23°C, começavam a aparecer as formas metacíclicas e, a partir de 28°C, iniciava-se o decréscimo de formas em geral até o quase desaparecimento a 36° - 37°C. CERISOLA *et alii* (1974) conseguiram uma positividade mais cedo; cerca de 80% do grupo de caixas deixadas em incubação a 30°C apresentavam *T. cruzi* aos 30 dias, enquanto que apenas 58% das caixas mantidas entre 15 a 25°C, no mesmo período, estavam positivas; no entanto, a taxa de positividade global foi igual ao final do último exame ao 90 dias. Neste mesmo trabalho, mais em outro experimento, eles verificaram que, ao utilizar o método de exame de MAEKELT (1964) para detectar *T. cruzi* em ninfas

aplicadas em 36 pacientes agudos e que após se alimentarem foram mantidas a 30°C, o momento oportuno para a leitura ficou sendo de 25 a 30 dias de incubação. URDANETA-MORALES & RUEDA (1977) acharam dados contraditórios quando infectaram exemplares de *R. prolixus* com duas cepas diferentes. Em uma das cepas, a mesma temperatura provocou resultados diferentes conforme o estágio ninfal; na outra cepa, a baixa temperatura (20° e 25°C) resultou em maior densidade parasitária nas fezes.

Todos esses dados de influência da temperatura no estabelecimento do período de pesquisa do *T. cruzi* no triatomíneo empregado no xenodiagnóstico parecem mais importantes quando o método de exame se faz apenas pela procura de flagelado nas dejeções obtidas por compressão abdominal ou espontaneamente.

E) FORMA DE EXAME DO CONTEÚDO INTESTINAL DOS TRIATOMÍNEOS

Como veremos, a seguir, algumas variações foram introduzidas no procedimento inicial adotado por BRUMPT (1914) para pesquisa de *T. cruzi* nas fezes dos triatomíneos aplicados no xenodiagnóstico. Entretanto, atualmente, ficou universalizada a obtenção de fezes para a pesquisa por compressão abdominal e, em caso negativo, a dissecação do tubo digestivo dos exemplares ou a verificação direta por dissecação.

DIAS (1936, 1940b) recomendou três formas diferentes de exame: dejeções a fresco, punção retal e dissecação do tubo digestivo. O primeiro consiste em alimentar o triatomíneo e esperar que ele defeque espontaneamente para, a seguir, coletar o material eliminado e examinar entre lâmina e lamínula. No segundo procedimento, introduz-se a extremidade de uma pipeta capilar no orifício anal do vetor de maneira que o conteúdo suba por capilaridade; o material obtido é depositado entre lâmina e lamínula para pesquisa. No exame por dissecação, são inicialmente desmembradas as partes externas do triatomíneo e cortado o conexivo, de forma que a parte dorsal e ventral se separem; a seguir, secciona-se transversalmente a folha quitinosa e retira-se o tubo digestivo que é colocado sobre uma lâmina para posterior verificação.

Num protocolo mais elaborado, MAEKELT (1962, 1964) propôs que os exemplares aplicados no xenodiagnóstico passassem por um processo de trituração, filtração e centrifugação. Na prática, o autor colocava um *pool* de ninfas para ser triturado a uma velocidade baixa, para não destruir o parasita, a seguir filtrava todo este material e centrifugava a parte líquida. O sobrenadante era desprezado e o sedimento examinado entre

lâmina e lamínula. Ao comparar este método com o da dejeção espontânea, ele concluiu que o primeiro era mais sensível e mais rápido do que o segundo. Nós acreditamos que, se MAEKELT (1962, 1964) tivesse feito o estudo comparativo com o método de dissecação, provavelmente a diferença de positividade não fosse significativa.

De maneira mais simples, SCHENONE *et alii* (1968) efetuaram pesquisa dos triatomíneos através de uma leve compressão do extremo posterior do abdômen, de forma que a gota do conteúdo intestinal que fluísse pudesse ser depositada sobre uma lâmina contendo previamente alguns microlitros de solução fisiológica, sendo, após homogeneização, coberta com uma lamínula para posterior leitura. Com a finalidade de agilizar a leitura, depositava-se sobre a mesma lâmina as fezes de cerca de sete ninfas.

SALGADO (1969) realizou de três formas diferentes o exame das ninfas aplicadas em 45 xenodiagnósticos. Inicialmente das fezes obtidas em *pool* pela compressão de 5 ninfas, depois das fezes coletadas por compressão porém individualmente e por último, no caso negativo destes dois procedimentos, do material dissecado de cada inseto. Com o método da dissecação, o autor conseguiu comprovar mais 6 casos positivos que não foi possível pelos dois primeiros tipos de exames.

Uma outra maneira de realizar a verificação dos exemplares foi citada por PIFANO (1973), na qual se secciona com apenas um corte o último segmento abdominal do triatomíneo e com uma pequena pressão permite-se que o conteúdo saia pelo orifício aberto. Na verdade este procedimento não seria nem de compressão e nem de dissecação, mas um quarto, se considerarmos o de MAEKELT (1964) como um terceiro método.

Quatro publicações tornam-se importantes de ser citadas por enfocarem um estudo comparativo entre os dois procedimentos básicos adotados na rotina do xenodiagnóstico: a dissecação e a compressão. FORATTINI *et alii* (1976), ao efetuarem em gambás (*Didelphis azare* e *Didelphis marsupialis*) capturados em várias localidades do Estado de São Paulo uma série de xenodiagnósticos empregando ninfas de *R. neglectus* no III e IV estágio ninfal, observaram, pelo exame das fezes obtidas por compressão, um maior número de exemplares positivos a partir do vigésimo primeiro dia após o repasto infectante. Porém, quando praticaram a pesquisa do parasita no conteúdo intestinal obtido por dissecação do intestino posterior, eles comprovaram um maior número de exemplares positivos já no sétimo dia, contado do hematofagismo no hospedeiro, o que demonstrou a precocidade da comprovação do resultado positivo quando se realiza o exame por este tipo de procedimento. Eles também verificaram que a proporção de ninfas detectadas infectadas pelo exame de dissecação foi estatisticamente mais significativo que pelo método de compressão. CUBA-

CUBA *et alii* (1979) mostraram que os resultados entre o exame das fezes obtidas por compressão dos triatomíneos se equiparavam ao exame por dissecação quando eles foram realizados em um número diferente de exemplares. A taxa de positividade de 20 exemplares examinados em *pool* de fezes obtidas a cada 5 exemplares (4 *pools*) foi praticamente igual a taxa do exame individual por dissecação de 10 exemplares aplicado concomitantemente, sendo as taxas de, respectivamente, 21,38% e 23,89%. Porém, quando o número de exemplares aplicados e examinados por ambos os procedimentos (compressão e dissecação) foi o mesmo e igual a 10, o percentual de detecção pelo exame de compressão em *pool* (2 *pools* de 5) mostrou-se menor ao praticado individualmente por dissecação, cujos valores foram, respectivamente, 12,58% e 23,89%. FUENTE *et alii* (1985), ao realizarem o exame de 307 triatomíneos infectados experimentalmente, demonstraram a importância da utilização do método de dissecação em relação ao procedimento clássico de eliminação das fezes, no exame de detecção do *T. cruzi*, uma vez que comprovaram pelos dois métodos uma positividade de respectivamente 138 (45%) e 62 (20%) dos exemplares. SILVA (1990) comprovou, através do método de compressão abdominal (clássico), 40,1% de casos positivos e, pelo método de dejeções espontâneas, mais 6,5% destes casos (46,6%) num total de 206 xenodiagnósticos aplicados em chagásicos crônicos; esta diferença foi estatisticamente significativa. Apesar de não ser prático o método das dejeções espontâneas empregado pelo autor, no qual as ninfas foram colocadas para se alimentar em camundongos e esperou-se de três a quatro minutos até que as mesmas eliminassem as fezes, o procedimento parece ser útil nos casos em que haja necessidade do exemplar vivo.

Com esses trabalhos, ficou claro a importância do exame de dissecação, no aumento de sensibilidade do xenodiagnóstico, em relação ao exame apenas das dejeções

F) NÚMERO DE ALIMENTAÇÕES NO HOSPEDEIRO SUSPEITO E FORA DELE

TORREALBA (1934) foi o primeiro a sugerir a realimentação dos exemplares sobre o hospedeiro suspeito, sem, no entanto, apresentar dados que justificassem uma segunda ou mais alimentações. Porém, ao analisarmos seus dados com mais atenção, verificamos que de todos os 5 xenodiagnósticos positivos dos 20 realizados, em 4 deles foi dada às ninfas a chance de se alimentarem várias vezes no hospedeiro e nos 15 xenodiagnósticos restantes, que foram negativos, apenas em 4 deles permitiu-se às ninfas a mesma oportunidade de realimentação, o que não deixa de ser um indicativo da importância das realimentações.

PIFANO (1954), ao efetuar o xenodiagnóstico em 80 pacientes crônicos utilizando ninfas de *R. prolixus* e fazendo estas ninfas se alimentarem uma a duas vezes no mesmo paciente, obteve uma taxa de positividade desigual em função de um novo repasto. No grupo em que se utilizou o procedimento de um repasto, em 65% (52/80) dos pacientes foi possível detectar *T. cruzi*; e no outro grupo com dois repastos, a percentagem da detecção subiu para 85% (68/80). MAEKELT (1962) conseguiu maior positividade do xenodiagnóstico em pacientes crônicos quando aumentou o número de vezes em que reaplicou as ninfas no xenodiagnóstico, ele chegou a praticar até 6 realimentações sobre o paciente, conseqüentemente estes tiveram maior número de ninfas alimentadas, possibilitando que, pelo menos, um *T. cruzi* fosse sugado no sangue ingerido. Os resultados de URRIBARRÍ (1970) não foram tão promissores; dos 70 pacientes submetidos por ele ao xenodiagnóstico com uma alimentação e leitura aos 30 dias, 12 (17,1%) foram positivos, os outros 30 pacientes com xenodiagnóstico praticado com duas alimentações (intervalo de 15 dias) e leitura também aos 30 dias, apenas 4 (13,3%) apresentaram *T. cruzi*.

Apesar dos promissores resultados de PIFANO (1954), uma segunda alimentação no mesmo indivíduo não foi adotada nos protocolos de xenodiagnóstico da maioria dos trabalhos, o que se deveu a dois motivos bem práticos: primeiro, à dificuldade de se conseguir que o indivíduo se submetesse a novas picadas em um curto intervalo de tempo, principalmente quando o mesmo apresentou reação alérgica intensa à picada do tritomíneo; e segundo, a impossibilidade logística em trazer os indivíduos que se encontram em lugares de difícil acesso para uma nova aplicação. O próprio TORREALBA (1934) relata que nem sempre foi possível repetir o xenodiagnóstico em indivíduos por ele acompanhados quando os mesmos se localizavam em área de campo. PIFANO (1960) sugeriu então que aqueles triatomíneos alimentados só uma vez sobre o hospedeiro suspeito fossem realimentados duas semanas mais tarde em cobaias saudáveis, evitando fazer isto em galinhas ou pombos devido à atividade "triplanótica" do soro destes animais. Anteriormente a PIFANO (1960), DIAS (1933, 1940b) já aconselhava uma nova alimentação das ninfas em animal são após aplicação do xenodiagnóstico; para ele o intervalo excessivamente longo entre o repasto infectante e a leitura não era recomendável, uma vez que com o correr do tempo a infecção poderia desaparecer espontaneamente decorrente do prolongado jejum do hematófago. Isto foi reforçado por FREITAS (1947). O que nos parece questionável nos relatos anteriores é que a alimentação em galinha não impede a evolução da infecção no vetor; o segundo ponto é em relação a perda da infecção pela falta de realimentação, isto também merece reconsideração, pois conforme CHAGAS (1909): "*uma vez infectado o vetor ele permanece parasitado pelo*

resto da vida, mesmo que seja alimentado em animal sã". Esta afirmativa de Chagas foi reforçada pelos dados de LUZ & BORBA (1968/1969), que após submeterem 3 lotes de ninfas da espécie *T. infestans* à alimentação infectante e mantendo-as, a seguir, por períodos diferentes de jejum, observaram que, por mais prolongado que fosse o jejum, um resíduo de evolução do hemoflagelado persistiu até a morte do vetor. Um outro dado interessante em relação ao papel do sangue no desenvolvimento do parasita no vetor foi relatado por ALVARENGA & BRENER (1978). Ao alimentarem ninfas de I estágio, que nunca haviam sido submetidas a repasto, com formas sangüíneas de *T. cruzi* livres de células e componentes do sangue, esses autores demonstraram que o parasita foi capaz de multiplicar-se, diferenciar-se e produzir formas infectantes apesar da ausência de sangue.

Outros fatores, além desses seis itens citados (A a F) anteriormente, poderiam ser abordados, como aqueles ligados ao hospedeiro, porém os deixaremos para a discussão, onde merecerão destaque.

Em relação à sensibilidade do xenodiagnóstico na fase crônica da infecção, os resultados normalmente não ultrapassam a 50%. URRIBARRÍ (1970), na introdução de seu trabalho sobre o emprego do xenodiagnóstico em 100 casos crônicos da doença de Chagas, apresenta um quadro com as taxas de positividade relatadas por diversos autores e que nós reproduzimos a seguir por acharmos ilustrativo, apesar de não constarem dados atualizados.

*RESULTADO DEL XENODIAGNOSTICO EN PACIENTES CON MACHADO-GUERREIRO
POSITIVO DE DIVERSOS AUTORES*

<i>Autor</i>	<i>Ref.</i>	<i>Pac.</i>	<i>Pos.</i>	<i>Neg.</i>	<i>% de Pos.</i>
1- Chiari, E. y Brener, Z.	(49)	35	11	24	31,40%
2- Coura, J. R.	(50)	29	3	26	10,30%
3- Diaz Ungria. Cols	(51)	9	0	9	0,00%
4- Figallo, E. L.	(53)	23	3	20	13,00%
5- Gould, R. y Cols	(36)	38	8	30	21,00%
6- Guerrero, L. Cols	(54)	9.149	2.744	6.405	30,00%
7- Maekelt, G. A. y Diaz	(56)	530	78	452	14,70%
8- Maekelt, G. A.	(32)	184	57	127	31,00%
9- Maekelt, G. A.	(61)	53	22	31	41,50%
10- Pellegrino, J. Cols	(62)	7	3	4	42,80%
11- Pellegrino, J. Cols	(59)	31	8	23	25,80%
12- Pifano, C. F.	(31)	80	25	55	33,80%
13- Pifano, C. F.	(31)	80	35	45	43,70%
14- Pifano, C. F.	(58)	8	8	0	100,00%
15- Pans, A.	(33)	4	3	1	75,00%
16- Soto, U. y T. de Soto	(60)	30	7	23	23,30%
17- Torrealba, J. F. Cols	(22)	7	5	2	71,40%
TOTAL		10.297	3.020	7.277	29,30%

Vale ressaltar que o protocolo seguido em cada trabalho diverge completamente, mostrando a falta de padronização de xenodiagnóstico.

Com a finalidade de complementar o quadro acima, com trabalhos posteriores, em que o xenodiagnóstico foi empregado para detectar o *T. cruzi* em pacientes de diferentes regiões endêmicas, citaremos, a seguir, os dados de sensibilidade obtidos em algumas destas publicações. LIMA *et alii* (1970), seguindo o procedimento de xenodiagnóstico proposto por SCHENONE *et alii* (1968) e aplicando em cada um dos 50 pacientes com sorologia positiva 88 ninfas de *T. infestans* no III e IV estágio, conseguiram uma positividade de 56% (28/50). Estes 50 pacientes foram selecionados de um grupo de 154 casos sorologicamente positivos obtidos após triagem com três reações sorológicas de um grupo maior de 1609 indivíduos internados no Hospital São Pedro em Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil). Ao investigar a dinâmica epidemiológica da doença de Chagas no Vale dos Naranjos (Carabobo, Venezuela), PIFANO (1973) verificou que, dos 1.000 indivíduos residentes nesta área de campo, 213 (21,3%) tinham parasita circulante no sangue detectado pelo método de xenodiagnóstico, realizado com 12 ninfas de *R. prolixus*, e 709 (70,9%) apresentavam Acs anti-*T. cruzi*. Nessa região também foi comprovada a presença de *T. rangeli* em um pequeno grupo de indivíduos. Com o objetivo de estudar 21 pacientes portadores do quadro clássico típico da infecção chagásica aguda, CERISOLA *et alii* (1974), na Argentina, realizaram o xenodiagnóstico, empregando 40 ninfas de III estágio de *T. infestans*, comparativamente com outros 6 métodos parasitológicos. Através do xenodiagnóstico foi possível detectar o parasita em 100% dos pacientes (21/21) e entre os outros 6 métodos parasitológicos, apenas o método de Strout mostrou resultados semelhantes ao xenodiagnóstico, detectando 95,2% (20/21) dos casos. Os autores desse estudo relataram que o inconveniente do xenodiagnóstico foi a demora na obtenção do resultado final, em relação aos outros seis métodos. CASTRO (1980), através de três xenodiagnósticos praticados com 30 a 40 ninfas de *T. infestans* e *D. maxima*, respectivamente no III e I estágio, encontrou uma percentagem de 68,5% de indivíduos positivos. Este autor compôs a casuística da investigação com 292 chagásicos crônicos, residentes na área endêmica de Mambaí (Goiás, Brasil), selecionados por três reações sorológicas. Em 716 indivíduos com sorologia positiva que fizeram parte de um estudo seccional de campo do tipo "caso controle" sobre a morbidade da doença de Chagas, efetuado por COURA *et alii* (1984), em quatro áreas endêmicas no Brasil, foi possível demonstrar um perfil característico da positividade do xenodiagnóstico, segundo a área da população submetida ao exame. Empregando a técnica preconizada por CERISOLA *et alii* (1971), porém

utilizando espécies diferentes de triatomíneos no III, IV e V estádios, COURA *et alii* (1984) encontraram as seguintes taxas de positividade: área 1 (Iguatama e Pains, Estado de Minas Gerais), 39,5%; área 2 (Virgem da Lapa, Estado de Minas Gerais), 23,9%; área 3 (Oeiras, Estado do Piauí), 19,1%; área 4 (Vale do Piancó, Estado da Paraíba), menos de 1% (1 xenodiagnóstico positivo em 24 realizados). Diante dessa baixa positividade na área 4, os autores fizeram novos xenodiagnósticos simultaneamente com *T. pseudomaculata* e *T. infestans*, obtendo-se novamente um "xeno" positivo com o *T. pseudomaculata* e dois com o *T. infestans*, total 3 positivos em 37. CONTRERAS *et alii* (1988) ao processarem o xenodiagnóstico, segundo o método de SCHENONE *et alii* (1968), em um grupo de 773 indivíduos de uma área endêmica no Chile, mostraram a existência de *T. cruzi* circulante em 31,8% (246/773), aplicando uma série de quatro caixas contendo sete ninfas de *T. infestans*.

Além da sensibilidade do xenodiagnóstico, não podemos deixar de abordar a especificidade do mesmo. Os resultados falso positivos são conseqüências da presença de formas flageladas de outras espécies trypanosomatídeos, que também se desenvolvem no tubo digestivo de triatomíneos ou em parte dele. As duas espécies, que podem confundir o resultado, são o *Trypanosoma rangeli* e a *Blastocrithidia triatominae*. A primeira espécie tem sido reportada em alguns países da América Latina infectando reservatórios, o homem e exemplares de *R. prolixus* em comum convivência com o *T. cruzi* (PIFANO, 1949). Neste caso, o diagnóstico diferencial pode ser, em parte, realizado pela morfologia (PIFANO, 1949) e pesquisa do flagelado na hemolinfa e glândulas salivares dos vetores, sendo complementado com estudos bioquímicos e moleculares do parasita isolado (GONÇALVES *et alii*, 1991; MURTHY *et alii*, 1992). A *Blastocrithidia triatominae* foi encontrada infectando naturalmente *Triatoma infestans* capturados na Argentina. Exemplares de triatomíneos infectados naturalmente com este trypanosomatídeo, e que são introduzidos nas criações de vetores para xenodiagnóstico, podem ser a fonte de contaminação para os demais exemplares. A presença deste parasita em ninfas aplicadas no xenodiagnóstico gerará confusão no momento da leitura do xenodiagnóstico. A dispersão dos cistos infectantes pode ser evitada eliminando-se os exemplares contaminados capturados no campo e desinfetando-se os ovos postos por estes com hipoclorito de sódio a 3,8% por 5 minutos (CERISOLA *et alii*, 1974).

O que foi relatado até o momento, sobre o método de diagnóstico através do xenodiagnóstico referiu-se ao procedimento em que a aplicação das ninfas se faz sobre a pele do hospedeiro (*in vivo*); no entanto, não poderíamos deixar de citar os poucos trabalhos existentes na literatura que fizeram uso da forma indireta de aplicação dos exemplares, até

porque reconhecemos a sua importância em determinadas situações em que não é recomendada a aplicação tradicional.

O primeiro sistema de alimentação *in vitro* para triatomíneos, ou artificial como denominado no trabalho original, foi idealizado por NICOLLE (1941) e reproduzido na publicação de NICOLLE & LWOFF (1943), constava de um sistema de aquecimento da água que passava através de canos de borracha até o recipiente de vidro contendo o sangue para aquecê-lo e atrair, assim, o triatomíneo, por termotropismo, para o repasto. Mas os pioneiros em proporem a forma indireta para realização do xenodiagnóstico foram ROMAÑA & GIL (1947), BORZONE (1949) e CORNEJO (1949); entretanto, nenhum deles forneceu o número de resultados positivos obtidos com o procedimento. NUSSENZWEIG & SONNTAG (1952), utilizando um frasco de Borrel com a boca recoberta por um fragmento de intestino de boi e contendo sangue de cobaia infectado, conseguiram obter 7 triatomíneos positivos em 16 alimentados neste sistema. Em paralelo foram aplicados outros 8 exemplares sobre a pele de cobaias infectadas e o resultado obtido foi 5 ninfas positivas. Empregando este mesmo procedimento, FREITAS *et alii* (1955) realizaram um estudo comparativo entre xenodiagnóstico praticado *in vivo* e *in vitro* em 50 pacientes chagásicos crônicos e verificaram não existir diferença estatística na taxa de positividade obtida por ambos os métodos. SILVA (1958) reforça a conveniência de se realizar o xenodiagnóstico fora do organismo vivo e descreve um método que mostrou bons resultados na alimentação de ninfas de III e IV estágio de *T. infestans*, como também permitiu a alimentação simultânea de um número grande de triatomíneos, porém não apresentou dados quantitativos dessa eficiência.

RUTLEDGE *et alii* (1964), com o objetivo de estudar a resposta alimentar de mosquitos frente a diferentes soluções nutritivas, elaboraram um sistema simplificado de alimentação *in vitro*, que mais tarde foi introduzido por GARCIA *et alii* (1975), na alimentação da espécie *R. prolixus* e que vem sendo utilizado no momento por vários pesquisadores para alimentação infectante ou não de diferentes espécies de triatomíneos. O sistema é basicamente formado de uma peça de vidro autoclavável que consta de: uma boca inferior de diâmetro largo, onde adere-se uma fina membrana (sintética ou natural) que permite o contato da "peça" bucal do inseto com a substância alimentar; uma parte superior, mais estreita, por onde introduz-se o nutriente; e finalmente, duas pequenas saídas laterais (uma de cada lado) que permitem a entrada e saída de água, através de uma conexão de borracha ligada a um aparelho que, além de aquecer, impulsiona a água de forma a mantê-la circulando e ao mesmo tempo aquece o sangue internamente.

CEDILLOS *et alii* (1982), comparando o xenodiagnóstico *in vivo* com o *in vitro* e tomando como parâmetros o número de ninfas alimentadas bem como a quantidade de sangue ingerido, obtiveram, em alguns casos, resultados similares. As variações ocorreram em relação ao tipo anticoagulante, membrana e temperatura utilizados no procedimento *in vitro*. Ao testarem vários tipos de anticoagulantes e membranas, CAMPOS *et alii* (1988), comprovaram melhores resultados com o uso de citrato de sódio e "tripa" de boi no sistema de alimentação *in vitro*. Dando continuidade a mesma linha de investigação, SOUZA *et alii* (1988) empregando as técnicas de xenodiagnóstico *in vivo* e *in vitro* em 50 pacientes na fase crônica da infecção chagásica, evidenciaram não haver diferença entre os dois métodos em termos de positividade e de volume de sangue ingerido pelas ninfas.

Em um trabalho mais recente, ISAC (1994) estudou a interferência da heparina e do citrato de sódio na biologia de exemplares de *R. neglectus* infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, com o objetivo de aperfeiçoar e viabilizar o xenodiagnóstico *in vitro* (denominado pela autora como artificial) para o uso em rotina de laboratório. Nestes experimentos, a autora constatou que a heparina exerce menor interferência no desenvolvimento do triatomíneo e na replicação do *T. cruzi* no vetor em relação ao outro anticoagulante.

Finalmente, SANTOS *et alii* (1995) mostraram que, ao realizarem o xenodiagnóstico *in vivo* (natural) e *in vitro* (artificial) em 57 pacientes na fase crônica, o método *in vitro* foi significativamente mais sensível do que o *in vivo* para detectar *T. cruzi* e que uma aplicação artificial foi igual à natural, repetida três vezes. Mesmo após esta publicação, nós avaliamos a necessidade de um maior número de investigações que comparem o xenodiagnóstico *in vivo* (tradicional) com o xenodiagnóstico *in vitro*, tendo como finalidade constatar se a substituição do tradicional pelo *in vitro* não acarretará em perda da sensibilidade de detecção do *T. cruzi* pelo método de xenodiagnóstico. O trabalho que estamos desenvolvendo neste sentido tem mostrado que o xenodiagnóstico *in vitro* apresenta-se melhor que o xenodiagnóstico *in vivo* (dados ainda não publicados).

HEMOCULTURA

A hemocultura é outro procedimento metodológico indicado para a detecção do *T. cruzi* na fase crônica da infecção. Consiste, basicamente, em semear o sangue do indivíduo ou animal suspeito em meio de enriquecimento que permita a multiplicação do parasita *in vitro*.

O primeiro a recomendar a utilização de meios de cultura para o crescimento do *T. cruzi* foi CHAGAS (1909), o próprio descobridor do agente etiológico. Segundo ele, ao semear o *T. cruzi* em meio de agar sangue, descrito por Novy & McNeal, o parasita cresceu com facilidade. Posteriormente ao relato de CHAGAS (1909), diferentes pesquisadores tentaram utilizar o método de hemocultura como forma de diagnóstico, sem resultados muito expressivos. Isto ficou bem explanado na revisão bibliográfica realizada por FREITAS (1947) em seu capítulo de tese intitulado "*Cultura*", que englobou os trabalhos publicados entre 1909 a 1944. Na mesma tese, FREITAS (1947), empregando os meios de cultivo de Bonacci e Novy & McNeal, executou a hemocultura do sangue coletado de 21 pacientes chagásicos crônicos, dos quais 12 tinham xenodiagnóstico positivo e 9 eram fortemente reagentes na reação de fixação do complemento. De um total de 37 sementeiras, com cerca de no máximo 0,5 ml de sangue cada, o autor não conseguiu encontrar *T. cruzi* em nenhuma delas. Também PIFANO (1949), semeando sangue venoso de indivíduos crônicos com doença de Chagas e infectados com *T. rangeli*, só conseguiu ter sucesso no isolamento do *T. rangeli* em tubos contendo agar nutritivo glicosado com sangue desfibrinado de coelho mais caldo nutritivo glucosado com solução de Locke.

Em trabalho posterior PIFANO (1954), ao empregar a pesquisa direta do sangue periférico, o xenodiagnóstico e a hemocultura na tentativa de detectar *T. cruzi* em 80 indivíduos crônicos, obteve 5 casos (6,25%) positivos para *T. cruzi* e 20 (25%) para *T. rangeli* através da hemocultura. Ele usou 5 tubos com meio de Davis e 5 tubos com meio Razgha-Reichenow e semeou 1 ml de sangue em cada um. Com o xenodiagnóstico (aplicado uma única vez) e pesquisa direta (gota espessa), foi possível comprovar os parasitas em respectivamente 52 (65%) e 6 casos (7,5%), demonstrando com isso, a baixa sensibilidade tanto do método de hemocultivo como da pesquisa direta em relação ao xenodiagnóstico. Em outro relato PIFANO (1960) conseguiu aumentar o percentual para 16%, 16 pacientes positivos pela hemocultura em 100 investigados. Para cada paciente foram destinados 6 tubos, contendo agar nutritivo glicosado segundo Davis, onde foi semeado 0,5 ml de sangue venoso citratado por tubo. É importante destacar que todos os 100 pacientes já haviam se submetido ao xenodiagnóstico e apresentaram resultados positivos. Nessa mesma investigação, PIFANO (1960) escolheu 35 indivíduos, dos 100, e praticou, simultaneamente, um novo xenodiagnóstico e uma nova hemocultura, nos quais obteve positividade de respectivamente 91,42% (32/35) e 14,28% (5/35).

Empregando um meio denominado LIT (*Liver Infusion Tryptose*), formulado por Yaeger e primeiramente utilizado para o crescimento de *T. cruzi* por CAMARGO (1964),

CHIARI & BRENER (1966) resolveram testar a atuação deste novo meio no método de hemocultura para detecção do *T. cruzi* em 35 pacientes com reação de Guerreiro-Machado positiva. Simultaneamente realizaram o xenodiagnóstico com 10 ninfas de *T. infestans* (IV e V estágio). Para hemocultura, coletaram, de cada paciente, 15 ml de sangue que foram misturados a 5 ml de citrato de sódio a 3,8% (volume final de 20 ml) e separados, a seguir, em 2 alíquotas: uma delas (\cong 16 ml) foi centrifugada à baixa rotação, tanto o sobrenadante como o sedimento obtido foram semeados separadamente em 5 tubos de meio LIT; a alíquota restante (\cong 4 ml) eles cultivaram diretamente em 3 tubos contendo o meio. Com este protocolo eles conseguiram detectar *T. cruzi* em 25,7% dos pacientes através de hemocultura, 31,4% de xenodiagnóstico e 42,8% de combinação dos dois métodos. Os tubos de meio que receberam o sobrenadante apresentaram maior taxa de positividade do que aqueles com sedimento. Segundo os autores, o fato demonstrou que os tripanosomas sobrenadam no sangue citratado; para nós contribuiu para isso a baixa rotação e o curto tempo de centrifugação utilizados.

MARSDEN *et alii* (1969) por sua vez não encontraram resultados promissores ao tentar detectar *T. cruzi* em membros de 8 famílias de uma região endêmica na Bahia utilizando as metodologias de xenodiagnóstico e de hemocultura (meio monofásico de coração e cérebro mais meio de Horens), além da inoculação do sangue coletado em animais. Apenas o xenodiagnóstico foi capaz de identificar indivíduos positivos (cerca de 55%); as hemoculturas fracassaram no crescimento do parasita nos 36 sangues semeados e a inoculação só comprovou 1 caso.

Seis anos após a publicação de CHIARI & BRENER (1966), um novo meio é proposto por ALBUQUERQUE *et alii* (1972) para ser empregado em hemoculturas, o meio de Warren, com o qual a autora diz ter obtido excelentes resultados. Com esse meio teria sido possível isolar o parasita de todos os 38 pacientes crônicos investigados, com reação de fixação do complemento positiva. Para cada paciente, coletaram-se 9 amostras de sangue (3 ml por amostra) em 3 séries com intervalo de 30 dias entre uma e outra e 3 dias sucessivos para cada série, perfazendo 27 ml de sangue no total das séries. Ao final das duas primeiras séries, já havia sido comprovada positividade em 97,4% dos pacientes, com, apenas, 18 ml de sangue processado.

As taxas de positividade alcançadas por ALBUQUERQUE *et alii* (1972), entretanto, não foram reproduzidas por MOURÃO & MELLO (1975), segundo relato deles próprios na publicação de 1975. Neste trabalho eles testaram a hemocultura com meio LIT, para diagnosticar parasitologicamente 20 indivíduos com reação de Guerreiro-Machado positiva, sendo que 11 deles apresentavam xenodiagnóstico positivo. Diferente de CHIARI &

BRENER (1966), usaram como inóculo apenas a papa de hemáceas obtida, em 10 ml de sangue coletado, após duas centrifugações a 3.000 rpm (uma para retirada do plasma e outra para lavagem em solução hipotônica do sedimento). A papa era distribuída por partes iguais em 2 tubos com 5 ml de LIT. Como resultado eles obtiveram o seguinte: 6 casos positivos com uma única hemocultura (30%); 9 casos positivos em 20 (45%) com um número variável de hemoculturas (1 a 14) e 5 (71,4%) casos positivos em 7 com mais do que 4 hemoculturas efetuadas. A maioria dos casos foi diagnosticada na leitura de 30 e 45 dias. A realização da hemocultura apenas com a papa tornou possível a diminuição do número de tubos e, conseqüentemente, menor o tempo gasto de leitura, além do aumento da positividade, se compararmos com o método de CHIARI & BRENER (1966). Neste mesmo ano, seguiram-se mais dois trabalhos, o de MOURÃO & CHIARI (1975) e CHIARI & DIAS (1975), todos empregando meio LIT. O primeiro objetivou verificar se a positividade da hemocultura seria fator dependente do número de vezes em que ela fosse repetida. Com essa intenção, MOURÃO & CHIARI (1975) realizaram 3 séries de hemoculturas em 15 pacientes crônicos, cada série com 3 coletas de 3 ml de sangue em dias sucessivos, que era repetida a cada 30 dias. Cada coleta era semeada diretamente em tubos com 6 ml de meio LIT, cerca de 0,2 ml de sangue por tubo, perfazendo um total de aproximadamente 27 ml de sangue semeado ao final das séries. Por meio deste protocolo, conseguiu-se uma positividade de 86,6%, sendo que 53,3% dos resultados positivos foram obtidos com a primeira série, mais 33,3% na segunda série e nenhum outro caso novo na terceira série. Um dado parecido com o de MOURÃO & MELLO (1975) é que na grande maioria dos pacientes já havia sido comprovada a positividade aos 45 dias. Apesar do excelente resultado, o protocolo é trabalhoso, além de ser mais demorado e exigir uma disponibilidade maior do paciente para comparecer às coletas. O segundo trabalho, e que será explanado a seguir, veio reafirmar os resultados de MOURÃO & MELLO (1975). Empregando a técnica desses autores, CHIARI & DIAS (1975), ao efetuarem hemoculturas em 16 pacientes crônicos com reação de Guerreiro-Machado positiva, comprovaram *T. cruzi* em 7 casos (43,7%). Sendo importante levar em consideração que, em 7 dos 16 indivíduos que compuseram a casuística, o parasita já havia sido comprovado por xenodiagnóstico e/ou por exame de sangue a fresco. O outro ponto a ser ressaltado refere-se ao fato que para cada paciente foram semeados de 6 a 12 tubos, o que significou processar uma quantidade de sangue coletada que variou de 30 a 60 ml, volumes maiores que o usado no trabalho original de MOURÃO & MELLO (1975).

Antes das três citações anteriores, CERISOLA *et alii* (1974) publicaram um importante estudo comparativo da eficiência de 3 diferentes meios de cultura no diagnóstico

através da hemocultura de pacientes crônicos e simultaneamente eles aplicaram 4 caixas de xenodiagnóstico em cada indivíduo. Os meios testados foram: de Warren proposto por ALBUQUERQUE *et alii* (1972); de LIT modificado, segundo CHIARI & BRENER (1966) e de "Warren modificado" segundo NEAL (1973). Mesmo seguindo idêntico procedimento técnico dos autores que propuseram os meios de cultura, os percentuais de positividade foram bem menores do que os encontrados por eles, além de inferiores aos dos xenodiagnóstico praticado paralelamente.

GRUPO		MEIO	TOTAL DE ESTUDADOS	POSITIVOS	%
1	Hemocultura	Warren por Albuquerque	14	1	7,1
	Xenodiagnóstico	-	14	5	35,7
2	Hemocultura	LIT	43	1	2,3
	Xenodiagnóstico	-	43	23	53,5
3	Hemocultura	Warren por Neal	68	2	2,9
	Xenodiagnóstico	-	68	29	42,7

Um outro trabalho importante foi o de MINTER-GOEDBLOED (1976), que empregou comparativamente o xenodiagnóstico e a hemocultura para detectar *T. cruzi* em 4 grupos de hospedeiros: 10 camundongos experimentalmente infectados (fase crônica); 8 gambás infectados naturalmente (*Didelphis azarae*); 5 pacientes na fase aguda e 6 pacientes na fase crônica da infecção. No xenodiagnóstico dos animais foram usadas 4 a 6 ninfas de V estágio de *Rhodnius prolixus* e dos pacientes, 5 ninfas de V estágio de *T. infestans* e algumas vezes de *P. megistus*. Neste caso, a leitura ocorreu 4 semanas após a aplicação e através da dissecação individual dos exemplares. Para hemocultura empregou-se o meio de "Warren modificado"; sendo que para cada paciente ou animal de pequeno porte, semearam-se 4 tubos de meio, com um inóculo de sangue de 0,2 ml por tubo. Estas culturas foram rotineiramente examinadas em intervalos de 2 em 2 semanas e, periodicamente, fazia-se uma lâmina corada do sedimento. O resultado obtido não demonstrou muita diferença entre xenodiagnóstico e hemocultura uma vez que comprovou-se 25 casos positivos pelo primeiro procedimento e 27 casos pelo segundo. A autora atribuiu a maior positividade da hemocultura ao período de observação mais longo (5 meses) e a técnica de exame do sedimento corado, onde foi possível detectar formas amastigotas difíceis de serem visualizadas no exame a fresco. Essa investigação mostrou-se extremamente interessante, pois permitiu a avaliação simultânea dos dois métodos de diagnóstico não apenas em pacientes como também em outros hospedeiros experimental e naturalmente infectados.

Seguindo a linha da infecção experimental, NEAL & MILES (1977 b) semearam quantidades determinadas de formas tripomastigotas, obtidas de camundongos inoculados com duas cepas de *T. cruzi* (Peru e BG), em vários tubos contendo 5 diferentes meios de cultura: agar sangue difásico; meio semi-sólido descrito por Adler e os meios líquidos de Warren, de Boné & Parent e de LIT. Os autores, ao testarem a sensibilidade desses diferentes meios frente a 2 inóculos: 10^2 e 10^3 parasitas, comprovaram o maior número de tubos positivos contendo os meios de Warren e de Boné & Parent; enquanto aqueles com meio de agar sangue, de Adler e de LIT a positividade mostrou-se inferior. O interessante desses dados, é o fato das duas cepas terem tido dificuldade de se adaptar em um meio rico, como o meio LIT, e mostrarem uma boa adaptação ao meio de Warren, confirmando, com isso, a superioridade do meio Warren sobre o meio LIT, conforme os dados de CERISOLA *et alii* (1974). Porém acreditamos que esses resultados não respondem e nem refletem qual o melhor meio para ser empregado no isolamento de diferentes cepas; tanto pelo ponto abordado anteriormente. quanto pela pequena casuística de alguns experimentos. Dando continuidade aos experimentos e utilizando apenas o meio Warren e quantificando novamente o inóculo (1, 10, 10^2 , 10^3 e 10^4 parasitas), os autores verificaram que o inóculo mínimo requerido para positivar pelo menos um tubo de meio é de 10 parasitas. Em outra publicação (1977 a), os mesmos autores estimaram que esse inóculo é de 177 parasitas para infectar o vetor *R. prolixus*, porém valores menores permitiram que alguns exemplares positivassem. Complementarmente ao estudo dos meios, comparou-se a sensibilidade do xenodiagnóstico, empregando ninfas de III e IV estágio de *R. prolixus*, e da hemocultura, utilizando-se o meio de Warren (0,3 ml de sangue por tubo num total de 3 tubos por animal), em detectar *T. cruzi* em macacos (*Erythrocebus patas*) infectados com a cepa Peru. Neste experimento, na fase aguda, a hemocultura foi positiva em 100% e o xenodiagnóstico em 70%; e na fase crônica, mais uma vez a hemocultura mostrou-se mais eficiente que o xenodiagnóstico, uma vez que detectou 76% e este último método 63% dos animais. Entretanto, na fase crônica a associação dos dois métodos foi importante, uma vez que 24% e 37% dos casos foram diagnósticos respectivamente apenas por xenodiagnóstico e hemocultura; os outros 39% tiveram concomitantemente ambos os testes positivos. Estes dados mostraram a importância da associação de dois métodos parasitológicos e reforçaram a recomendação de CHIARI & BRENER (1966), que também conseguiram aumentar a sensibilidade do diagnóstico com o uso simultâneo do xenodiagnóstico e da hemocultura.

Em dois trabalhos complementares e que deram continuidade aos estudos publicados em MINTER-GOEDBLOED (1976), ficou demonstrado o sucesso da hemocultura

no isolamento primário e no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* em 3 grupos diferentes hospedeiros (MINTER-GOEDBLOED, 1978 e MINTER-GOEDBLOED *et alii* 1978). Eles conseguiram isolar parasita em 100% dos grupos, a única exceção ocorreu no subgrupo de pacientes crônicos, onde a taxa foi de 44% (semeando o sangue total) e de 56% (quando cultivou-se, também, plasma ao redor de leucócitos após centrifugação). Esta menor positividade na fase crônica foi atribuída à pequena quantidade de parasitas circulantes, que associada a existência de fatores não favoráveis ou inibidores da multiplicação do parasita presentes no meio de cultura ou mesmo no próprio sangue semeado, contribuiriam para o não crescimento do *T. cruzi*. Paralelo à hemocultura, realizou-se o xenodiagnóstico comparativamente, com a finalidade de promover uma avaliação qualitativa e quantitativa de ambas as metodologias parasitológicas. O diagnóstico e o isolamento procedeu-se em 14 camundongos infectados experimentalmente (fase crônica), 8 gambás (*Didelphis azarae*), naturalmente infectados, e 22 pacientes procedentes de uma região endêmica da Bahia (Brasil), sendo 6 na fase aguda e 16 na fase crônica. Na hemocultura utilizou-se o meio de Warren (maioria das vezes) e o meio de agar sangue 4N; semeando-se 0,1 a 0,2 ml de sangue em cada tubo, num total de 2 a 4 tubos de cultura por hospedeiro. Ocasionalmente, usaram-se 9 tubos na hemocultura dos pacientes. Todos os tubos foram examinados rotineiramente em intervalos de 2 semanas até 6 meses após o cultivo, sendo verificada uma alíquota a fresco e outra corada do mesmo material. Para o xenodiagnóstico, empregaram-se 5 a 40 ninfas no I, IV e V estádios das espécies *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* que foram pesadas antes e após o repasto sangüíneo. Cerca de 2 a 3 semanas após aplicação, retirava-se o final do intestino de cada exemplar de triatomíneo, macerava-se e, a seguir, examinava-se ao microscópio, conforme descrito por MINTER *et alii* (1977). De um modo geral, a positividade do xenodiagnóstico acompanhou a da hemocultura nos exames realizados nos camundongos e nos gambás. Também nos pacientes na fase aguda, ambos os métodos comprovaram *T. cruzi* no mesmo número de pacientes. Porém, nos pacientes crônicos, os resultados não foram homogêneos: os xenodiagnósticos praticados com as ninfas no IV e V estágio de *P. megistus* foram capazes de detectar *T. cruzi* em 69% dos pacientes, enquanto a hemocultura em apenas 44% deles. Quando empregaram-se ninfas de I estágio desta mesma espécie, cuja quantidade em *pool* de sangue ingerido foi bem menor que a quantidade de sangue semeado nos tubos, a taxa de positividade inverteu-se sendo a do xenodiagnóstico de 25% e da hemocultura 44%. Nos xenodiagnósticos realizados com ninfas de V estágio de *T. infestans*, os resultados foram idênticos aos da hemocultura (44% / 44%). Este estudo, em que foram introduzidas no protocolo variáveis qualitativas e quantitativas, deixa claro que tanto

fatores ligados ao protocolo praticado como aqueles intrínsecos ao hospedeiro submetido ao exame irão determinar a positividade da hemocultura, assim como relatamos inicialmente no xenodiagnóstico.

Trabalhando com 31 crianças argentinas sorologicamente positivas na faixa etária entre 2 dias a 5 meses, PAOLASSO & BASSO (1979) investigaram a atuação da hemocultura em relação ao xenodiagnóstico quanto à precocidade em fornecer o diagnóstico da infecção chagásica. Para a hemocultura utilizaram-se 3 meios de cultura: dois bifásicos ("Tobie" e "Senekjie") e um monofásico (infuso de cérebro e coração). Em cada meio foram semeadas, em duplicata, alíquotas de 0,5 ml de sangue. Das 31 crianças investigadas, em apenas 29 realizou-se os dois exames parasitológicos, dessas 10 tiveram hemocultura positiva, entre 9 e 47 dias de cultivo, o que coincidiu com a taxa de positividade do xenodiagnóstico realizado com 20 ninfas de *T. infestans* no III e IV estágio ninfal, todavia o resultado do xenodiagnóstico foi mais tardio. Não ficou claro para nós o motivo do xenodiagnóstico apresentar resultados menos precoces, uma vez que os autores não fizeram as leituras dos exemplares de triatomíneos nos mesmos períodos dos tubos semeados.

CHIARI *et alii* (1979), objetivando a padronização de uma técnica de hemocultura que apresentasse maior rendimento na fase crônica da doença de Chagas, realizaram hemoculturas coletando 30 ml de sangue e processando por protocolos diferentes; em paralelo empregou-se o xenodiagnóstico como técnica de referência, utilizando-se 40 ninfas de *T. infestans* no III estágio. Os pacientes, que compuseram o estudo, provinham da região endêmica de Bambuí (Minas Gerais - Brasil) e apresentavam três reações sorológicas positivas. Os melhores resultados, que forneceram uma positividade de 55% para hemocultura contra 27,5% de xenodiagnósticos positivos, foram obtidos quando o sangue coletado era imediatamente centrifugado e o plasma retirado, sendo logo a seguir a camada de células submetida a uma nova centrifugação com meio LIT e o sedimento desta segunda centrifugação semeado em 6 tubos com 6 ml de LIT. Após ter sido semeado, o meio foi examinado no 15°, 30°, 45° e 60° dias de cultivo, nesta última verificação, os tubos negativos foram centrifugados a 2.000 rpm/15 minutos e o sedimento reexaminado. No procedimento em que o sangue era estocado a 4°C e apenas processado 24 a 48 horas após a coleta, verificou-se uma diminuição do número de tubos positivos em relação àqueles tubos que receberam o sangue também estocado pelo mesmo tempo, mas que o plasma havia sido substituído imediatamente por meio LIT. Os autores acreditam que esta diferença se deva à ação lítica das imunoglobulinas presentes no plasma, ou ao potencial macrofágico dos linfócitos. Porém, eles não relatam qual

o número de casos positivos encontrados em cada um destes 2 grupos e nem incluem um grupo controle, onde o sangue tenha sido estocado à temperatura ambiente.

Fugindo ao padrão dos trabalhos até então publicados, JANKEVICIUS *et alii* (1979) testaram a aplicabilidade do método de hemocultura para a detecção o *T. cruzi* em bolsas de sangue provenientes do banco de sangue de Londrina (Paraná - Brasil), cujos doadores apresentavam a reação de fixação do complemento e a de imunofluorescência positivas, os autores conseguiram comprovar a presença do parasita em 56 (48,3%) frascos dos 116 estocados a 4°C e submetidos à verificação. De cada frasco retirou-se 40 ml de sangue, que foram semeados, após remoção do plasma, em tubos contendo 10 ml de meio LIT. O percentual de 48,3% mostrou-se expressivo se considerarmos a ponderação anterior de CHIARI *et alii* (1979) sobre a ação lítica das imunoglobulinas presentes no plasma.

Voltando aos estudos experimentais relatados na literatura, não poderíamos deixar de descrever o de ORREGO *et alii* (1980) empregando ratos infectados com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*; eles compararam a capacidade de 6 meios de cultivo (agar nutriente da marca Difco; meio produzido pelo Instituto de Pesquisa Fatale Chaben, em Buenos Aires; meio de Warren com sangue disfibrinado de carneiro; meio Warren modificado; meio INDIECH n° 06 e meio LIT) para isolar o *T. cruzi*. Simultaneamente, realizaram a técnica de xenodiagnóstico artificial (*in vitro*), onde 40 ninfas de III estágio de *T. infestans* eram alimentadas através de uma membrana de látex contendo o sangue. Antes de serem submetidas à hemocultura e ao xenodiagnóstico, as amostras de sangue testadas eram previamente diluídas nas seguintes concentrações: 100.000 parasitas por ml (p/ml); 10.000 p/ml; 1.000 p/ml; 100 p/ml e 10 p/ml. Na hemocultura, semeou-se um grupo de tubos com sangue total, e outro apenas com células sanguíneas obtidas após prévia centrifugação para retirada do plasma. Os resultados mostraram que o meio de Warren e Warren modificado foram os que mais rapidamente produziram formas móveis, além do número maior de tubos positivos mesmo nas concentrações menores, endossando a superioridade do meio de Warren sobre o meio LIT, conforme NEAL & MILES (1977 b) verificaram; porém novamente alertamos para o fato dessa avaliação ter sido realizada com apenas uma cepa. Um dado contrário aos demonstrados no decorrer desta introdução é que o sangue centrifugado não aumentou a sensibilidade, além de facilitar a contaminação. Apenas as provas de xenodiagnóstico *in vitro* com sangue diluído a 10 p/ml é que apresentaram resultados inferiores de positividade em relação a hemocultura; talvez o exame das dejeções aos 28 dias e não de todo o conteúdo fecal (obtido por dissecação) tenha determinado este resultado.

RASSI *et alii* (1981) publicaram um trabalho de contestação enfática ao emprego da hemocultura segundo a técnica de MOURÃO & MELLO (1975). Eles não conseguiram reproduzir os resultados obtidos por MOURÃO & MELLO (1975), após repetir o mesmo procedimento laboratorial de hemocultivo recomendado por estes, no diagnóstico de 35 pacientes (9 na fase aguda, 2 na subaguda e 24 na crônica). Tanto na fase subaguda como na crônica não se conseguiu detectar um caso positivo através da hemocultura, sendo os piores resultados já relatados com meio LIT. Acreditamos que os autores da contestação deveriam ter revisto os protocolos por eles executados num grupo maior de indivíduos.

A diferença de positividade segundo o tipo de anticoagulante adicionado ao sangue para hemocultivo mostrou-se como ponto de destaque nos experimentos de BARBOSA *et alii* (1983). Na tentativa de isolamento primário do *T. cruzi* em pacientes crônicos, foram realizados quatro experimentos distintos com número variável de pacientes: 1º experimento = 100; 2º = 100; 3º = 30 e 4º = 20. Nos 3 primeiros o sangue foi coletado com o anticoagulante heparina e no último com EDTA, todos foram semeados em meio LIT e, algumas vezes, em meio 199 mais soro fetal bovino. Nos quatro experimentos, procedeu-se a retirada do plasma e, em apenas 10 das 20 amostras onde utilizou-se EDTA, o sangue inteiro foi cultivado. Nos 230 hemocultivos onde empregou-se heparina, nenhum tubo positivou, porém nos 20 com EDTA em 8 (40%) o parasita cresceu. Estes dados levaram o autor a concluir que a heparina é um agente bloqueador importante no isolamento do *T. cruzi*. Em função destes achados, realizaram-se novos experimentos empregando duas cepas de *T. cruzi* ("Y" e "José") previamente isoladas e mantidas em LIT. Aos tubos contendo as cepas adicionou-se heparina e a seguir acompanhou-se o crescimento; um grupo sem heparina foi acompanhado em paralelo. Os resultados obtidos ficaram difíceis de ser interpretados, uma vez que os autores só descrevem aqueles em que além da heparina também adicionaram-se soro específico, de paciente chagásico, e normal, de indivíduo sem infecção, ao cultivo. Em outra série de experimentos, duas baterias de tubos foram semeadas com as mesmas cepas: em uma bateria adicionou-se 10, 20, 30, 40 e 50 % de soro específico de paciente chagásico e, na outra, as mesmas proporções de soro de não chagásico e não inativado. Em ambas as baterias houve crescimento razoável, com até 20% de soro, e os parasitas mantiveram-se vivos até 38 dias de semeados. Os achados de BARBOSA *et alii* (1983) não foram confirmados por GALVÃO *et alii* (1988), ao empregar paralelamente os anticoagulantes: heparina e EDTA, no sangue coletado para hemocultura de 13 pacientes chagásicos. A autora e seus colaboradores encontraram uma positividade de 30,7% e 38,4%, respectivamente, nas amostras de sangue com heparina e EDTA. Em relação ao número de tubos positivos o resultado ficou sendo de

10,9% para aqueles provenientes de coletas feitas com heparina e de 13,1% com EDTA, demonstrando não haver diferença significativa nos percentuais de positividade dos cultivos com heparina daqueles com EDTA.

A importância da associação da hemocultura com o xenodiagnóstico na detecção do *T. cruzi* foi mais uma vez reforçada pelos dados de BASSO & MORETTI (1984), que avaliaram a presença do *T. cruzi* em 66 indivíduos divididos em 3 grupos distintos. Em 10 deles já havia sido comprovada a presença do parasita através do xenodiagnóstico, em outros 40, com idade entre 15 a 40 anos, pelo menos duas provas sorológicas foram positivas para infecção chagásica, e os 16 restantes estavam sendo submetidos a tratamento quimioterápico contra a infecção. Nestes dois últimos grupos, além da hemocultura realizou-se simultaneamente o xenodiagnóstico e o método de concentração de Strout. Para a hemocultura utilizaram-se 10 ml de sangue coletado com heparina, que após duas centrifugações prévias para lavagem da papa, foi semeado em quatro tipos de meios apropriados: tendo dois um meio de infuso de cérebro-coração (ICC) e mais dois o meio bifásico de Tobie. E para o xenodiagnóstico, empregaram-se 40 ninfas de *T. infestans* no IV estágio evolutivo. Com este protocolo verificou-se que no primeiro grupo a hemocultura foi capaz de confirmar o resultado do xenodiagnóstico em 90% (9 positivos em 10); no segundo grupo a hemocultura revelou 55% (22 positivos em 40), o xenodiagnóstico 48% (19 positivos em 40) e o método de Strout nenhum caso positivo; no terceiro grupo todos os métodos apresentaram-se negativos (0 positivos em 16). A associação da hemocultura com o xenodiagnóstico, no segundo, possibilitou aumentar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico para 65% (26 positivos em 40). Outro dado interessante é que, em algumas hemoculturas, o desenvolvimento das formas parasitárias se deteve no estágio de amastigota e não se observou evolução mesmo após o repique. Isso foi possível de ser demonstrado pelo exame corado de material semeado. Devido a isto, os autores enfatizam a necessidade de se realizar rotineiramente o exame de preparações coradas na busca de amastigotas.

O rendimento da hemocultura na seleção de pacientes submetidos a tratamento quimioterápico anti-*T. cruzi* ou mesmo como critério de cura dos pós-tratados, nem sempre tem sido concordantes. Dois trabalhos, publicados neste sentido, demonstraram valores bem distintos. Um deles, o de PEREIRA *et alii* (1989), associou a hemocultura, o xenodiagnóstico e a lise mediada pelo complemento (LMCo), na tentativa de aumentar o número de candidatos para tratamento específico. O protocolo empregado para os 3 métodos foi o seguinte: hemocultura conforme técnica preconizada por CHIARI *et alii* (1979), xenodiagnóstico com 40 ninfas de *T. infestans* segundo CERISOLA *et alii* (1974) (a aplicação foi repetida 3 vezes,

com intervalo médio de 10 dias); lise mediada pelo complemento pela técnica descrita por LEVY *et alii* (1988). Os 3 métodos foram realizados em 36 pacientes chagásicos crônicos e em duas séries sucessivas, intercaladas com um mínimo de 60 dias. Ao final da segunda série comprovou-se *T. cruzi* através da hemocultura e do xenodiagnóstico em respectivamente 7 (19,4%) e 13 (36,1%) dos pacientes; sendo que 17 (47,2%) dos pacientes foram positivos em pelo menos uma das provas parasitológicas e 19 apresentaram ambas as provas negativas. Enquanto que LMCo mostrou-se capaz de detectar níveis de anticorpos líticos em 9 (53%) dos 17 pacientes parasitologicamente positivos e em 4 (21%) dos 19 negativos pelo xenodiagnóstico e hemocultura; 9 dos 36 pacientes investigados tiveram resultado do LMCo ora positivo ora negativo (3 em 17 XENO/HEMO+ e 6 em 19 XENO/HEMO-). Com estes dados, os autores concluíram que a comprovação parasitológica, especialmente pelo xenodiagnóstico, embora sendo insatisfatória, constituiu-se no instrumento mais seguro para o médico clínico. Um resultado diferente na positividade da hemocultura foi encontrado por GALVÃO *et alii* (1993) ao acompanhar através dos testes sorológicos e parasitológicos, grupos diferentes de pacientes tratados e não tratados com drogas anti-*T. cruzi*. Neste acompanhamento empregaram-se os métodos da hemocultura, da lise mediada pelo complemento (LMCo) e da sorologia convencional. A técnica de hemocultura utilizada foi a descrita por CHIARI *et alii* (1979) com algumas modificações que consistiram basicamente na diminuição do tempo de centrifugação e no cultivo não apenas da papa de hemácias, mais também do *pellet* obtido por centrifugação do plasma. Dos 101 pacientes não tratados (98% com sorologia convencional positiva e 99% com o teste de LMCo positivo), a hemocultura foi positiva em 47 (47%); e naqueles 47 pacientes tratados, onde 96% dos soros permaneceram positivos na reação de imunofluorescência e na LMCo, a hemocultura detectou *T. cruzi* em 12 destes (24%). Nos casos tratados e considerados curados pelo critério de negatividade do LMCo, a hemocultura apresentou-se negativa. Ao analisarmos uma das tabelas da publicação, verificamos que a hemocultura foi realizada mais de uma vez no mesmo paciente, o que acreditamos ter possibilitado uma chance maior em detectar o parasita através deste método.

BRONFEN *et alii* (1989), ao empregarem a hemocultura, conforme técnica preconizada por CHIARI *et alii* (1979), no isolamento de amostras de *T. cruzi* em 59 pacientes crônicos provenientes de diversas regiões endêmicas de Minas Gerais, não conseguiram reproduzir os bons resultados relatados por estes autores, além de obterem uma melhor taxa de positividade com o xenodiagnóstico aplicado em paralelo. No xenodiagnóstico foi aplicado, simultaneamente, um número grande de exemplares: 40 ninfas no III estágio de *P. megistus*, 40 ninfas de III estágio de *T. infestans* e 40 ninfas no I estágio de *D. maxima*. No período de

leitura das ninfas, além da verificação microscópica do material fecal, também semeou-se o conteúdo intestinal obtido de cada 10 exemplares em meio LIT; este procedimento recebeu o nome de xenocultura. A positividade da hemocultura foi de 24,1% (14/58) e do xenodiagnóstico com uma, duas e três espécies ficou sendo de respectivamente 23,7% (14/59), 32,2% (19/59), 42,4% (25/59). A "xenocultura" acresceu somente 1,7% na positividade dos tubos semeados com material negativado ao exame direto. Vinte e nove pacientes (49,2%) tiveram pelo menos positividade em um dos métodos parasitológico, sendo 4 somente pela hemocultura, 15 apenas pelo xenodiagnóstico e 10 por ambos os métodos. Estes dados novamente demonstraram a favorável associação do xenodiagnóstico com a hemocultura. Os autores ressaltam que a taxa de 49,2% de positividade foi com apenas uma aplicação do xenodiagnóstico e a realização de uma única hemocultura por paciente e que, provavelmente, esta taxa se elevaria caso os pacientes fossem submetidos mais vezes aos mesmos procedimentos. BRONFEN *et alii* (1989) também atribuem a diferença de seus resultados com os de CHIARI *et alii* (1979) ao fato de que as amostras de *T. cruzi* circulantes nas áreas investigadas por este grupo de pesquisadores tinham características biológicas e bioquímicas diferentes. No levantamento de BRONFEN *et alii* (1989) as amostras isoladas procediam de pacientes de várias regiões do Estado de Minas Gerais e não de uma única região, como no caso de CHIARI *et alii* (1979).

Resultados muito expressivos e interessantes foram encontrados por JÖRG & BÁEZ (1993) ao empregarem a hemocultura para evidenciar o *T. cruzi* circulante em 90 pacientes crônicos na forma indeterminada da doença de Chagas. Estes indivíduos procediam de diversas regiões endêmicas na América Latina, tinham idade entre 23 e 43 anos e apresentavam, pelo menos, 2 reações sorológicas positivas. Seguindo protocolo semelhante ao de CHIARI *et alii* (1979), eles coletaram 15 ml de sangue venoso, que foram distribuídos, após separação do plasma e lavagem da papa de hemáceas, em 3 tubos contendo 5 ml de meio LIT cada um, que eram repicados a cada 15 dias para outro tubo contendo meio novo. Nos casos em que o cultivo resultou negativo, repetiu-se a hemocultura até 8 vezes. Com este protocolo foi possível detectar parasita com uma, duas e variadas hemoculturas (3 a 8) em respectivamente 40 (44,4%), 60 (66,6%) e 78 (86,6%) dos pacientes investigados. Os autores identificaram que quanto maior o tempo de afastamento do indivíduo da área endêmica, maior número de hemoculturas foram necessárias para encontrar o *T. cruzi* na circulação. Entre os fatores que eles atribuíram para o bom rendimento, estão a remoção do plasma e as modificações introduzidas no LIT: substituição da hemoglobina por hemina, o emprego de soro fetal bovino desglobulinizado, a adição do estearato de sódio ao meio e o uso de

reagentes com alto grau de pureza. Parece que também contribuíram, para os melhores resultados, o repique do sangue semeado para outro com meio LIT novo e a pesquisa de material corado além do exame da gota fresca.

SANTOS *et alii* (1993), na tentativa de avaliar a sensibilidade do xenodiagnóstico e da hemocultura através de uma unificação da quantidade de sangue processada por ambos, utilizaram os 2 métodos no isolamento do *T. cruzi* em 25 pacientes chagásicos crônicos procedentes de diversas regiões endêmicas do Brasil. Para o xenodiagnóstico empregou-se o procedimento direto (*in vivo*) e indireto (*in vitro*) e tanto num como noutro aplicaram-se 40 ninfas de IV estágio, 20 de *T. infestans* e 20 de *P. megistus*. Os meios LIT e NNN foram escolhidos para o cultivo e a quantidade de sangue semeada nos 3 tubos destinados para cada meio foi baseada na quantidade de sangue ingerida pelos triatomíneos aplicados diretamente no indivíduo. Esse mesmo volume foi ofertado, através de mamadeiras apropriadas, às 40 ninfas destinadas ao xenodiagnóstico indireto. Nesta avaliação o xenodiagnóstico *in vivo* e *in vitro*, conjuntamente, mostrou-se mais eficiente que a hemocultura, sendo as seguintes as taxas de positividade correspondentes a cada método: 24% (6/25) e 0% (0/25).

Novas perspectivas na utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção chagásica foram criadas com a publicação de LUZ *et alii* (1994 a) que obtiveram excelentes resultados ao empregarem o procedimento de CHIARI *et alii* (1979) com pequenas modificações introduzidas na técnica, tais como: processamento de sangue imediatamente após a coleta; diminuição do tempo total de centrifugação; homogeneização suave e exame até 120 dias de cultivo. Um outro item do protocolo a ser destacado é que as duas centrifugações processaram-se a 4°C. A casuística de indivíduos submetidos ao exame foi composta de 52 pacientes não tratados, a grande maioria com idade entre 20 a 59 anos, na fase crônica da infecção e com pelo menos 3 reações sorológicas positivas para antígeno de *T. cruzi*. Em um grupo de 34 pacientes, dos 52 investigados, realizaram-se 3 hemoculturas, onde 32 (94%) foram positivos, sendo: 27 (79%) na primeira hemocultura; 4 (12%) na segunda e 1 (3%) na terceira. A maioria das hemoculturas apresentaram positividade aos 30 dias (48%) e 60 dias (34%) de cultivo; somente 14% e 4% foram positivos aos 90 e 120 dias respectivamente. Em relação ao número de tubos positivos, 31 (59%) dos pacientes tiveram apenas 1 a 2 tubos positivos entre os seis semeados com a papa; 8 (16%) pacientes com 3 tubos positivos e 13 (25%) pacientes com 4 a 6 tubos positivos.

Os percentuais de detecção de *T. cruzi* pelo método de hemocultura verificados por LUZ *et alii* (1994 a) estão entre os mais altos descritos até o momento na literatura,

chamando atenção, uma vez que os autores compuseram a casuística com pacientes crônicos cuja parasitemia é baixa. Na tentativa de reproduzir esses resultados, alguns grupos de pesquisadores resolveram testar o método utilizado por LUZ *et alii* (1994 a, b) em amostras de sangue coletadas e processadas em condições de campo. Um deles foi o de FERNANDES *et alii* (1995) que não conseguiram alcançar tão bons resultados como os anteriores. Dos 30 pacientes estudados provenientes do município de Porteirinha (MG), 16 (53,3%) foram positivos pela hemocultura e 4 (13,3%) pelo xenodiagnóstico aplicado concomitantemente. Nesta investigação o sangue foi coletado na própria residência dos indivíduos e estocado em gelo até 3 a 4 horas e a seguir processado em laboratório improvisado no hospital da região. No segundo estudo, mais amplo e detalhado, MORA (1996) avaliou a sensibilidade e especificidade do procedimento de LUZ *et alii* (1994 a, b), com algumas adaptações para o trabalho do campo, em 117 indivíduos: 85 chagásicos e 32 controles (sorologia negativa). Toda a manipulação do sangue realizou-se num laboratório na área rural. Além da papa de hemáceas (3 tubos), semeou-se 1 tubo com o sedimento obtido pela centrifugação do plasma e um outro com a camada leucocitária (*buffy coat*). No final, dos 85 chagásicos, 34 (40%) tiveram hemocultura positiva. Este índice representou pouco mais da metade do encontrado por LUZ *et alii* (1994 a) com apenas uma hemocultura (79%). No acompanhamento feito durante 120 dias, a taxa de positividade foi de 17 (50%) no 30º dia, 14 (41%) no 60º dia, 1 (3%) no 90º dia e 2 (6%) aos 120 dias, mostrando que a maioria das hemoculturas com *T. cruzi* foi detectada até os 60 dias. O tubo contendo a camada leucocitária (denominado T1) foi o que apresentou maior positividade (47,54%). A autora concluiu que a hemocultura como método diagnóstico para detectar o *T. cruzi* em chagásicos crônicos foi comparável ao xenodiagnóstico, porém as principais inconveniências foram o seu alto custo, baixa sensibilidade e necessidade de um acompanhamento por tempo prolongado.

Existem relatos, na literatura, do emprego do método de cultura de linhagens celulares como um outro procedimento possível de ser empregado tanto no isolamento como na detecção do *T. cruzi*. MARTINEZ-SILVA *et alii* (1969), por exemplo, testaram comparativamente: o cultivo em meio NNN; a inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos e a cultura de célula (linhagem celular DC₂) como métodos de diagnóstico do *T. cruzi*. Os resultados mostraram que os três métodos apresentaram igual eficiência para detectar o parasita na fase aguda dos camundongos infectados experimentalmente. Entretanto, naqueles camundongos (em número de 30) com a infecção crônica, o método de diagnóstico através da cultura celular comprovou ser mais sensível que os outros dois procedimentos técnicos, uma vez que detectou a infecção em todos os camundongos (100%), enquanto que as

técnicas de cultivo em NNN e inoculação em animal comprovaram igualmente *T. cruzi* em 28 (93,3%) dos camundongos; a diferença, porém, não foi significativa. Também o cultivo em meio NNN e a inoculação intracerebral apresentaram um resultado mais tardio em relação ao cultivo celular, que aos 11 dias permitiu, precocemente, o isolamento do parasita. UMEZAWA & KLOETZEL (1977), assim com MARTINEZ-SILVA *et alii* (1969) utilizaram o modelo experimental camundongo na fase crônica e conseguiram detectar *T. cruzi* nesses animais após passar o sangue por etapas de lavagem e a seguir inocular em células LLC-MK₂. O maior obstáculo deparado pelo autores foi a contaminação das células por microorganismos. Apesar de UMEZAWA & KLOETZEL (1977) justificarem o emprego da hemocultura em linhagens celulares LLC-MK₂ para fins de diagnóstico do *T. cruzi* no homem, parece-nos que os resultados menos promissores do que os obtidos com meios acelulares, além dos problemas de contaminação das linhagens e de implantação em laboratórios clínicos de infra-estrutura especial para as culturas fizeram com que o uso de meios celulares não fossem incluídos no diagnóstico em larga escala de pacientes.

Todo esse histórico vem mostrar a evolução do procedimento da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* e a obtenção de resultados bem mais significativos nos últimos anos. Mesmo assim, a hemocultura tem sido menos empregada que o xenodiagnóstico no diagnóstico da fase crônica da infecção chagásica. Isto fica claro quando comparamos o número de publicações existentes na literatura sobre o emprego de uma e outra. Sua utilização fica mais restrita ao isolamento e manutenção em laboratório do parasita. Na discussão do nosso trabalho abordaremos pontos relevantes que justificam essa menor aplicabilidade.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Nas duas últimas décadas, novas linhas de pesquisa no campo da biologia molecular vêm-se desenvolvendo na tentativa de se obter um método de diagnóstico mais sensível e específico de que os até então empregados na detecção dos agentes infecciosos. Dentre essas, destacam-se as metodologias que têm como alvo a detecção do DNA (ácido desoxirribonucléico) e o RNA (ácido ribonucléico) do patógeno. Esta estratégia de diagnóstico tem as duas grandes vantagens, de não depender diretamente da imunocompetência do organismo infectado e do tempo da infecção, como nos testes sorológicos; além de só detectar o DNA na presença do patógeno, visto que esta estrutura não permanece livre no organismo infectado por muito tempo (BARKER, 1990).

A 1ª geração de experimentos enfocava o emprego de seqüências de nucleotídeos complementares ao material genético a ser detectado. Essas seqüências, chamadas sondas moleculares marcadas, eram sintetizadas a partir da clonagem molecular (polinucleotídeos) ou por síntese química (oligonucleotídeos). Este procedimento técnico consiste, basicamente, de uma primeira etapa, que seria a obtenção de uma seqüência de DNA ou RNA específica do parasita através da purificação, clonagem e seqüenciamento. Achada a região de interesse, a sonda é construída e marcada de forma a possibilitar sua seletiva identificação (BRASILEIRO FILHO & PENA, 1992). A segunda etapa, ou hibridização, é a detecção propriamente dita do DNA na amostra a ser analisada pela sonda. Havendo seqüência de DNA complementar à sonda, ocorre hibridização (BRASILEIRO FILHO & PENA, 1992).

Em uma pequena revisão, BARKER (1990) expôs uma tabela com alguns trabalhos que aplicaram as sondas de DNA no diagnóstico de *T. cruzi*.

Comparison of Trypanosoma cruzi Probes (BARKER, 1990)

<i>Parasites / sample</i>	<i>Probe</i>	<i>Sample Preparation^a</i>	<i>Number of Patients</i>	<i>Ref.</i>
<5	<i>Cloned genomic, DNA</i>	<i>Direct spotting^b</i>	<i>Animal model</i>	<i>Ashall and Miles (1988).</i>
<5	<i>Total genomic, DNA</i>	<i>Direct spotting</i>	<i>Animal model</i>	<i>Ashall et al. (1988).</i>
30	<i>Cloned genomic, DNA</i>	<i>Purified DNA^c</i>	<i>None</i>	<i>Gonzalez et al. (1984).</i>
ND ^d	<i>Cloned or total kDNA</i>	<i>Purified DNA</i>	<i>19</i>	<i>Macina et al. (1987).</i>
10 ⁵	<i>Cloned or total DNA</i>	<i>Culture spotted^e</i>	<i>None</i>	<i>Sanchez et al. (1984).</i>
<10	<i>Oligo (kDNA)</i>	<i>Purified DNA</i>	<i>None</i>	<i>Sturm et al. (1989).</i>

^a *Method of preparing biological samples for hybridization.*

^b *Mouse blood was spotted directly onto hybridization membrane without lysis.*

^c *DNA was purified by phenol/chloroform extraction from cultured organisms.*

^d *Not done.*

^e *Organisms grown in culture were spotted directly onto hybridization membrane.*

DEGRAVE (1992), em um capítulo onde descreve o diagnóstico molecular da doença de Chagas, relata que, apesar das sondas moleculares representarem um potencial na detecção e tipagem do parasito, seu emprego nos exames de rotina ainda não ocorreu. O autor atribui este fato, em parte, à dificuldade de automatização; à baixa sensibilidade, em alguns casos; e a difícil reprodutibilidade quando a sonda não é marcada radioativamente. Essas limitações fizeram com que o diagnóstico, através de sondas moleculares, viesse a ser substituído, ou associado, ao procedimento de amplificação de DNA *in vitro*, denominado Reação em Cadeia da Polimerase.

Recentemente, com o surgimento da tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), um grande avanço foi conseguido no diagnóstico molecular das doenças genéticas e na identificação de microorganismos, bem como na medicina legal (ERLICH *et alii*, 1991; BRASILEIRO FILHO & PENA, 1992). A PCR consiste na síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, utilizando basicamente dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares aos extremos do segmento de DNA de interesse com 18 a 30 bases; uma enzima DNA polimerase; 4 (quatro) desoxiribonucleotídeos (*deoxinucleoside triphosphates* - *dNTPs*); cofatores (íons Mg^{2+} e tampão); e 3 (três) fases térmicas (desnaturação, hibridação e extensão). Na primeira fase térmica da reação, chamada desnaturação, é fornecida uma alta temperatura, usualmente de 94 a 98°C, para que ocorra a separação das fitas de DNA alvo; na fase seguinte, ou hibridação (denominada, em Inglês, de *annealing*), diminui-se a temperatura (27 a 65°C) com a finalidade de que se suceda a "fixação" dos oligonucleotídeos à seqüência complementar da fita de DNA; e na terceira e última etapa, que é a de extensão, a temperatura é novamente aumentada, e a DNA polimerase sintetiza, a partir dos oligonucleotídeos "fixados", uma nova fita complementar à que serviu de molde. Ao final dessa etapa, um ciclo é completado, resultando em uma fita de DNA alvo duplicada, (MULLIS & FALOONA, 1987). Geralmente, 25 a 35 ciclos térmicos são suficientes para produzir 100 ng - 1µg de DNA de uma única cópia de seqüência humana a partir de 50 ng de DNA genômico (TAYLOR, 1993). Esses repetidos ciclos de amplificação conduzem teoricamente a uma síntese exponencial do fragmento de DNA, cujo comprimento é a soma dos oligonucleotídeos mais a distância entre eles na seqüência a ser amplificada (ERLICH *et alii*, 1991). O produto da amplificação, intacto ou após a digestão, pode ser identificado e caracterizado por *dot blots*, por *Southern blots* ou simplesmente por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, corados respectivamente com brometo de etídeo ou prata (BRASILEIRO FILHO & PENA, 1992; TAYLOR, 1993).

A reação em cadeia da polimerase foi desenvolvida por um grupo de cientistas da Cetus Corporation e a primeira publicação data de 1985. Neste trabalho SAIKI *et alii* (1985) amplificaram, *in vitro*, empregando a enzima DNA polimerase (Klenow fragmento de *Escherichia coli*), a seqüência genômica da β -globina humana. Eles combinaram o procedimento da PCR com a técnica de hibridização, utilizando sondas marcadas, e conseguiram promover o diagnóstico pré-natal da anemia falciforme (SAIKI *et alii*, 1985).

Após o trabalho de SAIKI *et alii* (1985), iniciou-se uma nova era na biologia molecular, porém o procedimento básico inicial necessitava de aprimoramentos. Um deles foi conquistado com a substituição da enzima Klenow polimerase, que ao inativar-se à alta

temperatura fornecida para a separação das fitas de DNA, tornava necessária a adição de mais enzimas ao final de cada etapa de desnaturação, dificultando a automatização e possibilitando a ocorrência de falhas na reação de amplificação. Foi então que SAIKI *et alii* (1988) tiveram a idéia de substituir essa polimerase termolábil por uma que se mantivesse estável nas fases térmicas e introduziram à reação uma DNA polimerase termoestável, isolada de uma bactéria termofílica, *Thermus aquaticus* (Taq DNA polimerase).

A Taq polimerase não só permitiu a simplificação do procedimento técnico, como também aumentou a especificidade, o rendimento, a sensibilidade e possibilitou que seqüências maiores pudessem ser amplificadas (SAIKI *et alii*, 1988). Novas enzimas termoestáveis vêm sendo avaliadas, tais como DNA polimerase de *Thermus thermophilus* (Tth); DNA polimerase de *Bacillus sterothermophilus* e uma outra extremamente termofílica, a DNA polimerase de *Thermococcus litoralis* (Vent polimerase) (TAYLOR, 1993). Com relação à primeira enzima, Tth polimerase, devido a sua capacidade adicional de catalisar a reação de transcrição reversa (*reverse transcription - RT*), vem sendo testada na reação em cadeia da polimerase a partir de RNA (RT - PCR) (ERLICH *et alii*, 1991).

Um outro aperfeiçoamento na reação em cadeia de polimerase *in vitro* foi a introdução do procedimento *hot start*. Esse procedimento adveio da necessidade de promover modificações que melhorassem a especificidade e a precisão das amplificações realizadas em amostras com baixas concentrações de seqüências alvos. Nesses PCR eram freqüentes ocorrer ligações de *primers* a seqüências não alvo (*mis-priming*), bem como à extensão de *primers* complementares que tendiam a se hibridizarem um ao outro (*primer dimerization*), gerando um produto amplificado inespecífico. Com a realização de mais estudos, observou-se que quando a enzima era adicionada ou ativada no momento em que a temperatura estivesse elevada, reduzia-se ou eliminava-se a presença de *mis-priming* e de *primer dimerization*; dessa verificação originou-se o procedimento *Hot Start PCR* (ERLICH *et alii*, 1991). Entretanto, a necessidade de abertura e fechamento manual dos tubos para acrescentar a enzima possibilitava a contaminação da reação. Na tentativa de automatizar o procedimento *Hot Start*, CHOU *et alii* (1992) experimentaram introduzir uma pequena pérola de cera purificada dentro do tubo próprio para amplificação, que serviria como barreira entre os reagentes (nucleotídeos, *primers*, Mg²⁺, tampão) e a enzima mais a amostra de DNA extraído. A cera se liquefaria, no momento em que a temperatura atingisse a primeira etapa de desnaturação, promovendo a mistura de todos os componentes e conseqüente sincronização da reação. Os resultados obtidos com a utilização dessa pequena pérola de cera mostraram, além do aumento da sensibilidade, um decréscimo na contaminação. Atualmente este sistema mecânico de

separação pode ser substituído pelo simples emprego de uma nova DNA polimerase com atividade térmica, a DNA Taq polimerase "modificada" (BIRCH *et alii*, 1996). Esta enzima, por não apresentar atividade à temperatura ambiente, mas somente após ter atingido valores altos, impede que a reação comece a se processar antes, promovendo com isso maior sensibilidade, especificidade e rendimento à reação de amplificação como um todo.

O método da PCR, apesar dos avanços no seu aperfeiçoamento, continua apresentando alguns problemas no seu emprego de rotina no laboratório. Um deles é o aparecimento de resultados "falso positivos", gerados, em grande parte, pela contaminação com DNA externos, que podem ser provenientes de produtos de amplificação; de contaminação cruzada entre várias amostras amplificadas concomitantemente; de manipulações freqüentes com outras técnicas de biologia molecular que estejam sendo realizadas em laboratórios de uso comum com a PCR (KITCHIN & BOOTMAN, 1993). Várias estratégias são sugeridas para evitar que DNA externos sejam transferidos para as amostras em teste. Uma delas é a separação física das áreas para a realização das 3 etapas da PCR, que são: preparação das soluções; preparação e adição das amostras biológicas; e análise de produto amplificado. O procedimento de cada etapa deverá ser realizado com equipamentos em separado e estes passarão por um processo de descontaminação freqüente com luz ultravioleta ou substâncias que degradem o DNA (ex.: hipoclorito de sódio). Também se propõem medidas tais como: incorporação do nucleotídeo dUTP ao produto amplificado pela substituição do dTTP por dUTP ou pelo emprego de iniciadores contendo uracil (U), com a adição complementar da enzima URACIL DNA glicosilase (UDG) nas amplificações futuras. Essa enzima remove a base uracil impedindo que a "fita contaminante" sirva de molde; tendo a vantagem de ser inativada durante a desnaturação, não atuando conseqüentemente na PCR da amostra contendo DNA a ser amplificado. Outra maneira de impedir a contaminação refere-se à utilização de derivados de isopsoralen que, ao serem adicionados nos tubos contendo os reagentes da reação e ao término da PCR, forem expostos à radiação ultravioleta (UV), agem impedindo a ação da enzima DNA polimerase sobre as fitas de DNA, conseqüentemente evitam a duplicação da seqüência alvo (RYS & PERSING, 1993). Em relação aos materiais de consumo, estes deverão ser descartáveis e os reagentes aliquotados em pequenas quantidades, pois verificou-se que quanto menos manipulação, menor o risco de contaminação. Esses procedimentos contribuem para a reprodutibilidade e controle de qualidade da reação (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990). Para monitorar a presença de contaminação, recomenda-se incluir uma amostra comprovadamente negativa no estágio de extração e tubos contendo a mistura dos reagentes para PCR sem DNA extraído na etapa de amplificação.

Também, complementarmente, pode-se expor um tubo aberto durante a preparação das amostras e, a seguir, "submetê-lo" à amplificação (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; KITCHIN & BOOTMAN, 1993).

Os resultados "falso positivos" podem, também, ser devido a ampliações não específicas, derivadas da hibridação dos iniciadores a sítios que não sejam da seqüência alvo. Neste caso, recomenda-se ocasionalmente a hibridização do produto amplificado com oligonucleotídeos sintéticos ou a análise da seqüência. (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; KITCHIN & BOOTMAN, 1993).

Uma outra situação, que deve ser controlada na PCR, é a presença de resultados "falso negativos", resultantes, algumas vezes: do uso insuficiente de *primers* homólogos; da presença de substâncias inibidoras na amostra de DNA extraído (ex.: heparina, proteinase K, resíduo de fenol); ou de insuficientes números de ampliações. Isso é detectado, na maioria das vezes, empregando-se na reação da PCR amostras positivas em paralelo às testadas ou através da amplificação de outras seqüências comprovadamente existentes na amostra testada (ex.: *primers* para uma seqüência de β -globina). Além dessas, existem outras situações que conduzem a um falso resultado, como, por exemplo, uma variação genética na seqüência alvo que impede a hibridação dos *primers*. Isso ocorre especialmente com vírus, e a utilização de um conjunto de *primers* simultaneamente resolve, em parte, o problema (KITCHIN & BOOTMAN, 1993).

O emprego da PCR tem-se tornado cada vez mais abrangente. A partir da primeira aplicação no diagnóstico da anemia falciforme, ela vem sendo utilizada na identificação de doenças genéticas, tais como: fibrose cística, fenilcetonúria, *osteogenesis imperfecta* (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990).

Em adição, a PCR tem facilitado a análise de alelos específicos associados a doenças auto-imunes e a identificação de conhecidas mutações nos gens da família *ras*, envolvidos na formação de tumores humanos (ERLICH *et alii*, 1991). Nas situações judiciais, a PCR tem permitido, através da amplificação de seqüências polimórficas em espécimes biológicas (sangue, esperma, cabelo), o esclarecimento de casos envolvendo indivíduos suspeitos (BEROLDINGEN *et alii*, 1989). Sua contribuição se faz presente na área da antropologia onde, combinada com o seqüenciamento direto, está sendo usada na análise polimórfica do DNA mitocondrial de populações (WRISCHNIK *et alii*, 1987) e na caracterização de DNA de animais existentes a milhares de anos (PÄÄBO, 1989). Também tem-se mostrado útil na caracterização de patógenos (ROLLO *et alii*, 1987). Nas pesquisas

básicas de biologia molecular, assumiu o papel de tecnologia recombinante de escolha na obtenção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA (ERLICH *et alii*, 1991).

A aplicação da PCR também se expandiu para o diagnóstico e caracterização de agentes infecciosos e parasitários em amostras clínicas e ambientais (sangue, fragmentos de tecido, comida, água), cuja base metodológica é a construção de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos que amplifiquem seqüências de DNA do patógeno, sem amplificar DNA do hospedeiro e nem de outro organismo. A grande conquista na parte de diagnóstico por PCR foi a capacidade de revelar baixas concentrações do parasita através da amplificação do seu DNA, não detectáveis pelas técnicas convencionais (BRASILEIRO FILHO & PENA, 1992; WEISS, 1995).

Com essa nova perspectiva de diagnóstico, iniciaram-se vários ensaios metodológicos utilizando a PCR na detecção do *T. cruzi*. Uma das primeiras aplicações foi realizada por MOSER *et alii* (1989) que, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers* - TCZ1 e TCZ2) para uma seqüência de 195 pares de base (*base pairs* - *bp* = pares de base - pb), encontrada em 9% do DNA nuclear do parasito, conseguiram amplificar um fragmento específico de 188 pb de 4 clones de *T. cruzi*. O mesmo fragmento não foi encontrado quando submeteu-se à amplificação o DNA nuclear de *Leishmania sp*, de tripanosomas africanos, bem como DNA humano e de camundongos. Eles também demonstraram que metade do DNA nuclear de um único parasita submetido a PCR era capaz de ser detectado em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo. Ao aplicar o mesmo protocolo para diagnosticar *T. cruzi* em 3 espécies de triatomíneos infectados experimentalmente e em 2 amostras de 2 ml de sangue coletadas de pacientes chagásicos crônicos, os autores obtiveram resultado positivo apenas nas amostras de fezes e urina dos 3 vetores. Atribuiu-se aos dois PCR negativos das amostras de sangue a parasitemia estar abaixo do limite de detecção do ensaio.

No mesmo ano, STURM *et alii* (1989), tendo como objetivo a amplificação dos minicírculos de kDNA, que existem em cerca de $5 - 20 \times 10^3$ por *T. cruzi*, conseguiram fragmentos de 83 e 122 pb das regiões conservadas, e de 330 pb das regiões variáveis. Para obtenção desses fragmentos, empregaram 3 pares de oligonucleotídeos (par S67 e S34 - produto = região conservada; S33 e S34 - produto = região conservada e S35 e S36 - produto = região variável) construídos a partir das regiões conservadas de várias cepas de *T. cruzi*. Experimentalmente detectaram o equivalente a 0,1% do minicírculo contido em uma célula de parasita. Quando o kDNA de *Trypanosoma rangeli* serviu de alvo para a hibridação do par de oligonucleotídeos que amplificavam a região variável, nenhuma banda foi produzida. Empregando os outros 2 pares de oligos, eles obtiveram o mesmo resultado que

para *T. rangeli* com o kDNA dos protozoários: *Blastocrithidia culicis*, *Endotrypanum sp.*, *Leishmania tarentolae* e *Leptomonas collosoma*. Essas não amplificações demonstraram a relação da especificidade desses oligonucleotídeos com *T. cruzi*.

Nessa mesma linha de pesquisa, ÁVILA *et alii* (1991) introduziram, no protocolo da PCR, uma solução que permitiu a estocagem, à temperatura ambiente, do sangue coletado para o teste e um procedimento para a clivagem dos minicírculos concatenados na rede de kDNA. A solução empregada foi 6M Guanidina - HCl/0,2M EDTA, que promoveu a lise das proteínas ao mesmo tempo em que preservou a integridade do DNA da amostra (proporção da mistura 1:1). Na etapa seguinte, o lisado sangue + Guanidina-EDTA foi tratado com o complexo cobre-fenantrolina (OP-Cu⁺²) que clivou o kDNA produzindo a liberação dos minicírculos e conseqüente linearização. A partir daí, eles conseguiram demonstrar que era possível detectar até um único parasita em 20 ml de sangue, utilizando 3 pares de iniciadores para os fragmentos de 83, 122 e 330 pb das regiões constantes e variáveis do minicírculo. Adicionalmente, os autores empregaram o mesmo protocolo para a pesquisa de *T. cruzi* em amostras de 10 ml de sangue coletadas de 5 pacientes chagásicos crônicos (4 com xenodiagnóstico negativo e 1 com xenodiagnóstico positivo) e comprovaram positividade nos 5.

BRENIÈRE *et alii* (1992), com a finalidade de caracterizar diretamente diferentes clones de *T. cruzi* isolados de fezes de triatomíneos e de sangue de mamíferos, empregaram a PCR para amplificar esses clones e a seguir hibridizá-los. Os autores utilizaram um par de oligonucleotídeos (HVRm) que promovem a amplificação de regiões hipervariáveis do kDNA de amostras de *T. cruzi* cujo único tratamento foi a fervura por 10 minutos. Adicionalmente a caracterização, testou-se a sensibilidade da PCR na identificação do *T. cruzi* em diferentes grupos e obtiveram-se os seguintes resultados: dos 58 triatomíneos investigados, 14 apresentaram PCR positiva; em todos os camundongos infectados experimentalmente foram detectados *T. cruzi* por PCR, com exceção de 1 que tinha baixa parasitemia; das 14 amostras de sangue provenientes de pacientes bolivianos, cronicamente infectados (6 casos) e dos não infectados (8 casos), a PCR foi negativa em todas; e nos casos das amostras de sangue humano, artificialmente contaminadas com *T. cruzi*, o resultado da PCR apresentou-se positivo.

Em um outro trabalho, REQUENA *et alii* (1992) estudaram uma seqüência de 1.025 nucleotídeos, que representam 7% do DNA nuclear, com o objetivo de utilizá-los como alvo de caracterização e diagnóstico de cepas de *T. cruzi*. Eles verificaram que essa seqüência, quando empregada como sonda, não hibridizava com DNA de *Leishmania mexicana*

mexicana e *Leishmania donovani infantum* e *T. rangeli*, mas apenas com isolado de *T. cruzi*, mostrando ser espécie específico. Dando continuidade ao objetivo dos experimentos, eles usaram oligonucleotídeos, sintetizados a partir desta mesma seqüência, nas reações de PCR e obtiveram um fragmento visível em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo amplificando apenas 1/30 do parasita. Esses dados demonstram que essa seqüência de DNA nuclear pode ser uma outra opção de alvo para as ampliações.

RUSSOMANDO *et alii* (1992) resolveram testar a possibilidade da utilização nas reações de amplificação de DNA extraídos apenas do soro em vez de sangue total. Com os mesmos oligonucleotídeos (TCZ1 e TCZ2) testados por MOSER *et alii* (1989), que hibridizam em uma região altamente repetitiva do DNA nuclear do *T. cruzi*, eles comprovaram a amplificação realizada com o DNA extraído do soro e do sangue de 3 macacos e não verificaram diferença significativa no resultado obtido com ambas as amostras. Quando idêntico procedimento foi empregado para detectar o *T. cruzi* no soro de 12 pacientes chagásicos (5 casos agudos e 7 crônicos), a PCR mostrou-se positiva em 11, assim como o teste de hemocultura.

Tendo como alvo de amplificação a região mais conservada de 195 pb do DNA satélite do *T. cruzi* (10% do DNA nuclear), DIAZ *et alii* (1992) construíram dois oligonucleotídeos e fizeram vários experimentos de reconstituição. Eles testaram a influência da presença do DNA humano na reação de amplificação do DNA do parasita, inicialmente eles amplificaram o DNA de *T. cruzi* adicionando concentrações aumentadas do DNA extraído da camada leucocitária (*buffy coat*) do sangue humano e verificaram não haver interferência. Porém, quando o DNA do *T. cruzi* era diretamente isolado do sangue total humano heparinizado, pelo método SDS - proteinase K, nenhuma banda foi identificada no gel. Atribuiu-se isso à presença de algum fator de inibição na amostra de sangue total. Nesse caso, os autores propuseram um pré-tratamento do sangue com o detergente Nonidet P-40, para evitar a inibição. Também ao adotarem o mesmo procedimento para detectar *T. cruzi* no sangue e em alguns órgãos de 15 camundongos cronicamente infectados, só conseguiram resultados da PCR positivos no material proveniente dos órgãos, apesar de os testes previamente realizados demonstrarem que o protocolo empregado seria capaz de detectar 1 parasita em 10 ml de sangue.

JONES *et alii* (1993) realizaram, através da PCR, um estudo prospectivo em autópsias de pacientes chagásicos crônicos com a finalidade de detectar *T. cruzi* em fragmentos de tecido cardíaco e de outros órgãos, bem como verificar se a presença de lesão estaria associada a persistência do parasita no tecido. Os oligonucleotídeos iniciadores (TCZ1

E TCZ2) foram os mesmos empregados por MOSER *et alii* (1989) que hibridizam na região repetida de 195 pb do DNA nuclear. Eles investigaram o material histopatológico de 11 e 9 indivíduos com sorologia positiva e negativa, respectivamente. Dos 11 soropositivos: 8 apresentaram PCR positiva e 3 tiveram a PCR negativa; um dado importante é que em 7 indivíduos, dentre os 8, constataram-se severas complicações cardíacas. Esses dados levaram os autores a sugerirem que a presença do *T. cruzi* no sítio de lesão do tecido é crítica no processo progressivo da doença, bem como revelaram a importância de se empregar a PCR nos futuros estudos histopatológicos. Os autores também especularam sobre o fato de que a presença de DNA de *T. cruzi* na lesão poderia não significar que o parasita "íntegro" ainda persistisse no tecido.

A outra série de trabalhos publicados teve como objetivo principal testar novas seqüências alvos que além de detectar o *T. cruzi* também o identificassem de outros trypanossomatídeos. Um deles foi o idealizado por MURTHY *et alii* (1992) que teve como base para o ensaio da PCR uma região de *mini-exon* do *T. cruzi* e *T. rangeli* altamente conservada (porção *exon*). *Mini-exon* são seqüências adicionadas pós-transcricionalmente às extremidades 5' de todos os RNA mensageiros. Utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores complementares a uma seqüência conservada de 22 nucleotídeos existentes dentro da região repetida do *mini-exon* após amplificado, MURTHY *et alii* (1992) obtiveram dois fragmentos de tamanhos distintos: um de 0,6 quilobases (kb) para *T. cruzi* e um outro de 0,9 kb para *T. rangeli*.

Tendo como alvo uma outra seqüência de RNA, SOUTO & ZINGALES (1993) investigaram a sensibilidade de detectar a porção 24S α do RNA ribossômico, composto de 100 pb e presente em cerca de 60.000 cópias em uma célula de parasita por PCR e hibridização. Através de uma pré-reação de transcrição reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), os autores puderam identificar um produto de 125 pb e de 110 pb nas cepas de *T. cruzi* testadas. O mesmo não ocorreu com algumas espécies de *Leishmania*, 2 cepas de *T. rangeli* e RNA humano. Por experimentos de reconstituição, conseguiu-se detectar 0,1% do conteúdo desse ácido nucléico contido em 1 parasita em géis corados com brometo de etídeo ou através da hibridização em *blot*.

Em uma outra publicação, GONZÁLEZ *et alii* (1994), explorando a presença de elementos repetitivos (*Spacer Repeat Elements* - SRE) do espaçador ribossômico intergênico (*Intergenic Ribosomal Spacer* - IGS) existentes nos cromossomas do *T. cruzi*, elaboraram um ensaio de PCR espécie-específico que permitisse a detecção e caracterização de isolados desse parasita. Empregando dois oligonucleotídeos (F1 e F2), que hibridizam a

região repetida SRE1, foi possível visualizar uma banda de 130 pb apenas nos isolados de *T. cruzi*, porém não nas espécies *Leishmania mexicana* e *T. rangeli*. Em um outro ensaio, utilizando duas duplas de iniciadores (F1 e F3), um deles já relatado e que é complementar a uma seqüência inicial dos elementos repetidos e um segundo que reconhece uma seqüência externa adjacente aos elementos repetidos, os autores conseguiram vários fragmentos de amplificação do genoma do *T. cruzi* isolados por xenodiagnóstico de paciente. Esses padrões complexos possibilitaram a detecção de pequenas diferenças genéticas entre os isolados do parasita, além da caracterização pelo *fingerprints*. Complementarmente, eles conseguiram aumentar a detecção marcando os produtos amplificados com digoxigenina e visualizando pelo sistema de quimioluminescência direta.

Recentemente TAIBI *et alii* (1995) sugeriram que a PCR promovida empregando-se oligonucleotídeos (T1 e T2) derivados de uma seqüência de 24 kDa cDNA de *T. cruzi* permite a identificação de um produto de 550 pb em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo. O produto de 550 pb obteve-se através de uma pré-reação de transcrição reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase, não sendo visualizado quando a amostra submetida à amplificação foi de *T. rangeli*. Essa estratégia de amplificação de TAIBI *et alii* (1995) mostra-se extremamente importante quando utiliza-se a PCR para a detecção de *T. cruzi* em amostras biológicas de indivíduos ou hospedeiros procedentes de uma região onde haja concomitância de infecção por *T. cruzi* e *T. rangeli*. O problema de "produto cruzado" (bandas semelhantes ou idênticas entre espécies), obtido ao empregarem-se determinados oligonucleotídeos iniciadores, foi demonstrado por VALLEJO *et alii* (1994) após realizarem a amplificação de uma seqüência de kDNA de 4 isolados de *T. rangeli*. VALLEJO *et alii* (1994), empregando os oligonucleotídeos S35 e S36, visualizaram os seguintes fragmentos: um de 330 pb (produto semelhante ao identificado em amostras de *T. cruzi*); um conjunto de fragmentos na faixa de 300 a 450 pb e um fragmento definido de 760 pb. Assim consideramos que, ao praticarmos o diagnóstico de *T. cruzi* em uma área endêmica comum para *T. rangeli*, a hipótese de uma infecção mista não deverá ser descartada ao visualizarmos um produto de 330 pb entre outros fragmentos maiores.

Em paralelo aos estudos de reconstituição e experimentais, surgiram os trabalhos onde a técnica da PCR começou a ser empregada como diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* em um grande número de amostras de indivíduos com história epidemiológica para a doença de Chagas. ÁVILA *et alii* (1993) foram os primeiros que promoveram essa avaliação, empregando, além da PCR, 4 diferentes testes sorológicos e xenodiagnóstico em 96 indivíduos residentes na área endêmica de Virgem da Lapa, município do Estado do Minas

Gerais - Brasil. Eles incluíram, como controle da reação, mais 18 indivíduos doadores de banco de sangue da Universidade da Califórnia, Los Angeles (UCLA) - USA. A PCR foi realizada com amostras de sangue misturadas na mesma proporção com a solução de lise guanidina-EDTA e utilizando o mesmo par de oligonucleotídeos (S35 e S36) testados por STURM *et alii* (1989) que hibridizam em um dos trechos da seqüência conservada do minicírculo. A presença do fragmento de 330 pb, que determina PCR positiva, foi visualizada em 91 (100%) casos que também tiveram sorologia positiva. Dos 96 indivíduos investigados pela PCR, 83 foram submetidos também ao xenodiagnóstico; dentre estes, 48 tiveram xenodiagnóstico positivo e PCR positiva, os 35 restantes apresentaram xenodiagnóstico negativo e PCR positiva. Houve 4 casos com sorologia negativa onde a PCR conseguiu detectar DNA de *T. cruzi* em 3, sendo que desses apenas um tinha forma clínica. Todos os indivíduos-controles deram PCR negativos. Os autores concluíram que a PCR pode substituir o xenodiagnóstico na avaliação da parasitemia em pacientes chagásicos crônicos e que pode servir como teste complementar à sorologia na seleção de doadores de bancos de sangue.

No mesmo ano da publicação de ÁVILA *et alii* (1993), BRITTO *et alii* (1993) testaram um procedimento alternativo para a clivagem da rede de minicírculos do kDNA. Ao ferverem por 15 minutos as amostras sangue + guanidina-EDTA, BRITTO *et alii* (1993) obtiveram a linearização da maioria dos minicírculos. Além de mais simples que a clivagem química, empregada até aquele momento, o novo procedimento reduziu a possibilidade de contaminação com seqüências exógenas, uma vez que o sangue era fervido no próprio tubo de transporte e armazenamento, evitando o manuseio. A partir deste, os mesmos autores realizaram uma série de 4 trabalhos no período de 1994/1995, empregando um protocolo básico de amplificação. Além da clivagem pela fervura, eles introduziram o procedimento *Hot Start PCR* desenvolvido por CHOU *et alii* (1992) e utilizaram os oligonucleotídeos iniciadores 121 e 122, cuja seqüência é praticamente idêntica aos oligonucleotídeos S35 e S36 respectivamente, que, assim como aqueles, foram construídos a partir da região conservada dos minicírculos de kDNA (DEGRAVE *et alii*, 1988). O 122 apresenta, na seqüência, um nucleotídeo a menos próximo à extremidade 5' e seis nucleotídeos a mais no final 3' em relação ao S36. O número total de ciclos foi de 35: 2 ciclos a 98°C por 1 minuto e 64°C por mais 1 minuto, 33 ciclos a 94°C por 1 minuto e 64°C por mais 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os casos que apresentaram PCR negativa foram submetidos a uma nova amplificação empregando 2 pares de oligonucleotídeos iniciadores do gen da β -globina humana.

Na primeira investigação, WINCKER *et alii* (1994a) resolveram testar a eficácia da PCR, empregando o protocolo por eles estabelecido, em 100 amostras de 10 ml de sangue coletadas de indivíduos residentes na área endêmica de Virgem da Lapa, Minas Gerais - Brasil, a mesma estudada por ÁVILA *et alii* (1993). Verificou-se que dos 86 indivíduos previamente diagnosticados como chagásicos, 83 (96,5%) tiveram PCR positiva. Dentre os 86, 60 foram submetidos a um ou mais xenodiagnóstico e em apenas 36 o exame confirmou a presença de *T. cruzi*, que também foi comprovado pela PCR. Nos outros 24, com xenodiagnósticos negativos, o ensaio da PCR permitiu detectar DNA de *T. cruzi* em 21, ficando de fora somente 3. Entre os 14 indivíduos restantes, 6 apresentaram sorologia duvidosa e 8 sorologia negativa; a PCR positivou em 4 dos 6 duvidosos. A natureza do produto amplificado foi confirmada pela hibridização com sondas marcadas e complementares ao minicírculo do kDNA de *T. cruzi*. As 3 amostras de sangue com sorologia positiva e PCR negativa, após amplificação do gen da β -globina humana, uma continuou negativa, indicando a presença de algum inibidor. Os resultados sugerem que os casos sorologicamente duvidosos podem ser confirmados pela PCR, além de apresentar maior poder de detecção do *T. cruzi* que o xenodiagnóstico.

O segundo estudo de WINCKER *et alii* (1994b) foi realizado em amostras de 5 ml de sangue, coletadas de 45 crianças na faixa etária de 5 a 8 anos procedentes do interior da Bolívia. Estas crianças foram previamente selecionadas por exames sorológicos (hemaglutinação, imunofluorescência e ELISA) e parasitológicos (pesquisa da camada leucocitária - *buffy coat*). Um outro grupo de 8 indivíduos procedentes do Rio de Janeiro (Brasil) e de La Paz (Bolívia), que nunca viveram em área endêmica de doença de Chagas, foram incluídos como controle. Os autores tiveram como objetivo avaliar a eficácia do teste da PCR no diagnóstico do *T. cruzi* em indivíduos num contexto epidemiológico completamente diferente daqueles da investigação anterior. Nesta análise, a sorologia foi positiva em 28 das 45 crianças examinadas. Através do *buffy coat*, conseguiu-se detectar 5 em 45 e o produto de amplificação foi visualizado em 28 das 45. A sensibilidade da PCR foi de 93% (26 em 28) e de 12% (2 em 17) respectivamente nos casos com sorologia positiva e negativa. Em uma das crianças com sorologia negativa o *buffy coat* e a PCR foram positivos concomitantemente, demonstrando a ausência de resposta humoral uma vez que encontrou-se parasita. Eles concluíram que, com os elevados níveis de sensibilidade e especificidade obtidos pela PCR em mais este grupo de indivíduos de uma área endêmica com características particulares, esta técnica possa se tornar um instrumento valioso para avaliar a evolução da doença de Chagas em diferentes situações epidemiológicas.

Na terceira investigação, BRITTO *et alii* (1995a) analisaram 91 amostras de 10 ml de sangue coletadas de indivíduos que foram encaminhados ao Hospital Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (Brasil) pelos centros de doação de sangue e por outros serviços de saúde. Esses indivíduos têm a característica de serem procedentes de diversas regiões endêmicas de doença de Chagas do Brasil e provavelmente infectados por populações diferentes de *T. cruzi*. Esta investigação foi dividida em duas etapas que tiveram objetivos específicos. Na primeira etapa eles verificaram a sensibilidade da PCR em grupo de 91 indivíduos, cujo perfil sorológico foi o seguinte: 61 casos positivos, 27 negativos e 3 duvidosos. A PCR apresentou resultado positivo em 55 dos 61 sorologicamente positivos e em 3 dos 3 duvidosos; isso demonstrou uma sensibilidade de 90%. Nos 27 sorologicamente negativos, não foi detectado DNA de *T. cruzi* pela PCR. Trinta e dois pacientes, dos 91, foram submetidos ao xenodiagnóstico, apenas 12 foram positivos. Na etapa seguinte, reavaliou-se a sensibilidade da PCR em 32 pacientes do primeiro grupo que tinham sorologia positiva (apenas uma duvidosa) e que foram posteriormente tratados com droga benznidazole. Isto teve como finalidade avaliar o papel da PCR no monitoramento de pacientes chagásicos tratados com drogas específicas. Através da PCR, conseguiu-se detectar DNA de *T. cruzi* em 9 (28,1%) pacientes com mais de um ano de tratados e o xenodiagnóstico, que só foi aplicado em 19 dos 32, confirmou que 2 (10,5%) deles ainda apresentavam parasitemia. Em ambas as etapas, a PCR mostrou-se melhor que o xenodiagnóstico, devendo ser usada como controle de cura em pacientes tratados.

Finalmente, o quarto e último trabalho realizado pelo grupo (BRITTO *et alii*, 1995b) teve como objetivo não apenas detectar o *T. cruzi* através de ensaio da PCR em indivíduos de uma área endêmica de doença de Chagas, mas utilizar o produto amplificado, proveniente da detecção, para avaliar o grau de homologia dos minicírculos de kDNA da população de *T. cruzi* circulante na área ou região de origem. Eles analisaram, pela PCR, 172 amostras de 5 ml de sangue de indivíduos naturais e residentes no Sertão da Paraíba, região nordeste do Brasil, concomitantemente, foi coletado mais sangue para a realização de 3 testes sorológicos com o objetivo de comparar com a técnica da PCR. A PCR foi capaz de detectar DNA de *T. cruzi* em 21 dos 47 indivíduos que apresentaram sorologia positiva e em 1 dos 40 casos com sorologia duvidosa. Em 85 indivíduos, ambos os métodos (sorologia e PCR) deram resultados negativos. No presente estudo, a PCR mostrou uma sensibilidade de 45%, o que levou os autores a concluir que a eficiência deste método de diagnóstico pode variar dependendo da região endêmica estudada. Na discussão eles relataram que em trabalho anterior, realizado por PEREIRA & COURA (1987), a sensibilidade do xenodiagnóstico nessa

área ficou em torno de 13%, o que veio a confirmar a maior sensibilidade da PCR e que a mesma deve ser o diagnóstico de escolha na região. Dando continuidade ao estudo, eles realizaram uma série de experimentos de hibridizações cruzadas com os produtos amplificados obtidos a partir dos pacientes chagásicos e de triatomíneos naturalmente infectados capturados na região. Após a análise dos cruzamentos, eles concluíram que as cepas de *T. cruzi* circulantes na região apresentam um alto nível de heterogeneidade genética.

Os DNAs de *T. cruzi* amplificados de amostras de sangue humano e de fezes de triatomíneos que foram processados para fins de diagnóstico têm sido extensivamente empregados nos estudos de tipagens das populações de *T. cruzi* circulantes nestes hospedeiros em diferentes vetores, mostrando com isso o largo espectro de utilização da PCR. Tal aplicação ficou demonstrada no trabalho relatado anteriormente de BRITTO *et alii* (1995b) e na investigação de BRENIÈRE *et alii* (1995). Sendo que neste, os autores (BRENIÈRE *et alii*, 1995) fizeram uso, em paralelo, do método da PCR e do método parasitológico direto de pesquisa para detectar *T. cruzi* nas fezes retiradas de 345 exemplares de 4 diferentes espécies de triatomíneos (*T. infestans*, *R. pictipes*, *Eratyrus mucronatus*, *T. sordida*); com o produto obtido das amplificações destas amostras fecais, realizaram as hibridizações empregando, como sondas, a seqüência dos dois maiores clones de *T. cruzi* que circulam na Bolívia. Quanto à capacidade dos dois métodos em detectar o *T. cruzi*, ficou evidente a menor sensibilidade da PCR, em relação ao exame parasitológico direto, nas 217 amostras de fezes pesquisadas do *T. infestans*. Com cada procedimento foi possível comprovar o parasita em respectivamente 105 e 117 amostras de *T. infestans*. Este resultado inverteu-se nos conteúdos fecais examinados das espécies *R. pictipes*, *E. mucronatus* e *T. sordida*, onde apenas a PCR teve sucesso em comprovar a presença do parasita, sendo a pesquisa direta ao *T. cruzi* negativa em todas as amostras. Quanto aos resultados obtidos com as hibridizações, ficou demonstrado: a presença de múltiplos clones em um único vetor, especificamente no *T. infestans*; a ocorrência de maior circulação de clones nas espécies vetoras silvestres; também confirmou-se a importância dos dois maiores clones circulantes na Bolívia.

Diante de tudo o que foi exposto anteriormente, torna-se relevante afirmar que a tecnologia da PCR abre um novo e vasto campo de pesquisa no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* e que esta necessita ser mais testada comparativa e concomitantemente com outros métodos de detecção do parasita.

2.1. JUSTIFICATIVA

Diante dos dados controvertidos sobre a sensibilidade do xenodiagnóstico e da hemocultura, que parecem estar relacionados tanto ao protocolo empregado quanto às variações qualitativas e quantitativas da população de parasitas circulantes nos hospedeiros mamíferos, o Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz), em colaboração com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da mesma Instituição, tem empregado, em seus estudos seccionais e longitudinais realizados em populações de área endêmica para doença de Chagas, as técnicas de PCR e xenodiagnóstico na detecção do *T. cruzi*. Dentro dessa linha de pesquisa multidepartamental, selecionamos um grupo de indivíduos para o nosso estudo.e incluímos um terceiro método de detecção: a hemocultura.

3. OBJETIVOS

Avaliar, individualmente, os métodos de xenodiagnóstico, de hemocultura e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico de pacientes chagásicos crônicos.

Verificar a sensibilidade e a aplicabilidade da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em comparação com os métodos de xenodiagnóstico e de hemocultura na detecção do *Trypanosoma cruzi* no sangue de indivíduos sorologicamente positivos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. INDIVÍDUOS SELECIONADOS

4.1.1. CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DO GRUPO DE INDIVÍDUOS

O grupo foi composto de indivíduos naturais e residentes em uma mesma área endêmica da doença de Chagas que apresentassem teste sorológico anti-*T. cruzi* positivo. Como controle da reação de amplificação, incluímos um pequeno número de indivíduos com o mesmo perfil anterior, porém que tivessem sorologia negativa (FIG. 1).

Quanto à faixa etária, pensou-se inicialmente compor o grupo de estudo com indivíduos homogeneamente distribuídos em três faixas de idade: primeira \leq a 19 anos; a segunda entre 20 a 49 anos e a terceira \geq 50 anos. Porém, ao completarmos o levantamento sorológico em papel de filtro, averiguamos a existência de um pequeno número de indivíduos com menos de 19 anos sorologicamente positivos. Mediante este dado, redimensionamos o grupo com metade de indivíduos entre 20 a 49 anos e outra parte com mais de 50 anos, baseando-nos na diferença de parasitemia encontrada nessas duas faixas etárias por outros autores (CASTRO, 1980; COURA *et alii*, 1991).

4.1.2. ÁREA DE PROCEDÊNCIA DOS INDIVÍDUOS

Os indivíduos selecionados procederam dos Municípios de Oeiras e Colônia do Piauí que estão situados na zona da Caatinga (Savana Estépica) do Piauí (FIG. 2).

Estes dois municípios apresentam as seguintes características:

- o antigo povoado de Colônia e Oitis foi investigado por Correia-Lima em 1975 - 1976 (CORREIA-LIMA, 1976), que comprovou uma prevalência da infecção chagásica em 12,1% da população local através da técnica de imunofluorescência indireta. Ele também constatou que o *Triatoma brasiliensis* era a única espécie de triatomíneo existente, apresentando uma nítida predominância de domiciliação e uma taxa de infecção de 4,9% para *T. cruzi*.

- em um recente inquérito soroepidemiológico para doença de Chagas (1993 - 1994), abrangendo os dois povoados pesquisados por CORREIA-LIMA (1976) e algumas

localidades do município de Oeiras, comprovou-se que, das 4.212 amostras de sangue coletadas em papel de filtro, 252 (5,98%) estavam positivas para anticorpos anti-*T. cruzi* pela reação de imunofluorescência indireta. De um total de 750 triatomíneos capturados no domicílio e peridomicílio, 625 foram examinados e 32 (5,5%) apresentavam *T. cruzi* sendo o *Triatoma brasiliensis* a espécie predominante (COURA *et alii*, 1996);

- são áreas que estão incluídas no projeto "Estudo Comparativo da Morbidade e Perspectivas de Controle da Doença de Chagas em Duas Áreas do Nordeste do Brasil", cujos recursos financeiros para sua realização foram liberados, em parte, por convênio entre a FIOCRUZ e a Fundação Nacional de Saúde, através do Programa de Controle de Doenças Endêmicas do Nordeste (PCDEN).

4.1.3. TAMANHO DA AMOSTRA

O cálculo do número de indivíduos necessários para compor o grupo foi efetuado com a orientação de um estatístico e encontra-se no item 3 (Análise Estatística). O número final de indivíduos investigados ficou sendo de 101, maior que os 85 indicados no cálculo estatístico.

Em relação ao número de indivíduos com sorologia negativa, empregados como controle, este foi determinado arbitrariamente. Estabelecemos cerca de 20% em cima do valor da amostra positiva.

4.2. TÉCNICAS EMPREGADAS NO DIAGNÓSTICO

4.2.1. SOROLÓGICAS

Realizou-se uma primeira triagem dos indivíduos residentes na área endêmica utilizando-se o teste de imunofluorescência indireta no sangue colhido em papel de filtro através da punção digital, de acordo com a técnica de FIFE & MUSHEL (1959), adaptada por SOUZA & CAMARGO (1966) e PETANA (1976) (FIG. 3).

Os indivíduos positivos no papel de filtro foram submetidos a mais dois testes sorológicos confirmatórios, conforme preconizado pela Organização Pan-americana da Saúde (CURA & WENDEL - 1994). Nesta etapa, empregamos a reação de imunofluorescência

indireta no soro (IFI) e o ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA).

Apenas os indivíduos positivos, em uma ou em ambas as reações confirmatórias, foram incluídos na análise comparativa das 3 técnicas. E de um pequeno número que apresentou todas as reações negativas, retiramos sangue para os ensaios da PCR, cuja finalidade foi exposta no item 1.1.

Protocolo das Reações:

IFI

Empregamos o método estabelecido por CAMARGO (1966).

Para os testes usou-se antigamaglobulina humana, tipo IgG (marca Biolab, Brasil) a uma diluição de 1/100, e como antígeno células de *T. cruzi*, provenientes de cultura da cepa Y, crescidas no Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz - Brasil (DMT - IOC - FIOCRUZ).

Os soros foram diluídos em uma série de 1:40 a 1:640 em PBS (tampão salina fosfato) pH 7.2.

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (modelo Dialux - marca Leitz, Germany) com epi-iluminação para imunofluorescência. Consideramos positivo título igual ou superior a 1/40.

ELISA

A base metodológica foi a descrita por ENGVALL & PERLMANN (1971).

Seguimos o procedimento indicado na descrição da técnica que acompanhava o *kit* usado para a reação. Este *kit* foi produzido por Bio-Manguinhos - Fundação Oswaldo Cruz - Brasil (BIO - FIOCRUZ).

Para a reação enzimática, utilizaram-se microplacas sensibilizadas com antígenos solúveis e purificados obtidos a partir de cultura *in vitro* de *T. cruzi*.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (modelo Uniskan II, marca Labsystems, EUA) para microplacas, equipado com filtro de 450 nm (nanômetros). Consideraram-se positivas as amostras que apresentavam densidade ótica igual ou superior ao *cut-off*, que foi estabelecido segundo o cálculo encaminhado com o *kit*.

4.2.2. XENODIAGNÓSTICO

Inicialmente, pensávamos em aplicar o xenodiagnóstico da forma direta (convencional) e da indireta, porém necessitávamos coletar para o xeno indireto uma quantidade de 10 ml (mililitros) de sangue a mais do que a quantidade necessária para os outros exames, perfazendo um total de 45 ml. Isto nos pareceu desaconselhável, em vista da aparente situação de carência nutricional em que a grande maioria dos indivíduos se encontrava e da dificuldade de convencê-los a retirar uma quantidade visualmente "alarmante".

4.2.2.1. ESPÉCIE DE TRIATOMÍNEO EMPREGADA

Empregaram-se ninfas de IV estágio de *Triatoma infestans* Klug, 1834 e *Panstrongylus megistus* Burmeister, 1835 criadas no insectário do DMT-IOC-FIOCRUZ.

Os critérios de escolha das duas espécies basearam-se no seguinte: no caso do *T. infestans*, ele foi indicado como a espécie padrão para ser aplicada no xenodiagnóstico por um grupo de *experts* do CNPq, que se reuniu em 1974 para definir "Objetivos e Metodologia dos Estudos Longitudinais da Doença de Chagas"; enquanto que o *P. megistus* foi incluído por ter se mostrado altamente sensível à infecção pelo *T. cruzi* em inúmeros xenodiagnósticos realizados por nosso grupo (CNPq, 1974; JUNQUEIRA *et alii*, 1989a; JUNQUEIRA *et alii*, 1989b; PEREIRA *et alii*, 1996). Nós também verificamos um aumento da sensibilidade quando utilizamos as duas espécies pareadas.

4.2.2.2. APLICAÇÃO DAS NINFAS

Após um jejum de duas a três semanas, 40 ninfas de IV estágio, 20 de *T. infestans* e 20 de *P. megistus*, acondicionadas em 4 recipientes de madeira cobertos com filó na parte superior, conforme proposto por SCHENONE *et alii* (1968), foram colocadas sobre a face interna do antebraço de cada indivíduo durante 30 minutos (SCHENONE *et alii*, 1968; SALGADO, 1969; CERISOLA *et alii*, 1974).

4.2.2.3. QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA PELAS NINFAS

Com a finalidade de se comparar a quantidade de sangue ingerida pelas ninfas das duas espécies empregadas, pesamos os 4 recipientes contendo as mesmas em balança digital (modelo GMBH - Sartorius - marca OHAUS, Germany), antes e após o repasto, e

subtraímos estas duas pesagens. O resultado da subtração nos forneceu o volume aproximado de sangue sugado durante o repasto, uma vez que 1 ml de sangue nunca ultrapassa 1,3 g (gramas) (dados não publicados). Além disso, verificou-se o número de ninfas que se alimentaram em cada recipiente, antes de transferi-las para frascos maiores, desprezando-se aquelas que não ingeriram sangue. Nós consideramos como ninfas alimentadas somente aquelas que, através da observação, apresentavam abdome distendido, independente da intensidade. Conforme FREITAS (1947), deve-se conservar para o exame apenas os exemplares que sugaram sangue, independente da quantidade ser muita ou pouca.

Até o momento da leitura do xenodiagnóstico, os triatomíneos foram mantidos à temperatura e umidade ambientes, cujos valores nunca foram inferiores a 22°C e 57% de umidade relativa do ar; e superiores a 32,5°C e 79,5% de umidade relativa do ar. Aos 23 dias contados a partir da aplicação, eles receberam uma única alimentação em *Gallus gallus* (galinha). Segundo DIAS (1933, 1940b), essa alimentação é importante para a manutenção do *T. cruzi* no vetor. Também PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MULLER (1987) demonstraram que a adicional alimentação com sangue de ave doméstica, após a infecção inicial, foi capaz de aumentar a densidade parasitária em 5 das 8 espécies de triatomíneos testados.

4.2.2.4. LEITURA DO XENODIAGNÓSTICO

O exame das ninfas ocorreu em média aos 45 dias após a aplicação no paciente (SALGADO, 1969; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MULLER, 1987).

Primeiro fazíamos a observação do *pool* de fezes obtidas por compressão abdominal de 2 a 3 espécimes e em caso positivo verificávamos, através de um novo exame individual, o número de exemplares positivos. As ninfas do *pool* de fezes em que não se detectou formas de *T. cruzi* eram reexaminadas individualmente, desta vez por dissecação total de seu trato digestivo. O procedimento de dissecação consistiu na retirada de todo o trato digestivo, com auxílio de duas pinças e uma tesoura, e no maceramento de todo ele empregando-se um bastão de vidro. Cada conteúdo biológico (fezes e trato digestivo) obtido era depositado sobre uma lâmina na qual acrescentava-se 5 µl de salina tamponada, pH 7.2, e cobria-se com lamínula 22 x 22 (FIG. 4).

Essa leitura em 2 fases permitiu que preservássemos para estudos posteriores os triatomíneos que apresentassem de início o conteúdo fecal positivo, por sua vez a dissecação

tornou possível detectar formas de *T. cruzi* que não estivessem sendo eliminadas nas fezes (SALGADO, 1969; FUENTE *et alii*, 1985).

Procedeu-se a leitura ao microscópio óptico binocular (marca Carl Zeiss do Brasil) com um aumento de 400x, percorrendo todos os campos em busca de formas evolutivas do *T. cruzi*.

4.2.3. HEMOCULTURA

Após a aplicação das ninfas do xenodiagnóstico, foram coletados 30 ml de sangue venoso de cada indivíduo através de *vacutainer* (marca Becton Dickinson, USA) contendo heparina sódica, para a realização da técnica de hemocultura, seguindo os ensaios de CHIARI *et alii* (1979) e de LUZ *et alii* (1994a, b) com algumas adaptações para as condições de processamento na área de campo.

4.2.3.1. MEIO DE CULTIVO

Utilizamos o meio de cultivo *liver infusion tryptose* (LIT) formulado por R. Yaeger e introduzido por E. P. Camargo (CAMARGO, 1964). Este meio é rico em componentes e tem apresentado bons resultados no cultivo de formas sanguíneas de *T. cruzi* (CHIARI *et alii*, 1979; LUZ *et alii*, 1994a, b).

As etapas para a preparação do meio estão descritas em uma folha anexa no final do texto (Anexo). Após a filtração, o meio foi aliqotado em tubos de vidro refratário com tampa de rosca: dois frascos submetidos à prova de esterilização, um lote ficou no laboratório para ser empregado na rotina de cultivo de amostras do *T. cruzi* e o restante estocado a 4°C até ser levado para a área de campo.

4.2.3.2. PROCESSO DE CULTIVO

No mesmo dia da coleta, os 30 ml de sangue foram centrifugados em uma centrífuga clínica (modelo 205N - Excelsa 2 - marca FANEM Ltda, Brasil) a 2.500 rpm (rotações por minuto) por 15 minutos.

Após a centrifugação, retirou-se o plasma, que foi separado para sorologia, e adicionou-se à camada de hemácias e leucócitos igual quantidade de meio LIT; promoveu-se nova centrifugação a 2.500 rpm por 15 minutos. A seguir foi removido o sobrenadante, e o

sedimento (hemácia e leucócitos) distribuído em 5 tubos de vidro com tampa de rosca, contendo 4 ml de LIT.

Todo o procedimento anterior foi realizado dentro de uma pequena caixa de madeira (tipo capela) com frente de vidro, confeccionada na própria área endêmica, dentro da qual foi introduzido um bico de Bunsen. A finalidade do esquema foi evitar uma maior contaminação no momento da retirada do plasma e da lavagem da papa de hemáceas com LIT (FIG. 5).

Os tubos semeados foram deixados em temperatura ambiente até serem transferidos, ao final da coleta de todo o material, para uma estufa incubadora para B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) (modelo 347CD - marca FANEM Ltda, Brasil) a 28 °C no laboratório do Dr. Egler Chiari, na Universidade Federal de Minas Gerais, onde eram homogeneizados uma vez por semana.

4.2.3.3. PERÍODO E FORMA DE LEITURA

A leitura foi realizada retirando alíquotas de 10 µl (microlitros) da suspensão de cada tubo e examinando-as aos 45, 60, 90 e 120 dias após o cultivo, entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico binocular (marca Carl Zeiss do Brasil) com aumento de 400x. Após a última leitura, os tubos que permaneceram negativos eram centrifugados a 2.500 rpm por 15 minutos e o sedimento reexaminado (BRONFEN *et alii*, 1989).

Independente da comprovação de *T. cruzi* em um tubo, a pesquisa do parasita continuou sendo feita nos outros tubos provenientes do mesmo sangue.

4.2.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Seguiu-se o protocolo introduzido por BRITTO *et alii* (1993, 1995a, b) e WINCKER *et alii* (1994a, b). A única mudança promovida por nós foi no volume de sangue coletado, substituímos os 10 ml indicados por 5 ml. Essa alteração teve como finalidade aproximarmos da quantidade máxima de sangue ingerida por 40 ninfas no IV estágio de *T. infestans* e *P. megistus* quando submetidas à alimentação em pacientes chagásicos crônicos para a realização do xenodiagnóstico (dados não publicados).

Etapa A - COLETA DA AMOSTRA A SER AMPLIFICADA

No mesmo momento da aplicação do xenodiagnóstico, uma quantidade exata de 5 ml de sangue de cada paciente foi coletada por punção venosa, com auxílio de um *vacutainer* sem anticoagulante, e imediatamente transferida para um frasco de polipropileno contendo igual volume da solução de 6 M (molar) guanidina HCl (*Guanidine-Hydrochloride*) + 200 mM (milimolar) de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (Guanidina HCl, *Ultra-Pure* - marca GIBCO BRL, USA / EDTA, *Dehydrate* - marca Sigma Chemical Company, USA), pH 8.0.

A solução de 6 M guanidina HCl + 200 mM de EDTA permitiu que o sangue pudesse ser estocado por um prazo de 30 dias à temperatura ambiente, até o momento de ser transferido para o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Endêmicas - IOC - FIOCRUZ, RJ, onde foi estocado a 4 °C até a etapa seguinte (ÁVILA *et alii*, 1991).

Etapa B - ISOLAMENTO DO DNA DO SANGUE COLETADO

Utilizamos como alvo para a PCR os minicírculos da rede de kDNA, que existem em grande quantidade, cerca de $5 - 20 \times 10^3$ minicírculos de 1,42 Kb (kilobases) por *T. cruzi* (DEGRAVE *et alii*, 1988; STURM *et alii*, 1989). Esse elevado número e a presença nas seqüências de nucleotídeos de regiões conservadas minirrepetidas permitem que apenas 0,1% dos minicírculos contidos em um único parasita seja suficiente para a visualização após a PCR (STURM *et alii*, 1989)

B1 - Clivagem Física

Os tubos contendo sangue + guanidina-EDTA foram parcialmente imersos em água e fervidos por 15 minutos, com a finalidade de promover a linearização e conseqüente liberação dos minicírculos concatenados na rede de kDNA (BRITTO *et alii*, 1993).

B2 - Extração

A partir dessa subetapa, todos os procedimentos foram realizados em duplicata e, a cada série de 5 amostras extraídas, um sangue de indivíduo residente no Rio de Janeiro, comprovadamente negativo pela técnica da PCR, era processado em paralelo. Isso permitiu um monitoramento da presença de contaminantes durante as etapas da PCR (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; KITCHIN & BOOTMAN, 1993).

Para a extração do DNA de cada amostra de sangue fervido, retiraram-se 2 alíquotas de 100 µl. Cada alíquota foi submetida a um processo de desproteinização empregando fenol-clorofórmio (Fenol, *Redestiled, Ultra-Pure* - marca GIBCO BRL, USA / Clorofórmio - marca Merck S.A. - Brasil) na proporção de 1:1 (V/V); clorofórmio saturado (marca Merck S.A., Brasil). A fase aquosa obtida foi precipitada, acrescentando-se 10% de acetato de sódio a 3 M (marca Sigma Chemical Company, USA), 300 mM de concentração final, mais 2 volumes de etanol (marca Merck S.A., Brasil) e deixando-se 15 minutos em banho de gelo. Passado esse tempo, centrifugou-se (centrífuga modelo 5415C - marca Eppendorf, Germany) o volume total a 12.000 rpm por 15 minutos. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o tubo contendo o *pellet* colocado sobre uma placa de aquecimento (*Multi-Blok* - marca LAB-LINE, USA), regulada para +70 °C, por um período suficiente para que toda a parte líquida (gotículas de etanol) evaporasse, normalmente 5 minutos tornavam-se suficientes. Feito isto, o *pellet* era ressuspensionado em 50 µl de água deionizada pelo sistema Milli-Q (*Reagent Water System* - marca Millipore, USA) (SAMBROOK *et alii*, 1989). Até o momento da amplificação, o DNA ressuspensionado era estocado a -20 °C.

Etapa C - AMPLIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Na reação de amplificação *in vitro*, utilizamos o procedimento *hot start*, onde os componentes químicos empregados são adicionados em duas fases, com uma separação física entre elas promovida por uma pérola de parafina especialmente formulada pela Perkin-Elmer Cetus Instruments, USA. As qualidades desse procedimento foram explanadas na introdução da dissertação (CHOU *et alii*, 1992) (FIG. 6).

C1 - Pré-Amplificação

Antes dos ciclos térmicos, os reagentes da reação foram adicionados em duas fases:

1ª FASE OU FASE INFERIOR

As quantidades fornecidas a seguir e na próxima fase correspondem a valores empregados em apenas uma reação de amplificação, ou seja, 7,5 µl de DNA ressuspendido.

Em um tubo de *ependorf*, acrescentaram-se os seguintes produtos:

H ₂ O deionizada.....	11,3	µl
Tampão Taq Polymerase 10x (marca - Perkin-Elmer, USA).....	4,0	µl
Mg Cl ₂ a 25 mM (marca - Perkin-Elmer, USA).....	13,5	µl
Nucleotídeo dATP a 10 mM (marca - Sigma, USA).....	1,8	µl
Nucleotídeo dCTP a 10mM (marca - Sigma, USA)	1,8	µl
Nucleotídeo dGTP a 10mM (marca - Sigma, USA).....	1,8	µl
Nucleotídeo dTTP a 10 mM (marca - Sigma, USA).....	1,8	µl
Oligonucleotídeos 121 a 100 ng/µl (marca - EUROGENTEC, Belgium).	2,0	µl
Oligonucleotídeos 122 a 100 ng/µl (marca - EUROGENTEC, Belgium).	2,0	µl
TOTAL.....	40,0	µl

ng = nanogramas

Após homogeneização, transferiu-se os 40µl da mistura anterior para um tubo apropriado, que possibilita a troca rápida de temperatura (*Thin-Walled Reaction Tube* - marca Perkin-Elmer, USA) e introduziu-se uma pérola de parafina purificada (*Ampliwax PCR Gem 100* - marca Perkin-Elmer, USA). A seguir, com a finalidade de liquefazer a parafina, o tubo foi incubado a 80 °C durante 5 minutos com auxílio de uma placa de aquecimento (*Multi-Blok* - marca LAB-LINE, USA). Passados os 5 minutos, o tubo foi retirado da placa e deixado esfriar à temperatura ambiente até a parafina se solidificar.

Os oligonucleotídeos 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3') foram escolhidos por apresentarem a característica de se hibridizarem em um trecho das 4 regiões constantes dos minicírculos de *T. cruzi* e promoverem a amplificação em direção à região variável (STURM *et alii*, 1989)

(FIG 7). Desta forma, a variabilidade genética das seqüências de minicírculos das populações de *T. cruzi* não interfere na hibridação dos oligonucleotídeos.

2ª FASE OU FASE SUPERIOR

Em outro tubo de *ependorff*, adicionaram-se os 3 (três) últimos componentes da reação:

H ₂ O deionizada.....	23,5...µl
Tampão Taq Polymerase 10x (marca - Perkin-Elmer, USA).....	3,5...µl
Enzima Taq Polymerase 2,5 U (marca - Perkin-Elmer, USA).....	0,5...µl
TOTAL.....	27,5...µl

U = unidades

Promoveu-se a mistura dos elementos e a seguir transferiram-se os 27,5 µl totais para o tubo que já continha a fase inferior e a camada de *ampliwax*. A este acrescentaram-se 7,5 µl de DNA ressuspendido.

C2 - Ciclos Térmicos

Os tubos contendo os componentes das fases 1 e 2 foram introduzidos no aparelho, modelo DNA Thermal Cycler 480 (marca - Perkin-Elmer Cetus Instruments, USA), programado para seguir os seguintes ciclos de temperatura e tempo.

2 ciclos iniciais	98 °C	1'
	64 °C	2'
33 ciclos intermediários	94 °C	1'
	64 °C	1'
1 ciclo final	72 °C	10'

Nestas condições de amplificação, a hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores e a extensão da fita de DNA se processam entre as temperaturas de 64 °C e 94 °C e no mesmo espaço de tempo, encurtando, com isso, a reação de amplificação para o tempo de 2h10m. A temperatura mínima de 64 C cria uma situação de alta estringência, permitindo que

os *primers* se liguem a seqüências totalmente complementares. Isso conduz a uma alta especificidade da reação (FIG. 8).

O último ciclo, de 10 minutos de duração, tem como objetivo complementar produtos de parcial extensão (ROLFS *et alii*, 1992).

As ampliações em que após a revelação não detectamos nenhuma banda ou esta se apresentava pouco visível, nós repetimos a PCR porém reprogramando a máquina para 40 ciclos.

C3 - Controle

A cada série de 5 ampliações em duplicata dos pacientes do grupo de estudo, incluímos duas alíquotas de indivíduos comprovadamente negativos (previamente relatado no item Extração) e mais duas de pacientes positivos. A inclusão dessas amostras de sangue, comprovadamente negativas, possibilitou um controle rigoroso da contaminação, uma das maiores limitações do emprego da PCR como método de diagnóstico. Enquanto que os controles positivos serviram para avaliar a qualidade dos reagentes (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990) e do próprio processo de extração, como também estimar a qualidade da reação pela intensidade relativa das bandas.

Para detectar a presença de contaminantes nos componentes da reação, introduziu-se, no protocolo, um tubo contendo a fase inferior e superior, mas sem produto extraído (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; ERLICH *et alii*, 1991).

Etapa D - VISUALIZAÇÃO DO PRODUTO DA REAÇÃO

Para a separação e posterior identificação dos fragmentos de base resultantes da amplificação, empregamos a técnica de eletroforese em gel de agarose NUSieve, por ser mais prática do que em gel de poliacrilamida além de apresentar uma resolução na faixa de peso molecular a ser visualizada (MOSER *et alii*, 1989; AVILA *et alii*, 1991 e 1993).

D1 - Eletroforese

Em uma pequena cuba de eletroforese (modelo Submarine mini-gel - marca Sigma Chemical Company, USA), adicionamos 200 ml de agarose (uma parte de agarose NUSieve GTG - marca FMC BioProducts, USA e a outra parte de agarose SeaKem GTG - marca FMC BioProducts, USA) a 2% (MULLIS *et alii*, 1986). Após solidificação da agarose, a mesma foi banhada em tampão TBE 1x (tris-ácido bórico - EDTA) (tris - marca GIBCO BRL, USA / ácido bórico *Ultra-Pure* - marca GIBCO BRL, USA / EDTA, *Dehydrate* - marca Sigma Chemical Company, USA) pH 8.3 e a seguir introduzidas as alíquotas a serem corridas. A ordem de aplicação foi a seguinte: no primeiro *slot*, 15 µl do marcador de peso molecular φx174 DNA Hae III (marca Sigma Chemical Company, USA); e nos *slots* seguintes, 15 µl de cada amostra submetida à amplificação misturada a 2 µl do corante azul de bromofenol [composição do tampão de aplicação: 0,25% azul de bromofenol + 0,25% xileno-cianol FF (blue bromophenol - marca Sigma Chemical Company, USA) + 30% glicerol (marca Sigma Chemical Company, USA) em água]. Após ocupar todos os *slots*, promoveu-se uma corrida de aproximadamente 1 hora e 30 minutos a 70 V (volts), utilizando uma fonte com duas entradas e duas saídas (fonte modelo P250A - marca Sigma Chemical Company, USA)

D2 - Revelação

O gel foi corado por 15 minutos sob um misturador (*Rocker Platform* modelo RP-50 - marca Elmeco, USA) à temperatura ambiente em 5 µg/ml de brometo de etídeo diluído em tampão TBE 1x e descorado por mais 15 minutos em água destilada. Passado esse tempo, transferimos o gel para um transiluminador de luz ultravioleta (modelo TM-20, *Dual-Intensity* - marca UVP, USA) e o fotografamos para futura análise (sistema fotográfico marca Polaroid).

A visualização de uma única banda de peso molecular 330 pb indicou a presença de kDNA de *T. cruzi* amplificado, PCR positiva (STURM *et alii*, 1989).

Etapa E - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DA β -GLOBINA

Nos casos em que a amostra de sangue apresentou PCR negativa, realizou-se uma nova amplificação, empregando iniciadores específicos para o gene da β -globina humana. Essa nova amplificação permitiu saber se o resultado negativo não foi devido a fatores inibitórios presentes no sangue (ROLFS *et alii*, 1992).

Usamos o mesmo protocolo citado nas etapas anteriores, exceto os oligonucleotídeos que foram substituídos por PCO3 (5'-ACACAAACTGTGTTCACTAGC-3') e PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTTACC-3') (SAIKI *et alii*, 1985). O número de ciclos térmicos também foi alterado para 25.

Etapa F - AMPLIFICAÇÃO DO DNA DO *T. cruzi* PROVENIENTES DE XENODIAGNÓSTICOS POSITIVOS

Dos 5 indivíduos com PCR negativo em que foram encontrados *T. cruzi* circulantes no sangue, através do xenodiagnóstico ou da hemocultura, conseguimos, em 4 deles, isolar o parasita em meio LIT, procedente das ninfas positivas aplicadas no xenodiagnóstico. Desses parasitas, extraímos o seu DNA e submetemos à PCR, com a finalidade de verificar se a amplificação negativa na amostra de sangue total foi devido a uma variação na seqüência de kDNA onde os *primers* 121 e 122 se hibridizam. O protocolo seguido foi idêntico ao utilizado para a amostra de sangue total.

O parasita detectado no outro indivíduo que apresentou PCR negativa e hemocultura positiva, não se manteve em cultura, apesar das várias tentativas de repique em meio LIT. Neste caso, a alternativa seria realizar a técnica de amplificação em uma amostra do tubo de hemocultura original, porém este já havia sido eliminado quando resolvemos introduzir a "Etapa F" no protocolo.

CUIDADOS TOMADOS DURANTE A EXECUÇÃO DA TÉCNICA DE PCR

Vários procedimentos foram seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; SARKAR & SOMMER, 1990; KITCHEN & BOOTMAN, 1993):

- v as "Etapas B e C" relatadas anteriormente, foram executadas em capela (modelo *Tamer Template Tm* 14500 - marca Coy Corporation, USA) e câmara de fluxo laminar (modelo 10557 - marca EACI ENVIRCO - Environmental Air Control INC., USA) individualizadas;
- v empregaram-se materiais de consumo não usados anteriormente (não reciclados);
- v os reagentes foram distribuídos em pequenas alíquotas;
- v utilizaram-se apenas ponteiros protegidas com uma barreira de filtro;
- v os tubos de *ependorf* empregados (modelo Eppendorf *Safe-lock* de 1,5 ml e 0,5 ml - *micro test tubes* - marca Eppendorf, Germany) apresentavam um sistema de lacre para evitar extravasamento das amostras durante a homogeneização;
- v todo o material permanente, incluindo os aparelhos, eram "limpos" com hipoclorito de sódio e submetidos à luz ultravioleta. Utilizamos as lâmpadas ultravioletas do aparelho *Stratalinker* (modelo 1800 - marca Stratagene, USA) para degradação de DNA exógeno;
- v durante toda a execução da técnica, usaram-se luvas, que eram trocadas e descartadas a cada amostra processada;
- v o manuseio do produto amplificado era sempre realizado em uma sala em separado, com equipamentos também individualizados e, de preferência, por um profissional que não havia trabalhado na extração e preparação dos reagentes.

Na etapa da pré-amplificação, todos os tubos com os reagentes foram deixados em banho de gelo até o momento de serem introduzidos na máquina de amplificação.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.3.1. CÁLCULO DO NÚMERO DE INDIVÍDUOS

O dimensionamento do tamanho da amostra necessário para compor o grupo de estudo foi baseado na taxa de positividade sorológica global encontrada com a técnica em papel de filtro.

O método empregado foi o da amostragem aleatória simples, que indicou o número 85. Este critério de escolha teve como finalidade representar o perfil dos 252 indivíduos sorologicamente positivos em relação à presença de *T. cruzi* no sangue.

4.3.2. PROCEDIMENTO DE COLETA DA AMOSTRA

Por motivos logísticos, como defeito na centrífuga empregada na técnica de hemocultura, espera de uma nova remessa de triatomíneos (devido à mortalidade no transporte) para serem empregados no xenodignóstico, o procedimento de coleta não pôde ser seguido de forma sistemática como pretendeu-se quando elaborado o projeto e calculado o número de indivíduos.

4.3.3. TESTES ESTATÍSTICOS APLICADOS AOS RESULTADOS

Para análise dos dados utilizamos o seguinte:

a) tabulação cruzada das variáveis qualitativas com teste qui-quadrado corrigido;

b) teste de diferença de proporção;

c) teste "T";

d) regressão linear simples e coeficiente de correlação;

e) teste de diferença de médias;

f) média, mediana e moda;

O nível de significância escolhido foi igual a 0,05.

Parte dos dados foram analisados no programa de informática EPI INFO, versão 6 (DEAN *et alii*, 1994).

5. RESULTADOS

5.1. TESTES SOROLÓGICOS

Como anteriormente relatado em "Materiais e Métodos", dos 4.212 indivíduos investigados inicialmente, 252 (5,98%) apresentaram sorologia positiva em papel de filtro pela técnica de IFI. Dentro deste grupo de positivos, coletamos 109 amostras de sangue e realizamos mais duas reações sorológicas confirmatórias a IFI e ELISA no plasma, que confirmaram os resultados positivos respectivamente em 103 e 99 indivíduos. Os outros 6 foram negativos em ambas as reações. A IFI qualitativa mostrou títulos de até 1/640; não se efetuou a mesma análise quantitativa com ELISA, uma vez que Bio-Manguinhos não nos pôde fornecer quantidade suficiente de *kit*, visto que o mesmo não entrou em linha de produção.

O mesmo procedimento confirmatório foi aplicado em 21 indivíduos controles negativos no papel de filtro, onde tanto as reações de IFI e ELISA foram ao mesmo tempo não reagentes em 20, ficando apenas uma amostra com resultado duvidoso na IFI e positivo na ELISA, por isso ela foi retirada de estudo.

Os índices de concordância entre os resultados da reação sorológica de IFI e de ELISA realizadas com soro, do resultado da reação de IFI efetuada com amostras de sangue coletadas em papel de filtro no grupo de 109 indivíduos positivos e 21 negativos foram os seguintes: confirmação da positividade em 94,49% pela IFI no soro e 90,82% na ELISA; quanto à negatividade, ela foi confirmada em 95,23% através de ambas as reações (IFI no plasma e ELISA)

O estudo comparativo foi realizado em 103 indivíduos; 99 tiveram tanto a IFI como a ELISA positivas e 4 a IFI positiva e ELISA negativa. Porém, com 2 deles tivemos problema na aplicação do xeno e na coleta de sangue, por isso os excluímos da análise. Dentre estes estava o único indivíduo com menos de 10 anos. O grupo final ficou sendo de 101 indivíduos.

5.2. XENODIAGNÓSTICO

5.2.1. POSITIVIDADE GLOBAL

Devido à grande mortalidade ocorrida com as ninfas de *T. infestans*, levadas do nosso laboratório no Rio de Janeiro para a área endêmica, não foi possível aplicar em todos os

indivíduos as duas espécies de triatomíneos como planejado inicialmente. A distribuição ficou da seguinte forma: em 77 indivíduos aplicamos ambas as espécies, 20 ninfas de *P. megistus* e 20 ninfas de *T. infestans* e nos 24 restantes o xenodiagnóstico foi realizado com 40 ninfas apenas de *P. megistus*.

Através do xenodiagnóstico, conseguimos detectar *T. cruzi* em 36 (35,6%) indivíduos dos 101 submetidos ao exame (TAB. 1). Destes 36 positivos, 29 pertenciam ao grupo em que foram aplicadas as duas espécies (*P. megistus* e *T. infestans*) e 7 ao outro, onde empregamos apenas uma espécie (*P. megistus*). A diferença entre os dois grupos não foi significativa do ponto de vista estatístico pelo teste da diferença de proporções (TAB. 2).

Dos 29 xenodiagnósticos positivos em 77 aplicados com *T. infestans* e *P. megistus* concomitantemente, 12 (15,6%) foram devido exclusivamente às ninfas de 4º estágio de *P. megistus*, 5 (6,5%) às de *T. infestans* e 12 (15,6%) a ambas as espécies. A espécie *P. megistus* demonstrou uma sensibilidade maior para detectar *T. cruzi*, o que foi confirmado estatisticamente pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$) (TAB. 3).

5.2.2. POSITIVIDADE DAS NINFAS

Nos 77 xenodiagnósticos realizados com as duas espécies de triatomíneos, encontramos 49 ninfas de *P. megistus* positivas (4,1%) em 1.185 examinadas e 30 positivas (3,0%) de *T. infestans* em 998 examinadas. Empregando o teste de diferença de proporções, verificamos que esta diferença no número de ninfas positivas não é significativa estatisticamente (TAB. 4).

Pelo número de ninfas examinadas, notamos que houve uma mortalidade de 82 (6,5%) exemplares de *P. megistus* e de 289 (22,5%) da outra espécie (*T. infestans*). Estes percentuais foram calculados em cima do número de ninfas alimentadas e separadas para a leitura, uma vez que as não alimentadas foram desprezadas. Essa grande diferença de mortalidade torna desnecessário algum cálculo estatístico. Em ambas as espécies, as ninfas mortas foram, também, examinadas, porém em nenhuma delas detectou-se *T. cruzi*.

No outro grupo, onde aplicou-se apenas ninfas de *P. megistus*, verificamos que 28 (4,2%) delas apresentaram *T. cruzi* em 664 examinadas (TAB. 5). Este percentual de positividade foi praticamente idêntico ao obtido com a mesma espécie no grupo de 77 xenodiagnósticos, isto confirmou-se estatisticamente no teste de diferença de proporções. Nestes 24 xenodiagnósticos realizados, encontramos, durante o exame, além das 664 ninfas

vivas mais 59 mortas (8,2%), o que não representou diferença estatisticamente significativa com 6,5% encontrado anteriormente. Nenhuma ninfa morta deste grupo apresentou *T. cruzi* ao ser examinada.

A distribuição do número de ninfas positivas nos 36 indivíduos positivos pelo xenodiagnóstico variou de 1 a 14 exemplares; sendo que 17 (47%), dos 36 positivos, apresentaram apenas uma ninfa positiva. Essa alta concentração em apenas uma frequência está demonstrada nos valores calculados de média, mediana e moda, sendo, respectivamente, 2,9; 2,0 e 1,0 (TAB. 6).

5.2.3. NÚMERO DE NINFAS ALIMENTADAS APÓS A APLICAÇÃO

Das 3.080 ninfas empregadas nos 77 xenodiagnósticos com duas espécies (1.540 *P. megistus* e 1.540 *T. infestans*), alimentaram-se no total 2.554 (82,9%), sendo: 1.267 (41,1%) de *P. megistus* e 1.287 (41,8%) de *T. infestans*. Individualmente o percentual de *P. megistus* e *T. infestans* alimentados foi o correspondente a 82,3% (1267 em 1540) e 83,5% (1287 em 1540), respectivamente. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi demonstrada pelo teste do qui-quadrado (TAB. 4).

Ao calcularmos o percentual de *P. megistus* alimentados em cima dos 1.540 aplicados no grupo de 77 indivíduos, comprovamos que 82,3% deles se alimentaram (1.267 em 1.540). Em contrapartida, das 960 espécimes de *P. megistus* empregadas nos 24 xenodiagnósticos realizados com apenas uma espécie, 75,3% (723 em 960) estavam alimentadas após aplicação. Demonstrou-se, através do teste de diferença de proporções, que existe diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (TAB. 4 e TAB.5).

5.2.4. NÚMERO DE NINFAS EXAMINADAS

Nós denominamos número de ninfas examinadas (TAB. 4) ao número de exemplares que sobreviveram até o dia do exame, quando então realizou-se a pesquisa do parasita.

Na data da leitura, existiam 1.185 (93,5%) e 664 (91,5%) exemplares de *P. megistus* vivos respectivamente dos 1267 e 723 que conseguiram se alimentar no grupo correspondente a 77 e 24 indivíduos. Em relação ao *T. infestans*, foram encontrados vivos 998 (77,5%) exemplares dos 1287 que ingeriram sangue nos 77 indivíduos submetidos concomitantemente com *P. megistus*.

5.2.5. QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA PELAS NINFAS

A quantidade de sangue total ingerida pelas duas espécies empregadas foi correspondente a 131,6 gramas para *P. megistus* e 107,1 gramas para as de *T. infestans*, nos 77 xenodiagnósticos realizados com ambas as espécies (TAB. 4). Nos 24 xenodiagnósticos restantes, onde aplicou-se *P. megistus* sozinho, o total de sangue foi de 58,7 gramas (TAB. 5).

Para calcularmos a quantidade de sangue ingerido por um exemplar, dividimos o valor encontrado em cada xenodiagnóstico pelo seu número de ninfas alimentadas, a seguir tiramos a média em 77 e 24 exames realizados e achamos a quantidade média de sangue ingerido por uma ninfa. Os valores obtidos foram 0,108 e 0,098 para *P. megistus* e *T. infestans*, respectivamente, nos 77 xenodiagnósticos; esses valores não foram estatisticamente significativos pelo teste de diferença das médias. E nos outros 24 xenodiagnósticos, cada ninfa de *P. megistus* ingeriu 0,08 gramas, essa diferença foi estatisticamente significativa em relação a mesma espécie no grupo de 77.

Ao analisarmos a frequência da quantidade de sangue ingerido pelo total de ninfas alimentadas em cada um dos 101 xenodiagnósticos realizados, verificamos que os valores da média, mediana e moda foram, respectivamente, 2,9; 3,1 e 3,2. Apesar da proximidade muito grande dos três números anteriores, encontramos uma variação na quantidade de sangue ingerido de 1,0 a 5,4 gramas (TAB. 7 e GRÁF. 1). Nesta mesma tabela, notamos que a grande maioria dos xenodiagnósticos (69,3%) se encontram na faixa de 2 a 2,9 gramas e de 3 a 3,9 gramas de sangue.

Com a finalidade de verificar a importância da quantidade de sangue no número de xenodiagnósticos positivos e negativos, fizemos diversos cruzamentos entre as cinco faixas estratificadas de sangue ingerido, não encontramos associação estatisticamente significativa pelo teste do qui-quadrado (TAB. 8). Nem quando juntamos as faixas 4 a 4,9 e 5 a 5,9 e comparamos com a de 1 a 1,9, ao calcularmos o coeficiente de correlação, achamos $r = 0,01$. No entanto, o gráfico de regressão linear mostrou uma leve tendência de crescimento para a direita. Provavelmente se tivéssemos maior número de casos positivos e negativos nas faixas extremas das frequências estabelecidas, poderíamos chegar a uma conclusão mais firme da hipótese.

5.3. HEMOCULTURA

5.3.1. POSITIVIDADE GLOBAL

Dos 101 indivíduos investigados através da técnica de hemocultura, detectamos *T. cruzi* em 26 (25,7%) deles (TAB. 1).

5.3.2. POSITIVIDADE POR TUBO

Apesar das condições de assepsia criadas na sala onde o sangue foi processado para ser semeado, um número expressivo de tubos estavam contaminados, a grande maioria com bactéria e um número menor por fungo.

O sangue coletado de cada indivíduo foi semeado e distribuído em 5 tubos, perfazendo um total de 505 tubos semeados e examinados, destes 41 (8,1%) apresentavam *T. cruzi*.

A distribuição do número de tubos que apresentaram *T. cruzi* pelos 26 indivíduos positivos variou de 1 a 5 tubos. A grande maioria destes indivíduos, 17 (65,4%) apresentou apenas 1 tubo positivo (TAB. 9). Na frequência estabelecida, tivemos como média, mediana e moda os seguintes resultados, respectivamente: 1,57; 1,0 e 1,0.

Não verificamos diferença de positividade entre o tubo (n° 1) que recebeu a camada leucocitária daqueles (n^{os} 2, 3, 4 e 5) em que foi semeada a papa de hemáceas. A distribuição ficou da seguinte maneira: tubo n° 1 = 7 positivos; tubo n° 2 = 9 positivos; tubo n° 3 = 9 positivos; tubo n° 4 = 8 positivos e tubo n° 5 = 8 positivos.

5.3.3. RELAÇÃO DA POSITIVIDADE COM O PERÍODO DO EXAME

A grande maioria dos indivíduos positivos pela hemocultura, cerca de 57,7% (15/26), foi detectada aos 45 dias. Os outros 15,4% (4/26), 19,2% (5/26) e 7,7% (2/26) tiveram sua positividade comprovada, respectivamente, aos 60, 90 e 120 dias após o data em que o sangue foi semeado (GRÁF. 2).

Nenhum indivíduo apresentou resultado positivo no exame do precipitado obtido após centrifugação dos tubos negativos na leitura dos 120 dias.

5.4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Esta técnica comprovou DNA de *T. cruzi* em 60 (59,4%) dos indivíduos com sorologia positiva, sendo que dois destes apresentavam IFI (+), porém ELISA (-) (TAB. 1). Nesse grupo de 60 positivos, houve amostras em que a positividade não foi comprovada apenas aos 35 ciclos, uma vez que as extrações negativas ou aquelas em que tivemos dúvida na visualização da banda de 330 pb, nós repetimos a amplificação com 40 ciclos e conseguimos detectar DNA em 14.

A FIG. 9 mostra o que foi obtido com os produtos amplificados de amostras de sangue de indivíduos sorologicamente positivos, onde podemos notar a variação da intensidade das bandas de 330 pb entre cada paciente.

Em uma outra série de amplificações realizadas exclusivamente com as amostras PCR negativas, após a tentativa de amplificar a seqüência alvo específica dos minicírculos de kDNA do *T. cruzi*, conseguimos detectar através da PCR o gene da β -globina humana em todas elas. Este resultado demonstrou a não existência de agentes inibidores nas alíquotas de sangue extraídas, que poderiam estar gerando resultados "falso negativos" (FIG.10B). Nestas reações com oligonucleotídeos iniciadores para β -globina incluímos 5 amostras de indivíduos que tiveram PCR (-), porém xenodiagnóstico ou hemocultura positiva.

Complementando as investigações, conseguimos amplificar a seqüência alvo específica dos minicírculos de kDNA *T. cruzi* de 4 isolados do parasita provenientes de 4 dos 5 indivíduos que tiveram PCR (-) e um dos exames parasitológicos positivos (FIG. 10A). Do quinto indivíduo, o que apresentou PCR (-) porém hemocultura positiva, não conseguimos recuperar o parasita, mesmo após várias tentativas de crescimento em LIT.

As amostras de sangue de 20 indivíduos sorologicamente negativos, oriundas da área investigada, e de 3 pessoas residentes no Rio de Janeiro sem história para infecção pelo *T. cruzi*, utilizadas como controle a cada série de amplificações "teste", apresentaram a reação de amplificação específica para *T. cruzi* (-). Elas foram processadas concomitantemente com as alíquotas provenientes dos 101 indivíduos investigados, uma vez que serviam de controle para possíveis contaminações.

5.5. CRUZAMENTO DO RESULTADO DO XENODIAGNÓSTICO, DA HEMOCULTURA E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Dos 101 indivíduos estudados, 47 pertenciam ao sexo feminino e os outros 54 ao sexo masculino, sendo 27 (57,4%) e 38 (70,4%) respectivamente positivos empregando-se concomitantemente o xenodiagnóstico, a hemocultura e a PCR (TAB. 10). Pelo teste de diferença de proporções demonstrou-se não haver diferença, estatisticamente significativa, de positividade em relação ao sexo. Tanto nos indivíduos do sexo masculino como do feminino, os maiores índices de positividade foram detectados pela técnica da PCR, a seguir pelo xenodiagnóstico e os mais baixos pela hemocultura. (GRÁF. 3).

De acordo com a idade dos indivíduos investigados, 53 deles pertenciam a faixa etária de 10 a 49 anos (apenas 2 apresentavam idade entre 10 a 19 anos) e 48 estavam acima desta, não existindo nenhum abaixo de 10 anos, por motivos relatados em "Materiais e Métodos". Estratificando em faixas de 10 em 10 anos, esse número é bem variável, assemelhando-se apenas na frequência de 40 a 49 anos e de 60 em diante, ambas compostas por 32 indivíduos. Nestas duas faixas o percentual de positividade, empregando os 3 testes, foi de 81,2% e 65,6%, respectivamente, mais altos que das outras quatro faixas (TAB. 11).

Ao correlacionarmos os índices de positividade obtidos nos 6 grupos etários, encontramos diferenças estatisticamente significativas entre as faixas de 40 - 49 com a de 50 - 59; e de 30 -39 com a de 40 - 49. Porém, devido ao número muito variável de indivíduos que compõem cada estratificação, consideramos que seja mais correto correlacionar os indivíduos de 20 a 49 anos (51), com os de 50 em diante (48), uma vez que trabalhos anteriores relatam que a maior parasitemia é encontrada em pacientes chagásicos com menos de 19 e acima de 50 anos, sendo a menor, na faixa intermediária de 20 a 49 anos. Entretanto, quando comparamos os resultados destas duas faixas, não encontramos diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Constatamos, também, que a taxa de positividade por teste em cada faixa etária decresce sempre no sentido PCR, xenodiagnóstico e hemocultura (GRÁF. 4).

Se considerarmos apenas os indivíduos acima de 20 anos e estratificarmos nas faixas etárias de 20 - 49 anos e de 50 em diante, os 47 indivíduos que compõem o grupo feminino e os 53 do grupo masculino, verificamos uma distribuição homogênea do número de indivíduos investigados e uma maior positividade não significativa em homens do que em mulheres em ambas as faixas. A distribuição geral ficou sendo: faixa de 20 a 49 anos composta de 25 indivíduos do sexo feminino e 27 do sexo masculino, com, respectivamente, 14 (56,0%) e 21 (77,8%) casos positivos; faixa de 50 anos em diante composta de 22 indivíduos do sexo

feminino e 26 do sexo masculino, com, respectivamente, 12 (54,6%) e 17 (65,4%) de casos positivos (TAB. 12).

Os dados obtidos, empregando-se o xenodiagnóstico, a hemocultura e a PCR nos 101 indivíduos investigados, demonstraram que dentro dos 36 casos positivos pelo xenodiagnóstico, 4 foram apenas por este exame, 12 comum com a PCR e 20 concomitantemente com PCR e hemocultura. Dos 26 indivíduos positivos pela hemocultura, em um comprovou-se *T. cruzi* apenas por esta técnica, 5 tiveram PCR positivo conjuntamente e os outros 20, como já foi relatado anteriormente, também apresentaram PCR e xenodiagnóstico positivos. Esses números indicam que empregando apenas os testes parasitológicos foi possível comprovar 42 indivíduos com o *T. cruzi*; dentro destes, houve 5 indivíduos que tiveram amostras de sangue onde não se conseguiu detectar DNA de *T. cruzi* através da PCR e 37 onde a mesma técnica teve sucesso na detecção. Além destes 37, a PCR comprovou mais 23 casos positivos. Demonstrou-se, assim, que utilizando-se o xenodiagnóstico, a hemocultura e a PCR ao mesmo tempo, foi possível verificar a infecção em 65 indivíduos dos 101 investigados (GRÁF. 5).

A análise estatística empregando o teste do qui-quadrado com correção de Yates comprovou que além dos dados absolutos demonstrarem resultados diferentes entre as 3 técnicas investigadas, estes foram estatisticamente significativos como veremos a seguir.

Ao cruzarmos xenodiagnóstico com hemocultura, o xenodiagnóstico apresentou uma positividade maior (TAB. 13), quando substituímos a hemocultura por PCR, o segundo comprovou ser melhor (TAB. 14). Comparando o resultado da PCR somente com os da hemocultura, o primeiro foi bem maior (TAB. 15).

Somando os dois parasitológicos e cruzando com PCR, verificamos que este continua apresentando resultados mais significativos ($p < 0,000002$) (TAB. 16). Nos quatro cruzamentos expostos nas tabelas 13, 14, 15 e 16 os valores de p foram menores que 0,05, ficando entre 0,00001 e 0,000001.

Ao relacionarmos o resultado da PCR com o número de ninfas e tubos encontrados positivos nos exames respectivamente de xenodiagnóstico e de hemocultura, atentamos para o fato de que, nos 5 casos PCR negativos, 3 deles tiveram xenodiagnóstico positivo, comprovado por uma única ninfa e 1 através de duas ninfas; o quinto por apenas um tubo entre os cinco semeados na hemocultura (TAB. 17 e TAB. 18). O que provavelmente indica baixa parasitemia neste cinco casos.

Por último, fizemos vários cruzamentos entre os dados obtidos com a técnica da PCR e do xenodiagnóstico segundo a quantidade de sangue ingerida pelo *pool* de ninfas

alimentadas em cada xenodiagnóstico aplicado (TAB. 19 - GRÁF. 6). A idéia desse cruzamento partiu da hipótese de que quando a quantidade de sangue ingerido pelo *pool* de ninfas alimentadas em cada xenodiagnóstico se aproxima de 5 ml (quantidade de sangue coletada para a PCR), os resultados entre PCR e xenodiagnóstico se assemelhariam. Após análise estatística através do teste do qui-quadrado, verificamos que os dois exames se assemelham na faixa de 1 a 1,9 gramas, 4 a 4,9 gramas e de 5 a 5,9 gramas, o que, em parte, endossa a nossa hipótese. Apesar disso, a casuística que compõe estes dois últimos grupos é muito pequena, o que prejudica a veracidade da análise, e também o fato de não haver diferença estatisticamente significativa com a faixa de 1 a 1,9 gramas.

5.6. TABELAS E GRÁFICOS

TABELA 1

RESULTADOS DAS 3 TÉCNICAS EMPREGADAS NA DETECÇÃO DO T. cruzi

Técnica	Resultados					
	Positivos		Negativos		TOTAL	
	Absolutos	%	Absolutos	%	Absoluto	%
PCR	60	59,4	41	40,6	101	100,0
Xenodiagnóstico	36	35,6	65	64,4	101	100,0
Hemocultura	26	25,7	75	74,3	101	100,0

TABELA 2

POSITIVIDADE DO XENODIAGNÓSTICO EMPREGANDO
 UMA ESPÉCIE (40 NINFAS DE *P. megistus*) e
 DUAS ESPÉCIES (20 NINFAS DE *P. megistus* e 20 NINFAS DE *T. infestans*)

Técnica	Resultados					
	Positivos		Negativos		TOTAL	
	Absolutos	%	Absolutos	%	Absoluto	%
1 Espécie (40 P. meg.)	7	29,1	17	70,9	24	100,0
2 Espécies (20 P. meg. e 20 T. inf.)	29	37,7	48	62,3	77	100,0
TOTAL	36	35,6	65	64,4	101	100,0

Nota: Percentagens calculadas sobre os respectivos totais.

TABELA 3

POSITIVIDADE DOS 77 XENODIAGNÓSTICOS DE ACORDO COM AS
 DUAS ESPÉCIES EMPREGADAS

T. infestans	P. megistus					
	Positivos		Negativos		TOTAL	
	Absolutos	%	Absolutos	%	Absoluto	%
Positivos	12	15,6	5	6,5	17	22,1
Negativos	12	15,6	48	62,3	60	77,9
TOTAL	24	31,2	53	68,8	77	100,0

TABELA 4

POSITIVIDADE E QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA PELAS NINFAS
 APLICADAS NOS 77 XENODIAGNÓSTICOS EM QUE FORAM EMPREGADAS 2
 ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS (*T. infestans* E *P. megistus*)

Espécie	Número de Ninfas				Quantidade Sangue Ingerido (gramas)	
	Empregadas	Alimentadas	Examinadas	Positivas	Média por Ninfa	Total
<i>P. megistus</i>	1.540	1.267 (82,3%)	1.185 (93,5%)	49 (4,1%)	0,10	131,6
<i>T. infestans</i>	1.540	1.287 (83,5%)	998 (77,5%)	30 (3,0%)	0,09	107,1
<i>P. meg.</i> / <i>T. inf.</i>	3.080	2.554 (82,9%)	2.183 (85,5%)	79 (3,6%)	0,09	238,7

TABELA 5

POSITIVIDADE E QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA PELAS NINFAS
 APLICADAS NOS 24 XENODIAGNÓSTICOS EM QUE FOI EMPREGADA 1 ESPÉCIE
 DE TRIATOMÍNEO (*P. megistus*)

Espécie	Número de Ninfas				Quantidade Sangue Ingerido (gramas)	
	Empregadas	Alimentadas	Examinadas	Positivas	Média por Ninfa	Total
<i>P. megistus</i>	960	723 (75,3%)	664 (91,8%)	28 (4,2%)	0,08	58,7

TABELA 6

FREQÜÊNCIA ABSOLUTA E RELATIVA DO NÚMERO DE NINFAS POSITIVAS NOS 36 XENODIAGNÓSTICOS POSITIVOS

Número de Ninfas Positivas	Nº de Xenos Positivos	
	Absolutos	%
1	17	47,2
2	7	19,4
3	2	5,6
4	5	13,9
6	1	2,8
8	1	2,8
10	1	2,8
12	1	2,8
14	1	2,8
TOTAL	36	100,0

Média = 2,9 Mediana = 2,0 Moda = 1,0

TABELA 7

FREQÜÊNCIA ABSOLUTA E RELATIVA DA QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDO PELO *POOL* DE NINFAS ALIMENTADAS EM CADA UM DOS 101 XENODIAGNÓSTICOS REALIZADOS

Quantidade de Sangue Ingerido (gramas)	Nº de Xenos Aplicados	
	Absolutos	%
0 - 0,9	0	0,0
1 - 1,9	17	16,8
2 - 2,9	30	29,7
3 - 3,9	40	39,6
4 - 4,9	11	10,9
5 - 5,9	3	3,0
6 - 6,9	0	0,0
TOTAL	101	100,0

Média = 2,9 Mediana = 3,1 Moda = 3,2

GRÁFICO 1

QUANTIDADE, EM GRAMAS, INGERIDA PELO "POOL" DE TRIATOMÍNEOS ALIMENTADOS EM CADA UM DOS 101 XENODIAGNÓSTICOS REALIZADOS

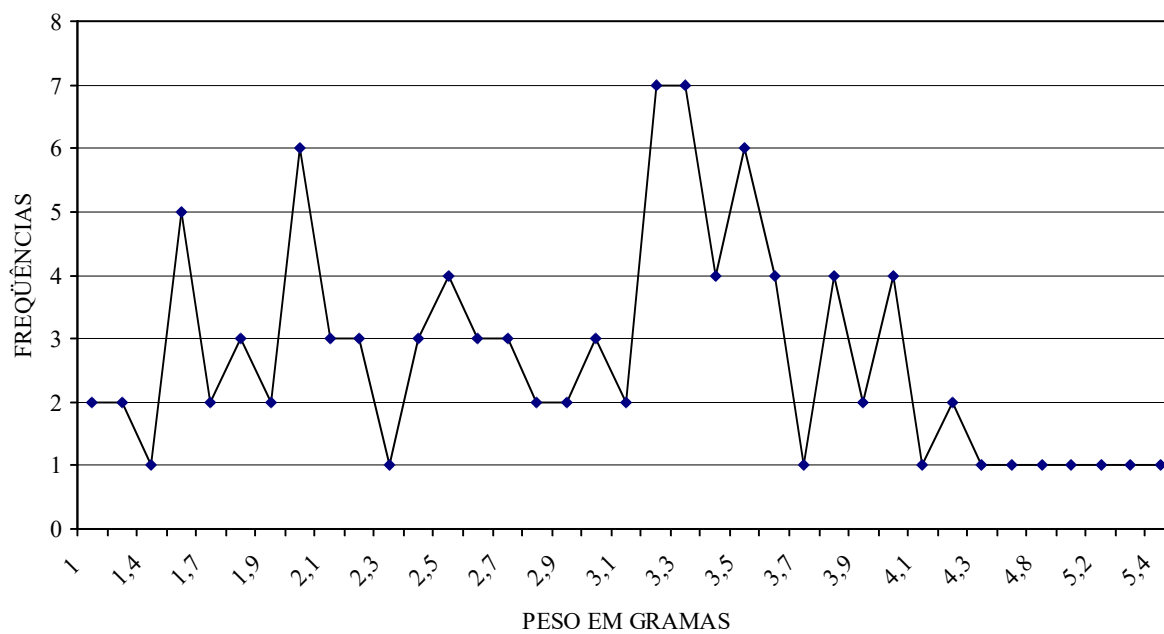


TABELA 8

DISTRIBUIÇÃO POR FREQUÊNCIA DA QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDO
PELO *POOL* DE NINFAS ALIMENTADAS SEGUNDO O
RESULTADO DO XENODIAGNÓSTICO

Quantidade de Sangue Ingerido (gramas)	Número de Xenodiagnósticos					
	Positivos		Negativos		Aplicados	
	Absolutos	%	Absolutos	%	Absolutos	%
1 - 1,9	3	3,0	14	13,9	17	16,9
2 - 2,9	13	12,9	17	16,8	30	29,7
3 - 3,9	14	13,9	26	25,7	40	39,6
4 - 4,9	5	4,9	6	5,9	11	10,8
5 - 5,9	1	1,0	2	2,0	3	3,0
6 - 6,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
TOTAL	36	35,7	65	64,3	101	100,0

TABELA 9

FREQÜÊNCIAS ABSOLUTA E RELATIVA DO NÚMERO DE TUBOS
POSITIVOS NAS 26 HEMOCULTURAS POSITIVAS

Número de Tubos Positivos	Nº de Hemoculturas Positivas	
	Absoluto	%
1	17	65,4
2	6	23,1
3	1	3,8
4	1	3,8
5	1	3,8
TOTAL	26	100,0

Média = 1,577 Mediana = 1,000 Moda = 1,000

GRÁFICO 2

POSITIVIDADE DA HEMOCULTURA EM 101 INDIVÍDUOS SOROLOGICAMENTE POSITIVOS DE ACORDO COM O PERÍODO DE EXAME

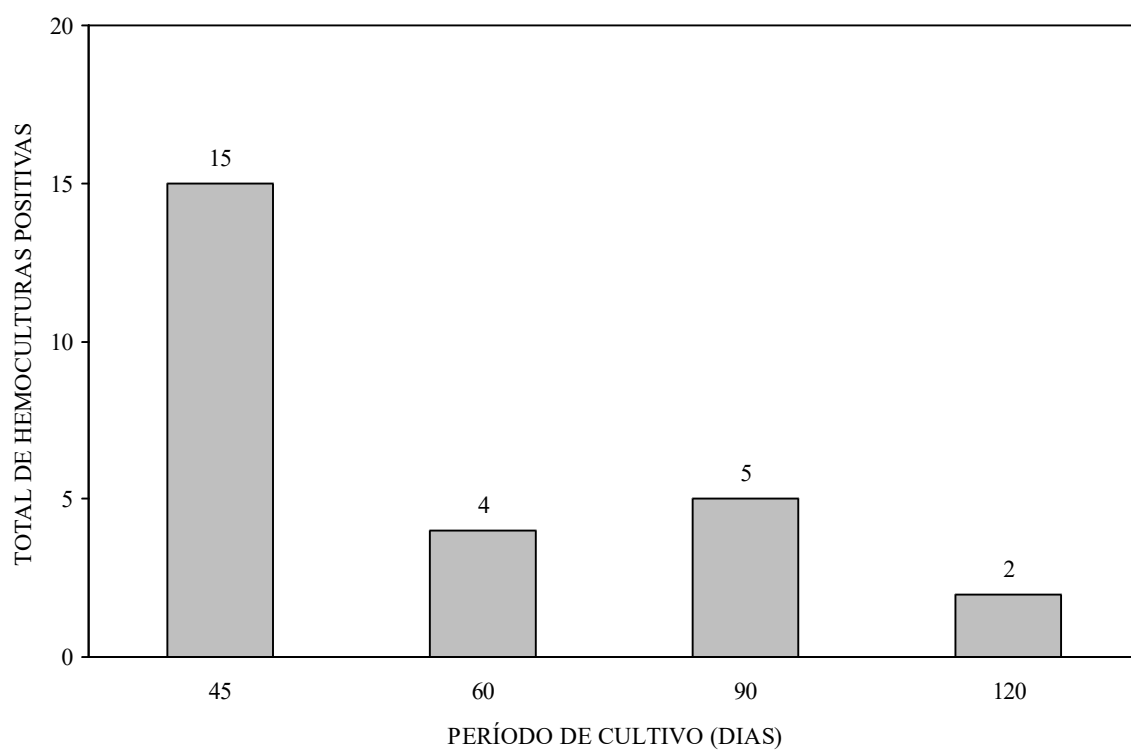


TABELA 10

DISTRIBUIÇÃO DOS 101 INDIVÍDUOS INVESTIGADOS DE ACORDO COM O SEXO E O ÍNDICE DE POSITIVIDADE OBTIDO EMPREGANDO OS MÉTODOS DE PCR, XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA

SEXO	Índice					
	Negativo		Positivo		TOTAL	
	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
FEMININO	20	42,6	27	57,4	47	46,5*
MASCULINO	16	29,6	38	70,4	54	53,5*
TOTAL	36	35,6*	65	64,4*	101	100

* Percentagem calculada em cima dos 101 realizados.

GRÁFICO 3

ÍNDICE DE POSITIVIDADE PARA "T. cruzi" POR TÉCNICA UTILIZADA EM FUNÇÃO DO SEXO

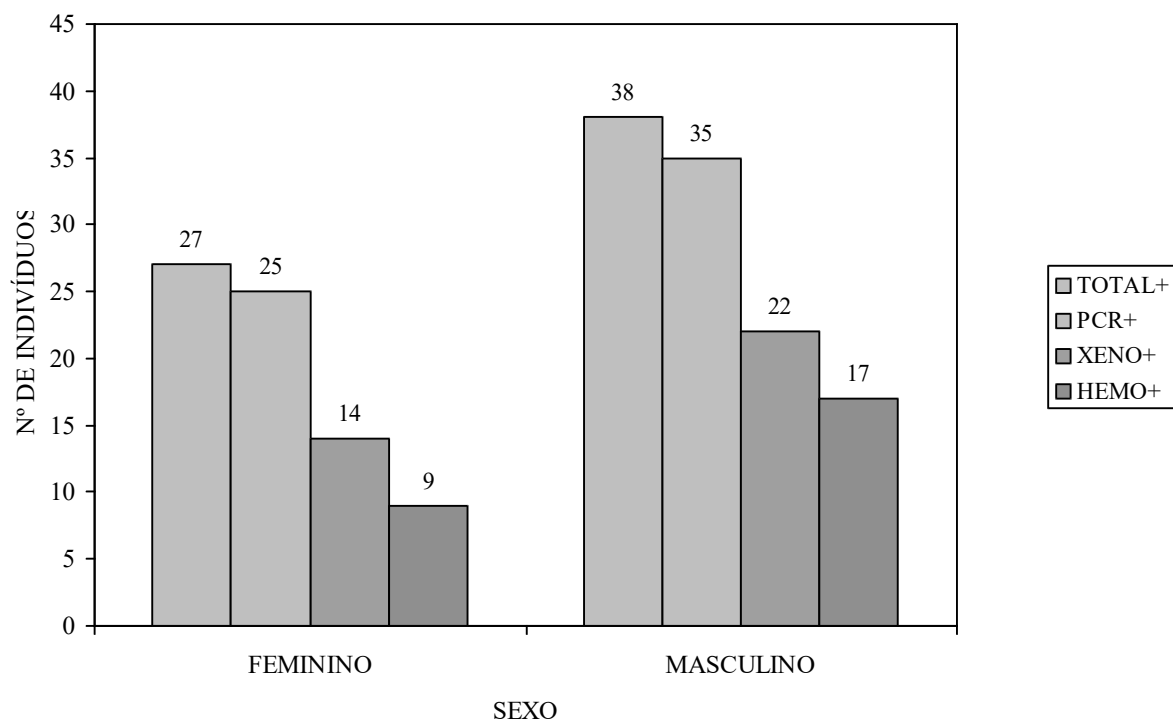


TABELA 11

DISTRIBUIÇÃO DOS 101 INDIVÍDUOS INVESTIGADOS DE ACORDO COM A IDADE E O ÍNDICE DE POSITIVIDADE OBTIDO EMPREGANDO OS MÉTODOS DE PCR, XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA

Faixa Etária (Anos)	Índice					
	Negativo		Positivo		TOTAL	
	Absoluto	%	Absoluto	%	Absoluto	%
00 - 09	0	0,0	0	0,0	0	0,0*
10 - 19	1	50,0	1	50,0	2	2,0*
20 - 29	0	0,0	1	100,0	1	1,0*
30 - 39	10	55,6	8	44,4	18	17,8*
40 - 49	6	18,8	26	81,2	32	31,7*
50 - 59	8	50,0	8	50,0	16	15,8*
≥ 60	11	34,4	21	65,6	32	31,7*
TOTAL	36	35,6*	65	64,4*	101	100,0

* Percentagem calculada em cima dos 101 realizados.

GRÁFICO 4

ÍNDICE DE POSITIVIDADE PARA "T. cruzi" POR TÉCNICA UTILIZADA EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA

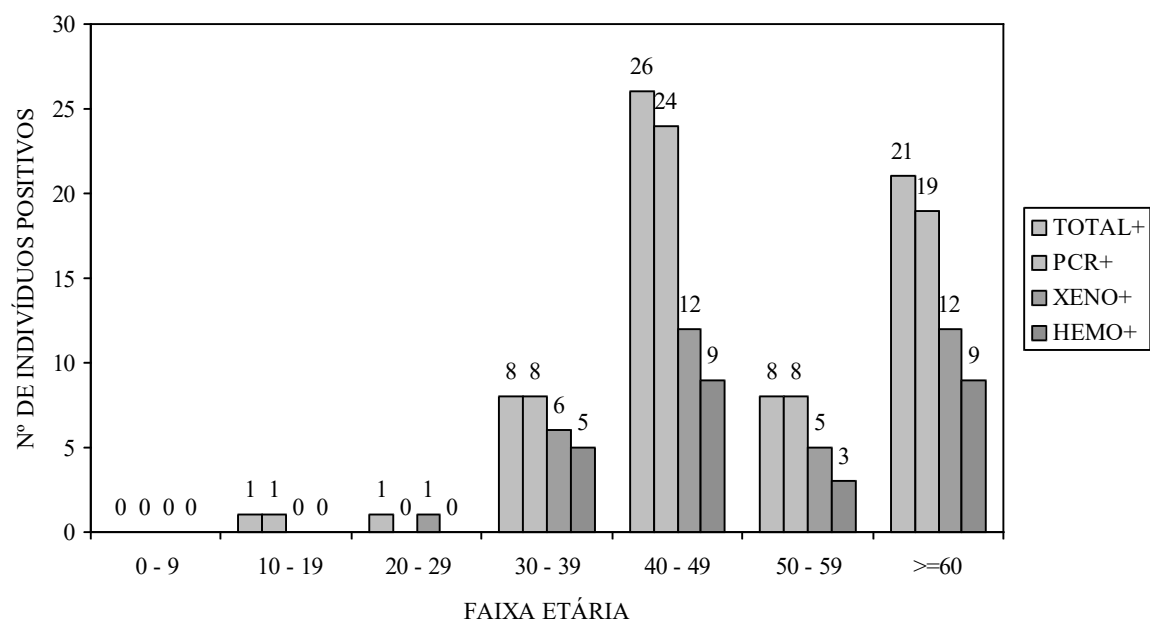


TABELA 12

DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS INVESTIGADOS, ACIMA DE 20 ANOS,
DE ACORDO COM O SEXO, A IDADE E O NÚMERO DE CASOS POSITIVOS
EMPREGANDO AS 3 TÉCNICAS DE DETECÇÃO DO *T. cruzi*

FAIXA ETÁRIA	SEXO					
	FEMININO			MASCULINO		
	INVESTIGADOS	POSITIVOS		INVESTIGADOS	POSITIVOS	
		ABSOLUTO	%		ABSOLUTO	%
20 - 49	25	14	56,0	27	21	77,8
≥ 50	22	12	54,6	26	17	65,4
TOTAL	47	26	55,3	53	38	71,7

TABELA 13

COMPARAÇÃO ENTRE OS DOIS TESTES PARASITOLÓGICOS
- XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA -
EMPREGADOS NA DETECÇÃO DO *T. cruzi* EM INDIVÍDUOS
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS

Hemocultura	Xenodiagnóstico					
	Positivo	%	Negativo	%	TOTAL	%
Positiva	20	19,8	6	5,9	26	25,7
Negativa	16	15,8	59	58,4	75	74,2
TOTAL	36	35,6	65	64,3	101	100,0

GRÁFICO 5

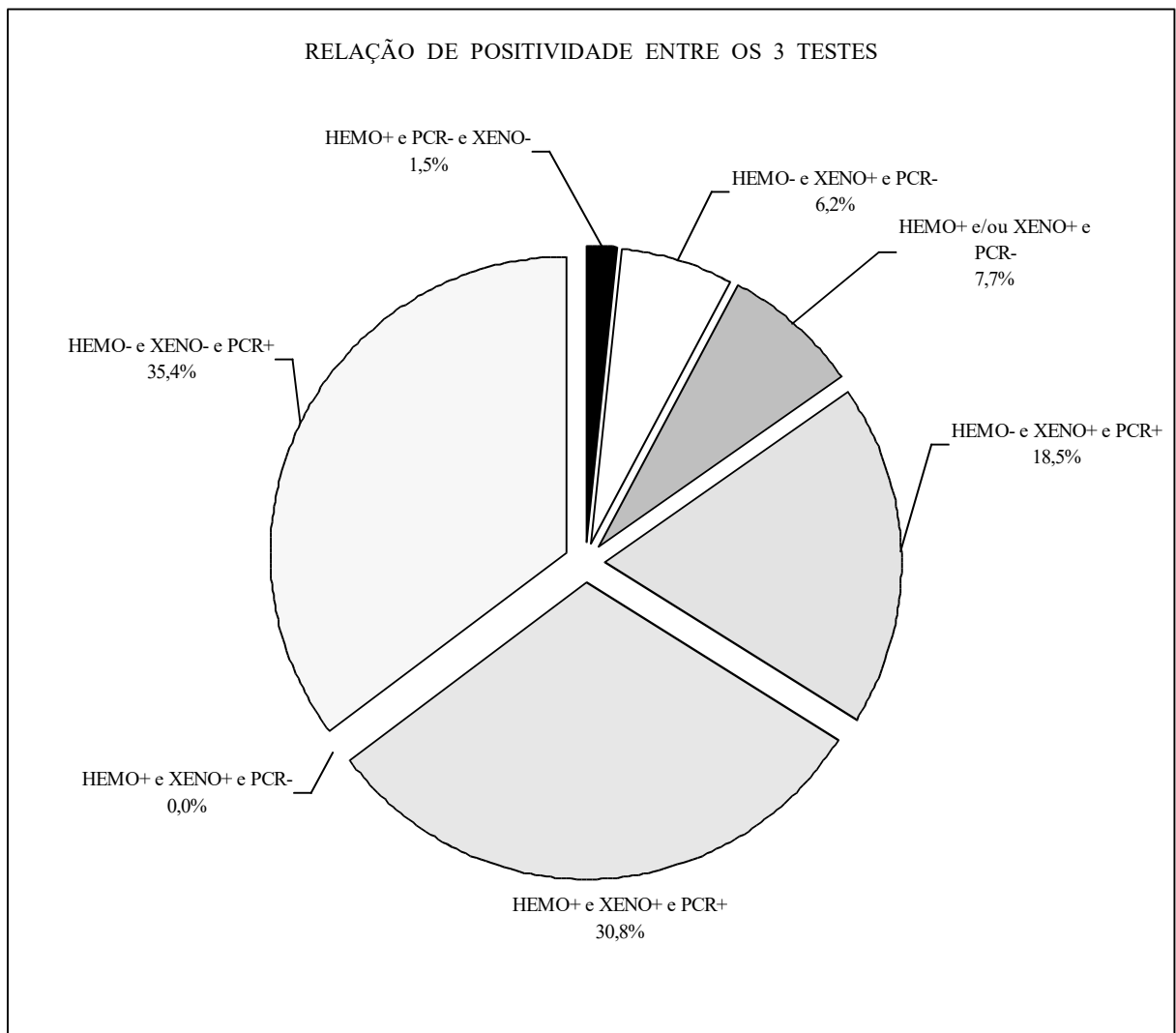


TABELA 14

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES PCR E XENODIAGNÓSTICO
EMPREGADOS NA DETECÇÃO DO *T. cruzi* EM INDIVÍDUOS
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS

Xenodiagnóstico	PCR					
	Positiva	%	Negativa	%	TOTAL	%
Positivo	32	31,7	4	4,0	36	35,7
Negativo	28	27,7	37	36,6	65	64,3
TOTAL	60	59,4	41	40,6	101	100,0

TABELA 15

COMPARAÇÃO ENTRE OS TESTES PCR E HEMOCULTURA
EMPREGADOS NA DETECÇÃO DO *T. cruzi* EM INDIVÍDUOS
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS

Hemocultura	PCR					
	Positiva	%	Negativa	%	TOTAL	%
Positiva	25	24,8	1	1,0	26	25,8
Negativa	35	34,6	40	39,6	75	74,2
TOTAL	60	59,4	41	40,6	101	100,0

TABELA 16

COMPARAÇÃO ENTRE PCR E OS DOIS TESTES PARASITOLÓGICOS
EMPREGADOS - XENODIAGNÓSTICO E/OU HEMOCULTURA - NA
DETECÇÃO DO *T. cruzi* EM INDIVÍDUOS
SOROLOGICAMENTE POSITIVOS

Xenodiagnóstico e/ou Hemocultura	PCR					
	Positivas	%	Negativas	%	TOTAL	%
Positivos	37	36,6	5	5,0	42	41,6
Negativos	23	22,8	36	35,6	59	58,4
TOTAL	60	59,4	41	40,6	101	100,0

TABELA 17

RELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DA PCR
E O NÚMERO DE NINFAS POSITIVAS

Xenodiagnóstico	PCR		
	Positivas	Negativas	TOTAL
1 Ninfa	14	3	17
2 a 10 Ninfas	16	1	17
11 a 40 Ninfas	2	0	2
TOTAL	32	4	36

TABELA 18

RELAÇÃO ENTRE O RESULTADO DA PCR E O NÚMERO
DE TUBOS DE HEMOCULTURAS POSITIVOS

Hemocultura	PCR		
	Positivas	Negativas	TOTAL
1 Tubo	16	1	17
2 a 3 Tubos	7	0	7
4 a 5 Tubos	2	0	2
TOTAL	25	1	26

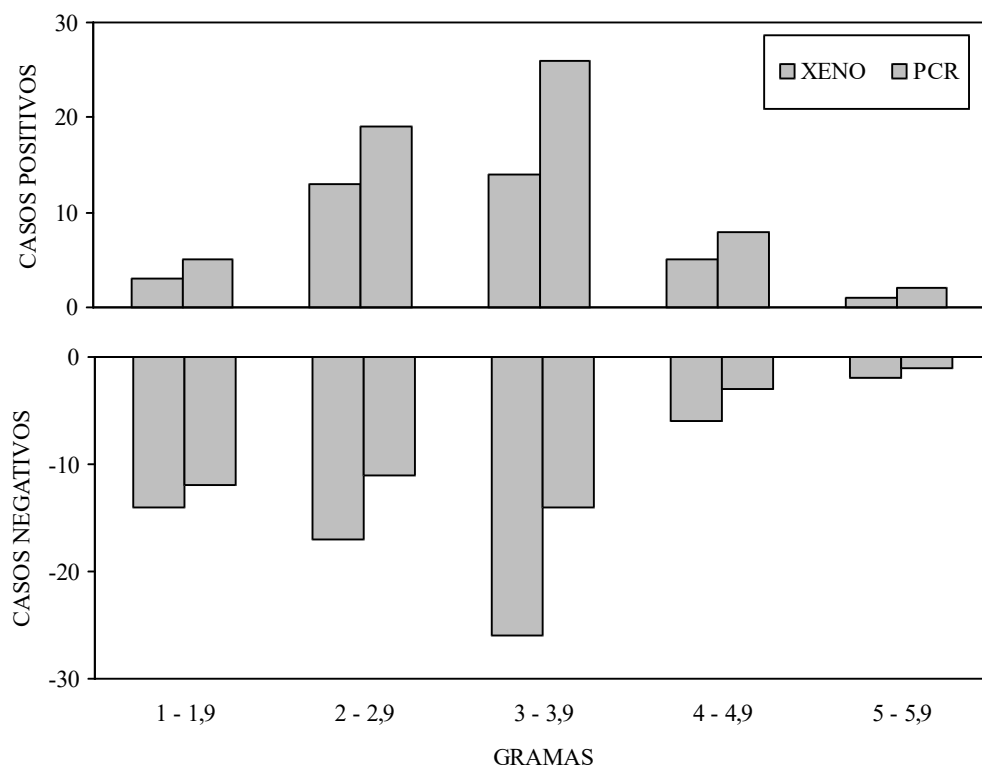
TABELA 19

COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DO TESTE DE PCR
E XENODIAGNÓSTICO E SUA RELAÇÃO COM A QUANTIDADE
DE SANGUE INGERIDO PELO *POOL* DE NINFAS ALIMENTADAS
EM CADA XENODIAGNÓSTICO

Quantidade de Sangue Ingerido (gramas)	Xenodiagnóstico (+)		Xenodiagnóstico (-)		TOTAL
	PCR (-)	PCR (+)	PCR (-)	PCR (+)	
0 - 0,9	0	0	0	0	0
1 - 1,9	1	2	11	3	17
2 - 2,9	1	12	10	7	30
3 - 3,9	1	13	13	13	40
4 - 4,9	1	4	2	4	11
5 - 5,9	0	1	1	1	3
6 - 6,9	0	0	0	0	0
TOTAL	4	32	37	28	101

GRÁFICO 6

DISTRIBUIÇÃO POR FREQUÊNCIA DA QUANTIDADE DE SANGUE INGERIDA EM
RELAÇÃO AO RESULTADO DOS EXAMES DE XENO E DA PCR



5.7. FIGURAS

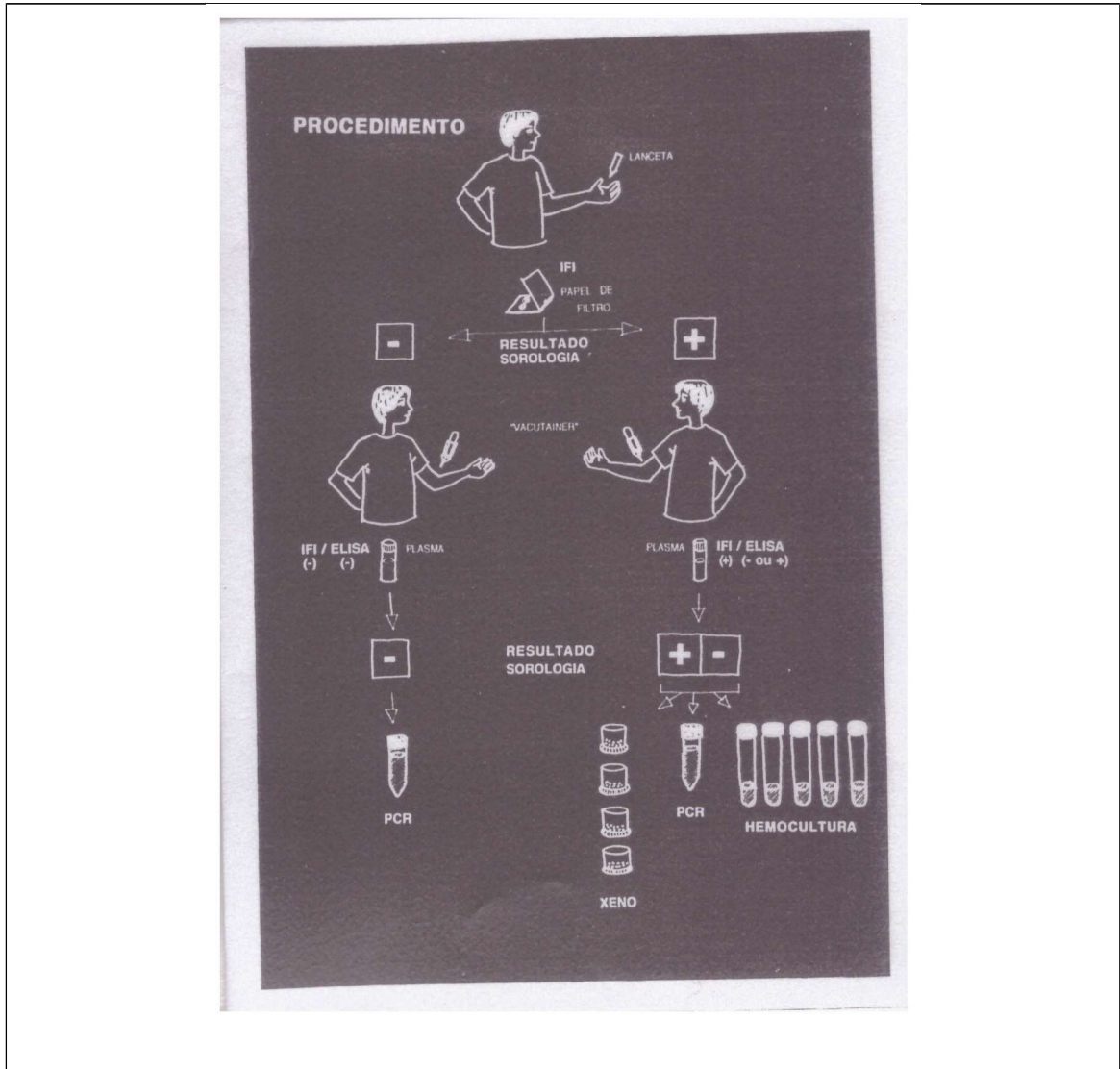


FIGURA 1 - Esquema resumido do procedimento metodológico adotado para o estudo comparativo entre o xenodiagnóstico, a hemocultura e a PCR na detecção do *T. cruzi*.

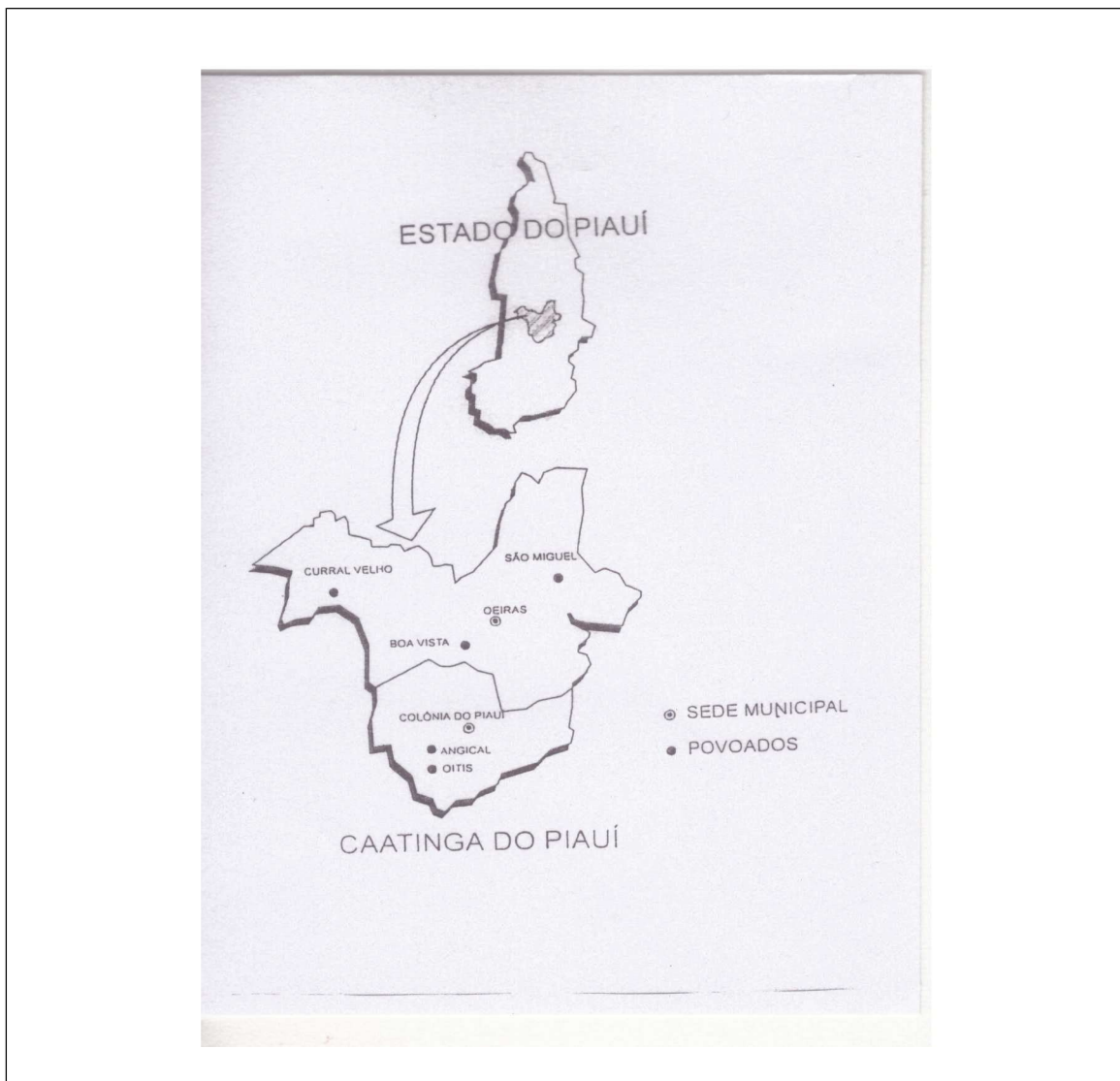


FIGURA 2 - Mapa do Estado do Piauí (Brasil) com a localização de procedência dos indivíduos investigados



FIGURA 3 - Visitação das casas para coleta de sangue em papel de filtro dos indivíduos residentes e, complementarmente, levantamento triatomínico.

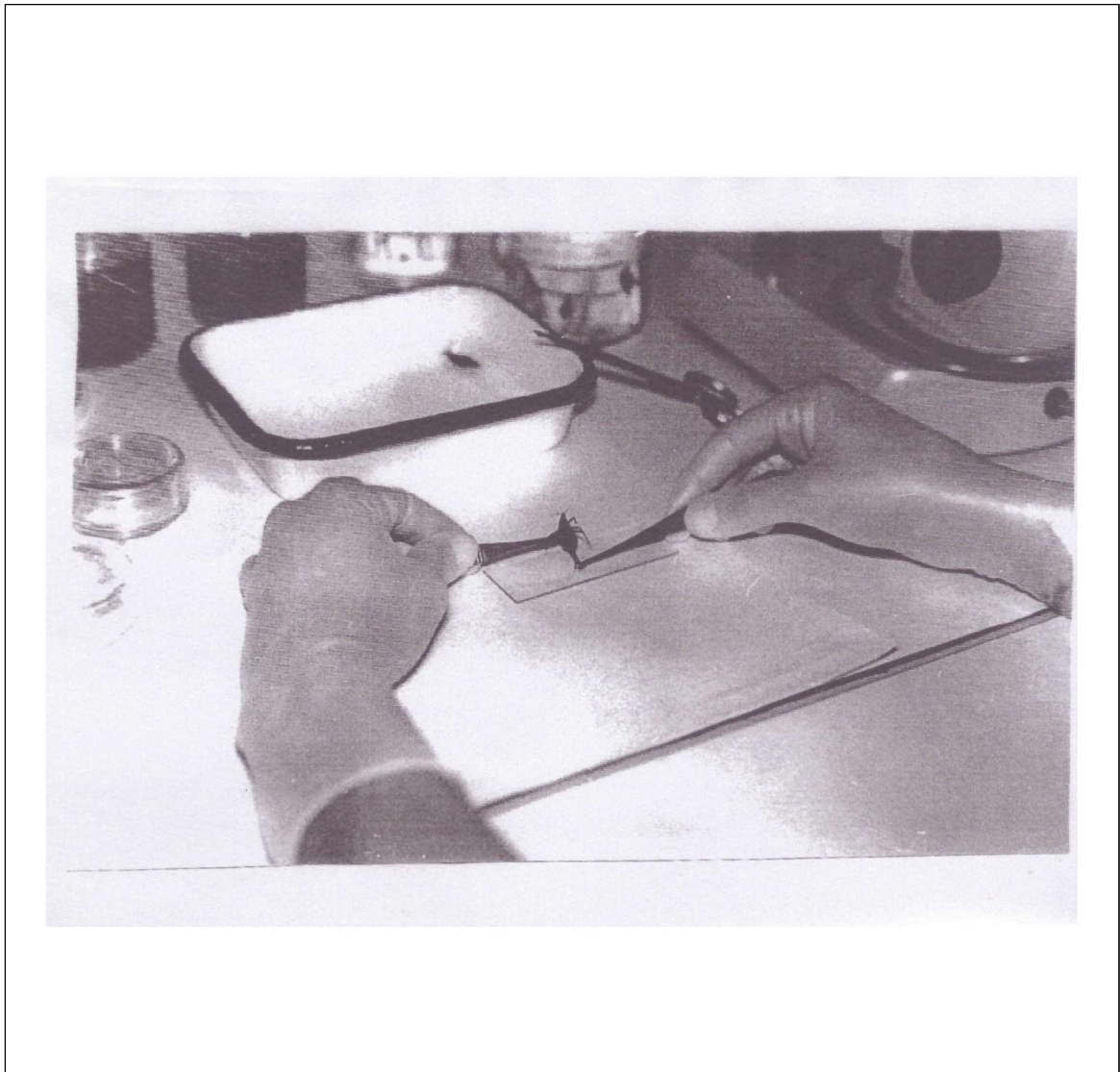


FIGURA 4 - Exame individual pela técnica de disseção de um triatomíneo.

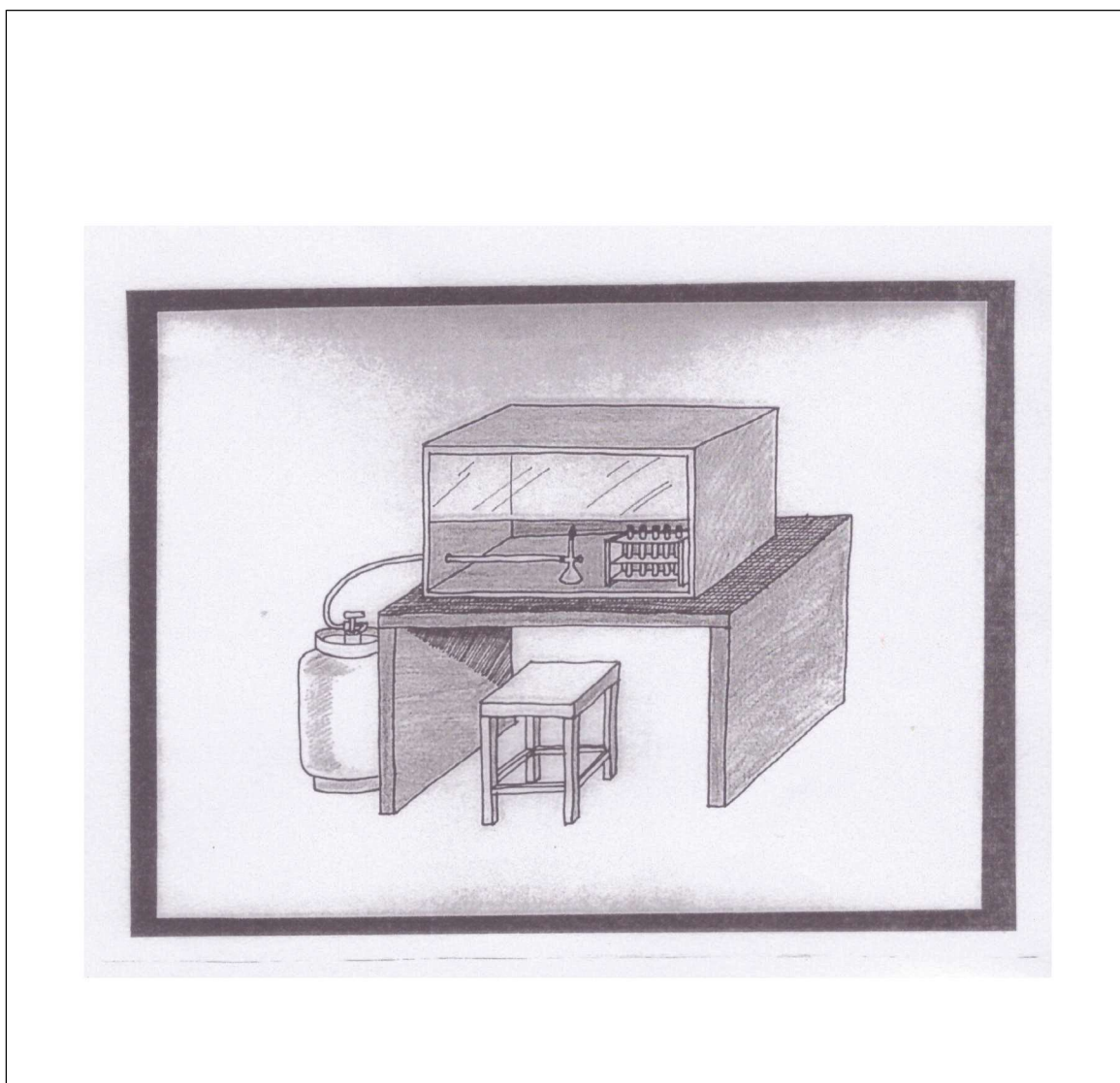


FIGURA 5 - Caixa de madeira, tipo capela, dentro da qual foi processado o sangue semeado em meio LIT.

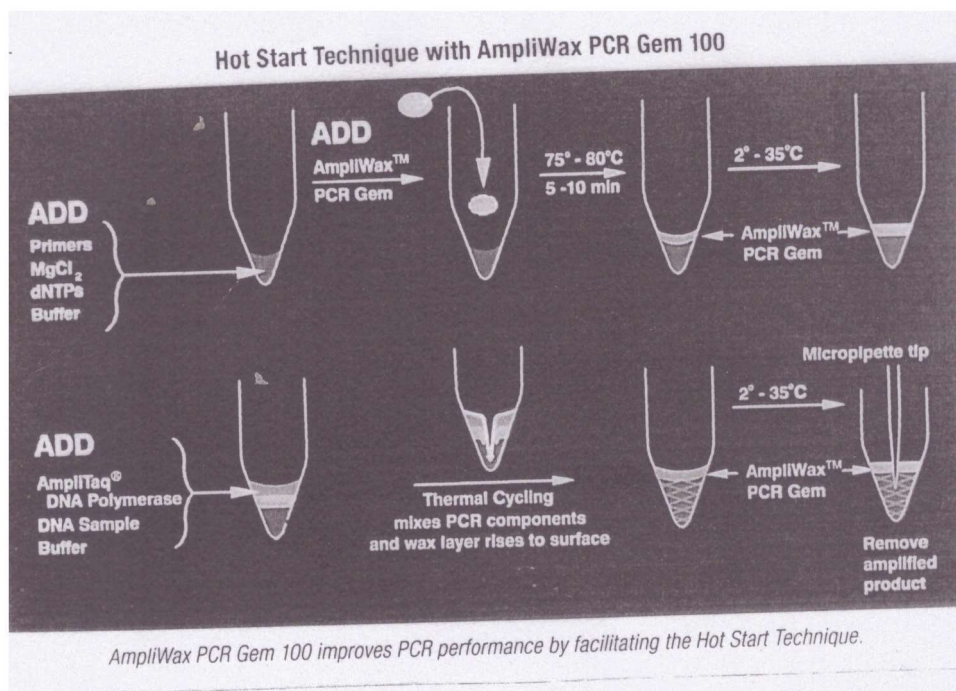


FIGURA 6 - Esquema da técnica de Hot Start de amplificação.

FONTE - Retirado da Perkin Elmer Biotechnology Catalog, 1993.

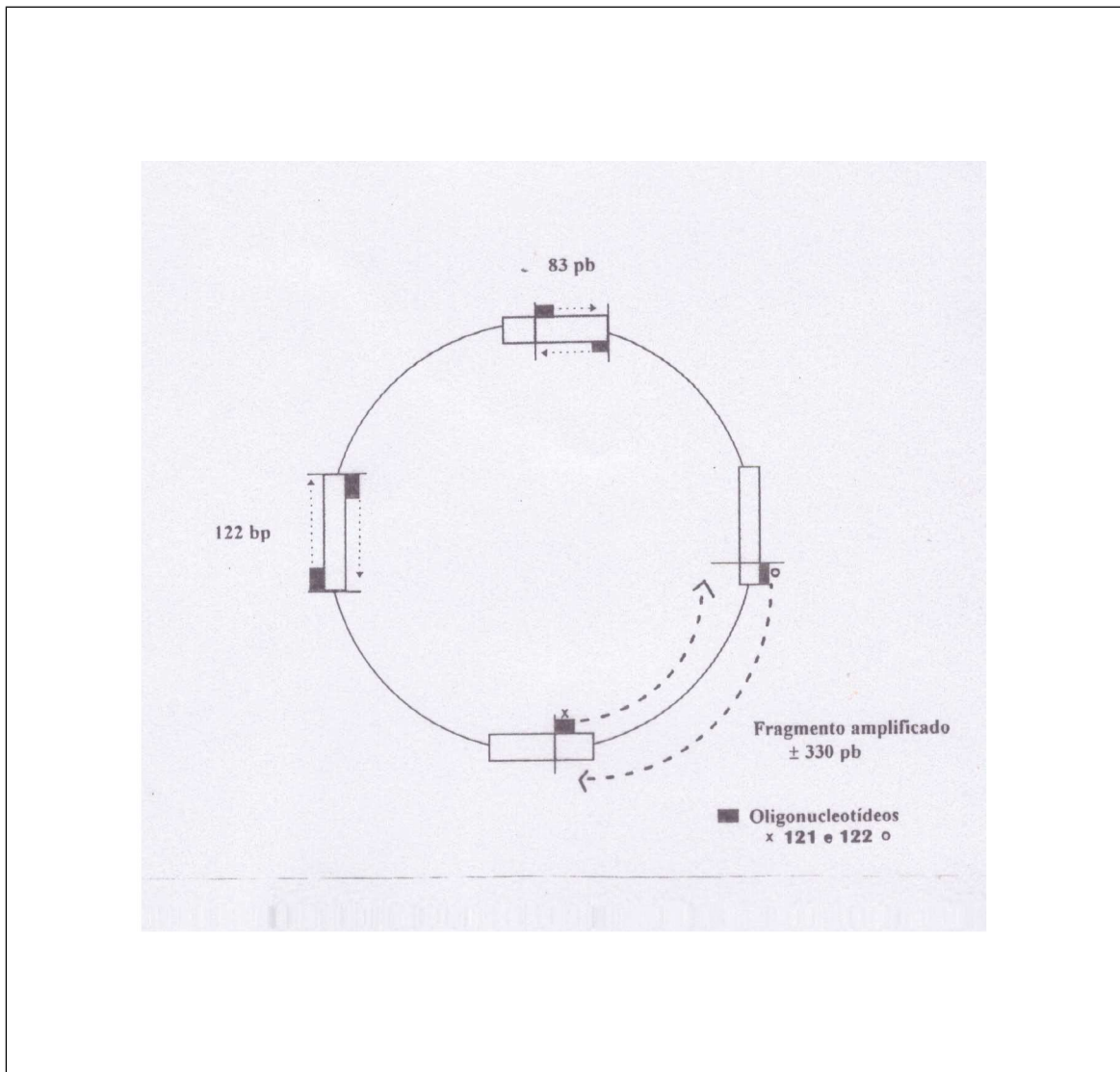


FIGURA 7 - Representação esquemática do minicírculo de *T. cruzi*, mostrando a disposição simétrica das quatro regiões constantes (retângulos sombreados) e as duplas de oligonucleotídeos iniciadores específicos para PCR. Estratégia da PCR, empregada por nós, para amplificação do fragmento 330 pb das regiões variáveis.

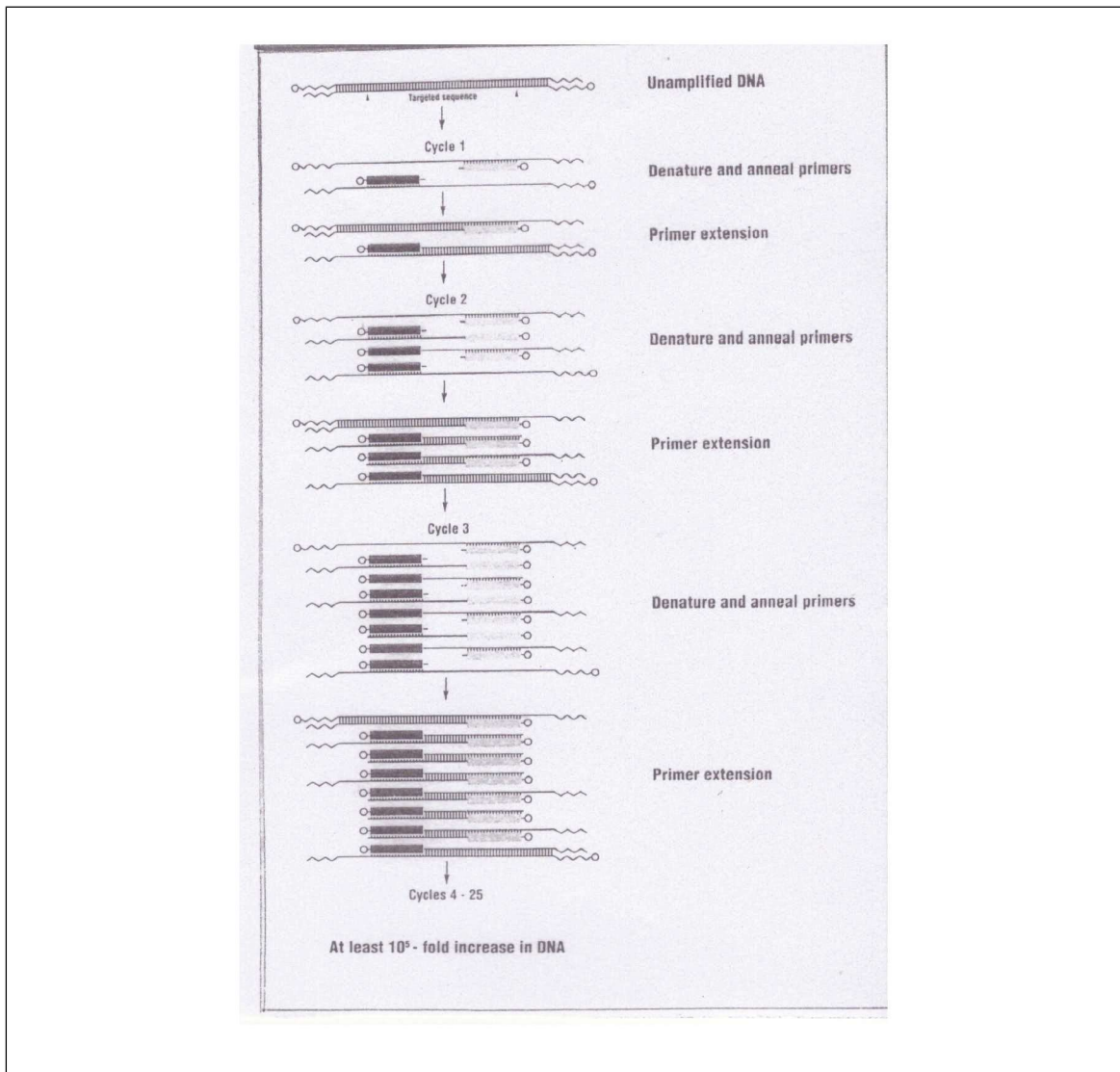


FIGURA 8 - Etapas de amplificação de uma fita dupla de DNA durante os ciclos térmicos promovidos in vitro através de um aparelho termociclo regulador.

FONTE - Retirado do catálogo da Perkin Elmer n° L-1354B - julho, 1991.

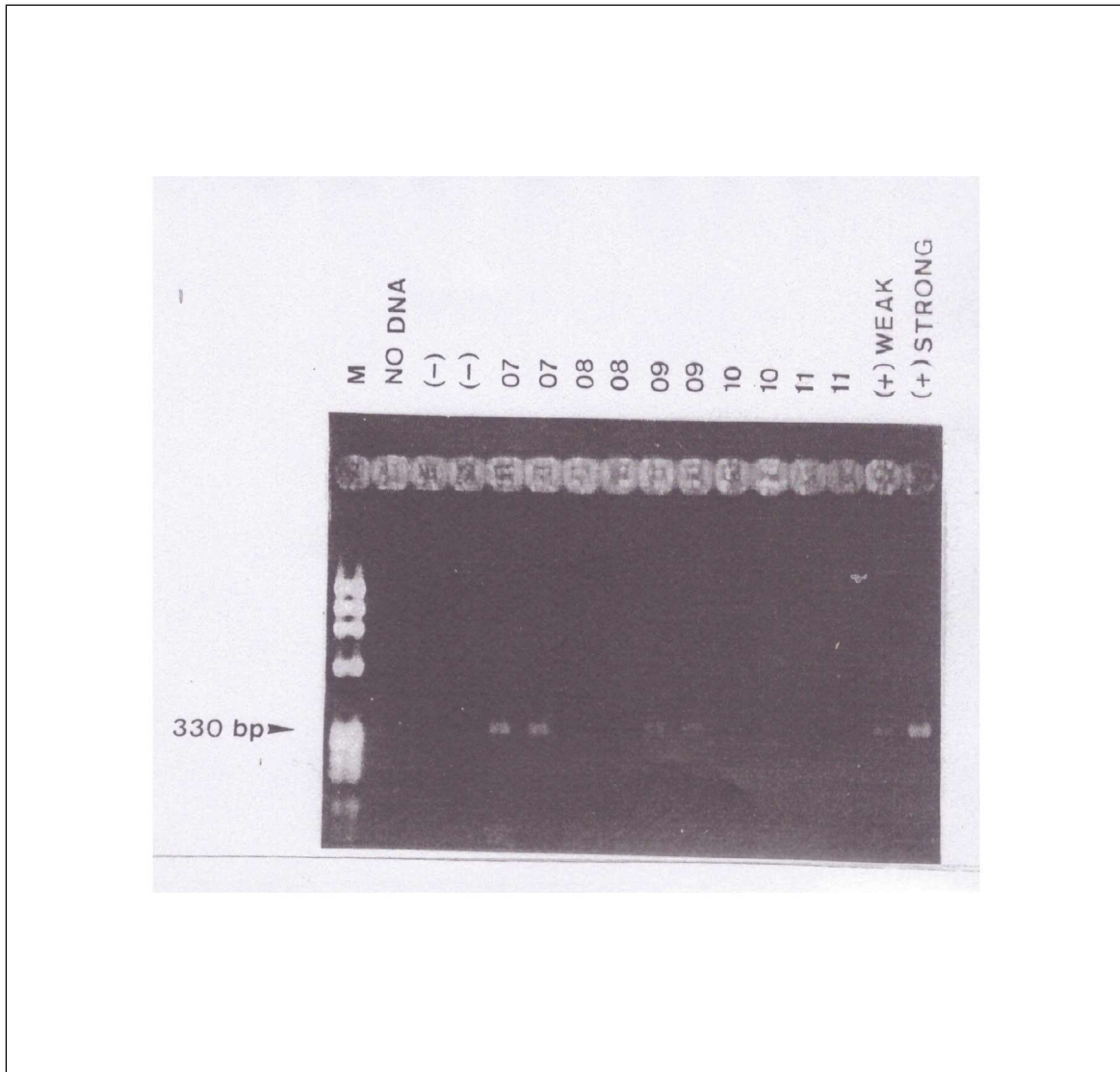


FIGURA 9 - O resultado padrão em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo obtido após a amplificação do DNA extraído das amostras de sangue coletadas dos indivíduos de uma região do nordeste brasileiro com sorologia positiva para *T. cruzi*. Linha 1 - marcador de peso molecular FX 174 DNA digerido com Hae III (M); Linha 2 - controle dos reagentes (sem adição de DNA - NO DNA); Linhas 3 e 4 - controle negativo, amostra de sangue de um indivíduo não infectado (-); Linhas 5 a 14 - 5 indivíduos da área endêmica com sorologia positiva (07 a 11); Linhas 15 e 16 - controles positivos, duas amostras de sangue com DNA de *T. cruzi* provenientes de indivíduos infectados com baixa e alta parasitemia ((+) weak e (+) strong). A banda de 330 pb presente é o sinal representativo da amplificação da seqüência específica do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*.

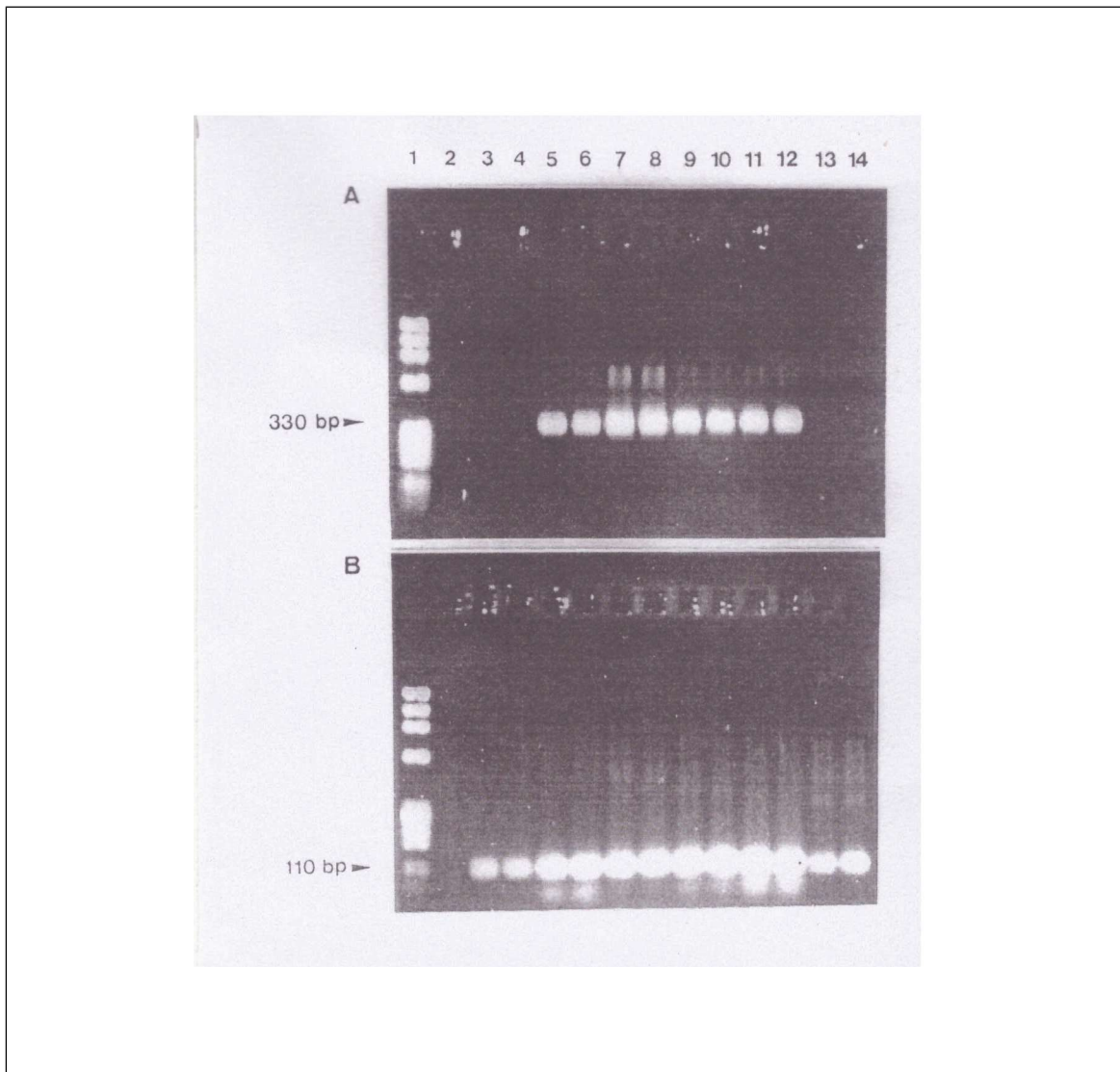


FIGURA 10A - Resultado em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo da amplificação da seqüência específica do kDNA extraído de 4 amostras de *T. cruzi* isoladas dos indivíduos que tiveram PCR negativa porém xenodiagnóstico positivo. Linha 1 - marcador de peso molecular; Linha 2 - controle dos reagentes (sem adição de DNA); Linhas 3 e 4 - DNA extraído de uma amostra de sangue de indivíduo não infectado com *T. cruzi*; Linhas 5 e 6 a 11 e 12 - DNA extraído em duplicata dos parasitas isolados por xenodiagnóstico; Linhas 13 e 14 - sem adição de material. O produto amplificado apresenta 330 pb.

B - Resultado em gel de agarose corado pelo brometo de etídeo da amplificação da seqüência do DNA da β -globina isolada das 5 amostras de sangue lisados provenientes dos 5 pacientes chagásicos crônicos que tiveram PCR negativa, porém exame parasitológico positivo. Linha 1 - marcador de peso molecular; Linha 2 - controle dos reagentes (sem adição de DNA); Linha 3 e 4 - DNA extraído de uma amostra de sangue de indivíduo não infectado com *T. cruzi*; Linhas 5 e 6 a 13 e 14 - produto da amplificação do DNA da β -globina humana extraído em duplicata da amostra de sangue de 5 indivíduos que apresentaram PCR negativa para *T. cruzi*. O produto amplificado apresenta 110 pb.

6. DISCUSSÃO

As reações sorológicas têm-se mostrado a base do diagnóstico da infecção chagásica na fase crônica, tornando-se procedimentos de escolha nos levantamentos epidemiológicos e nas triagens de doadores nos bancos de sangue; exercendo o papel do método que antecede o diagnóstico parasitológico devido a sua alta sensibilidade e automatização. No que se refere à automatização, ela possibilitou que vários testes possam ser efetuados em um curto período de tempo. Sendo assim nós empregamos as reações de IFI e de ELISA na fase que antecedeu ao estudo dos três métodos de detecção do parasita.

A análise do inquérito sorológico realizada em papel de filtro e que permitiu a seleção inicial dos indivíduos que compuseram o nosso grupo de estudo demonstrou que das 4.212 amostras de sangue coletadas em papel de filtro, 252 (5,98%) foram reagentes, o que representou um índice mais baixo que o relatado por CORREIA-LIMA (1976) que, em 1.353 indivíduos residentes no povoado de Colônia e Oitis, triados pelo mesmo procedimento técnico, encontrou 164 (12,1%) casos positivos. Ainda no mesmo levantamento, o referido autor verificou um predomínio de casos positivos procedentes do povoado de Oitis, cuja prevalência foi de 18,6%, também uma das mais altas encontrada por nós (10,19%) em relação aos outros povoados investigados (COURA *et alii*, 1996). Na época desse primeiro estudo (1976), Colônia e Oitis faziam parte do município de Oeiras e eram consideradas áreas de transmissão ativa, por apresentarem triatomíneos domiciliados infectados com *T. cruzi* e crianças menores de 9 anos com sorologia positiva para a infecção chagásica. Recentemente, ambos os povoados foram desmembrados do município de Oeiras para formar um novo município denominado Colônia do Piauí (COURA *et alii*, 1996). Assim como CORREIA-LIMA (1976), também comprovamos a presença de *T. cruzi* em triatomíneos capturados no domicílio e peridomicílio; porém, das crianças investigadas de 0 a 9 anos, apenas 5 tiveram a reação de IFI positiva em papel de filtro (dados não publicados), sendo que em somente uma delas confirmou-se a positividade pelas reações de IFI e de ELISA praticadas com o plasma. Esta taxa, praticamente zero, de prevalência na faixa de 0 a 9 anos foi um indicativo de que a transmissão estivesse interrompida nos povoados investigados, apesar da presença de exemplares de triatomíneos positivos. Em um outro inquérito efetuado por FIGUÊREDO-SILVA *et alii* (1991), em 265 indivíduos residentes na região de Oitis, empregando as reações de IFI, ELISA e ELISA de competição (*competitive* ELISA = C-ELISA), comprovou os seguintes índices de positividade, respectivamente: 14,3%; 14,7% e 13,2%, conforme a técnica sorológica testada. Estes percentuais foram superiores aos que encontramos no mesmo

povoado, aproximadamente 3 anos depois, denotando um decréscimo da prevalência na região e/ou diferenças de amostras e sensibilidade das técnicas sorológicas usadas.

Os índices de concordância entre a IFI realizada com o sangue coletado em papel de filtro e as reações confirmatórias de IFI e ELISA praticadas com o plasma de 109 indivíduos positivos no eluato, foram respectivamente, 94,49% e 90,82% e revelaram que a triagem em papel de filtro foi menos específica. O mesmo foi observado por CORREIA-LIMA (1976), que encontrou um índice de 96,3% de concordância de casos positivos entre a IFI com papel de filtro e a fixação do complemento (FC) empregando soro. A presença de casos falso positivos, decorrentes de problemas na especificidade da reação de IFI foi demonstrada em outros estudos, como de PETANA (1976), que encontrou resultado não reagente em amostras de soro provenientes de pacientes que apresentaram-se positivos na triagem sorológica através da IFI realizada com sangue coletado em papel de filtro. O mesmo autor verificou casos negativos na IFI em papel de filtro cuja sorologia praticada com o soro não confirmou, conforme ocorreu em 1 dos 21 pacientes que separamos para grupo controle, cuja negatividade na triagem não foi confirmada pelos testes de ELISA e de IFI.. Também PEREIRA (1983), ao submeter 296 indivíduos positivos pela técnica de IFI realizada com o eluato obtido do sangue coletado em papel de filtro, a uma série de 3 reações sorológicas, conseguiu um índice de 92,2% de concordância.

Quanto à diferença de sensibilidade entre as reações sorológicas de IFI e de ELISA concomitantemente realizadas com o soro, poderia atribuir-se ao emprego, na reação de ELISA, de antígenos solúveis purificados, que permitem a detecção de Acs específicos para *T.cruzi*, diferente da reação de IFI, em que se utiliza o parasita íntegro, o que favorece ligação de Acs a antígenos de superfície muitas vezes comuns a outros parasitas. FERREIRA *et alii* (1991), em seu trabalho sobre o emprego de um teste imunoenzimático, relatou que ao se reduzir o número de antígenos utilizados no teste de ELISA com a conseqüente redução de epítomos reagentes, poderia evitar-se a reação cruzada, promovida pela ligação de Acs inespecíficos presentes no sangue a componente antigênicos do *T.cruzi*. Segundo os mesmos autores, isso seria alcançado utilizando-se no teste de ELISA frações imunoquímicas purificadas, porém poderia observar-se uma queda na sensibilidade do teste.

Esta pequena discrepância entre os resultados obtidos com os três procedimentos sorológicos ,em que se fez uso nesta tese,reforça a importância de se empregar mais de uma técnica para a detecção de Acs anti-*T.cruzi* (CNPq, 1974)

O xenodiagnóstico desde que foi idealizado por BRUMPT (1914) vem sendo o principal método de escolha para demonstração e isolamento do parasita em vários estudos básicos e aplicados realizados ao longo destes anos; ou simplesmente na confirmação do *T.cruzi* em pacientes suspeitos da infecção chagásica (CAMARGO & TAKEDA, 1979). A positividade do método entretanto é variável e está à mercê de vários fatores, tais como: a susceptibilidade das espécies vetoras às populações de *T.cruzi* existentes nos hospedeiros mamíferos, bem como da densidade parasitária no sangue circulante do hospedeiro e do procedimento técnico adotado. Com todas essas variáveis, a sensibilidade do método mostra-se oscilante, principalmente na fase crônica da infecção, havendo relatos de positividade que variam de 13% (PEREIRA & COURA, 1987) a 69,1% (SCHENONE *et alii*, 1968), sendo o último valor bem significativo, uma vez que, nessa fase, a parasitemia tende a ser residual, sendo difícil a detecção do parasita. Uma outra problemática do método de xenodiagnóstico é a dificuldade de se comparar os resultados em virtude de diferentes protocolos adotados, entretanto, após a publicação de SCHENONE *et alii* (1968) e CERISOLA *et alii* (1974), houve uma tendência à uniformização no número de ninfas e estádios empregados. Nos pacientes que submetemos ao xenodiagnóstico, a taxa de 36,0% de positividade encontrada foi mais alta do que as obtidas por PEREIRA & COURA (1987), CONTRERAS *et alii* (1988), WISNIVESKY-COLLI *et alii* (1989), que relataram valores de, respectivamente: 13% (empregando 66 ninfas); 31,8% (28 ninfas); 20,5% numa área e 21,4% em outra (20 ou 40 ninfas). BRONFEN & ALVARENGA (1991) acharam índices de 40,0% e 42,4%, aplicando respectivamente 90 e 120 ninfas em dois grupos distintos de pacientes, e valores inferiores a estes e ao nosso, quando reduziram o número de ninfas para 30 e 40. Percentuais iguais ao desta tese conferiram PEREIRA (1983) e PEREIRA *et alii* (1996), aplicando ambos 40 ninfas. Resultados globais mais altos que 36,0% foram descritos por SCHENONE *et alii* (1968), LIMA *et alii* (1970), CERISOLA *et alii* (1974), CUBA-CUBA *et alii* (1978), MARSDEN *et alii* (1979), SCHENONE *et alii* (1991), MAIFRINO *et alii* (1994), que conseguiram respectivamente: 69,1% (42 ninfas); 56% (88 ninfas); 58,7% (80 ninfas); 65,7% e 60,5% (10 ninfas de *D. maxima* e 40 ninfas de *T. infestans*); 44% (40 ninfas); 51,6% (42 ninfas) e 41,17% (80 ninfas).

Ao compararmos nossos percentuais globais de positividade do xenodiagnóstico com os obtidos por CORREIA-LIMA (1976), que também trabalhou na mesma área endêmica de Oeiras e Colônia, verificamos que nosso resultado divergiu significativamente do por ele obtido. CORREIA-LIMA (1976) comprovou uma positividade, através do xenodiagnóstico, de 19,1% em 115 indivíduos com sorologia positiva, valor

praticamente a metade do que detectamos. Segundo o citado autor, este baixo percentual de xenodiagnósticos positivos deveu-se ao fato de 86,8% dos exames terem sido praticados com ninfas de *R. prolixus* e apenas 13,2% com ninfas de *T. infestans* e *T. brasiliensis*. Um dado interessante é que a positividade do *T. brasiliensis* mostrou-se superior em relação as outras duas espécies; entretanto o número de xenodiagnósticos realizados com essa espécie foi tão pequeno que fica difícil tirar alguma conclusão de que tal resultado foi consequência do *T. brasiliensis* ser a espécie vetora local. Nós acreditamos também que CORREIA-LIMA (1976) teria achado um melhor resultado se, além do exame das dejeções das ninfas, ele tivesse praticado o exame de todo o conteúdo do tubo digestivo. BENTO (1978) relatou uma taxa de 94,4% de positividade global em 18 pacientes procedentes de Oitis, uma das localidades que estudamos. Este alto percentual de detecção deveu-se, em parte, ao fato de que em 10 dos pacientes selecionados para o estudo o *T. cruzi* havia sido comprovado previamente; as outras explicações seriam a repetição do xenodiagnóstico por 5 a 6 vezes e a aplicação em dobro do número de ninfas normalmente usadas nos protocolos habituais: 40 ninfas de *T. infestans* e 40 ninfas de *T. brasiliensis*, o que possibilitou maior chance em detectar o *T. cruzi*.

A diferença de susceptibilidade entre as espécies de triatomíneos frente a isolados de populações de *T. cruzi* existentes na natureza torna esta característica o principal critério a ser ponderado na escolha da espécie vetora para xenodiagnóstico. Partindo disto, planejamos compor o protocolo de xenodiagnóstico com duas espécies: *P. megistus* e *T. infestans*. Inicialmente pensamos em parear *P. megistus*, que vinha apresentando resultado expressivo de sensibilidade (JUNQUEIRA *et alii*, 1989a, b) com a espécie vetora local da área de origem dos pacientes, no caso *T. brasiliensis*. Contudo não dispúnhamos, na nossa colônia, da quantidade de ninfas de *T. brasiliensis* necessária para a realização de todos os exames. Resolvemos então optar pelo *T. infestans* que, além de ser uma espécie muito empregada na rotina do xenodiagnóstico, tínhamos em grande número na criação. Através da aplicação simultânea de *P. megistus* e *T. infestans*, pudemos comprovar que a primeira espécie foi capaz de detectar *T. cruzi* em um número maior de indivíduos do que a segunda, respectivamente 24 e 17 indivíduos dos 77 submetidos ao xenodiagnóstico pareado, bem como de apresentar mais ninfas positivas (4,1%) do que o *T. infestans* (3,0%). Estes dados apontam o *P. megistus* como a espécie mais suscetível à população de *T. cruzi* circulante nos indivíduos investigados do que o *T. infestans*, reforçando, com isso, a indicação de PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MULLER (1982, 1987) e PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ *et alii* (1988, 1990) que destacaram o *P. megistus* como um dos triatomíneos mais sensíveis e promissores no método do xenodiagnóstico.

Não podemos atribuir a melhor performance do *P. megistus* ao fato da regionalidade da espécie, uma vez que tanto ele como o *T. infestans* não foram descritos na região de origem dos indivíduos submetidos ao estudo, havendo apenas registro da presença de *T. brasiliensis* e *T. pseudomaculata* nos povoados estudados (COURA *et alii*, 1996). Uma hipótese seria a de PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ & MULLER (1982, 1987) e PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ *et alii* (1988, 1990) que imputam ao perfil biótico do *P. megistus* silvestre a sua melhor performance, como também a de outras espécies consideradas silvestres. No entanto, nos questionamos: até que ponto os exemplares destas duas espécies empregadas nestes xenodiagnósticos ainda preservam as mesmas características bióticas dos exemplares que serviram de matrizes e deram origem à criação em laboratório? A colônia de onde retiraram-se as ninfas tanto de *P. megistus* como as de *T. infestans* iniciou-se no Departamento de Medicina Tropical há 7 anos. Durante este tempo, provavelmente, ocorreu um processo de adaptação ou seleção dos exemplares, induzido pelas condições tanto físicas do laboratório de criação quanto as biológicas oferecidas, tais como: confinamento em frascos de vidro; variações de temperatura e umidade na sala de acondicionamento; repasto sangüíneo em uma mesma fonte alimentar (galinha); acasalamento entre indivíduos da mesma linhagem. Segundo PHILLIPS & BERTRAM (1967), o menor ou maior grau de susceptibilidade demonstrado entre as espécies vetoras seria resultante de um controle genético. Esta conclusão foi retirada ao comprovarem que uma linhagem de triatomíneos, descendentes de um grupo de *R. prolixus* que não permaneceu infectado após sugar animais com *T. cruzi*, teve uma taxa mais baixa de infecção do que exemplares descendentes de uma população total não diferenciada da mesma espécie quando submetidos à mesma alimentação infectante. Nesta mesma linha de investigação, MAUDLIN (1976) trabalhou no sentido de encontrar linhagens de *R. prolixus* refratárias ou suscetíveis; porém o máximo que conseguiu estabelecer foi um grau diferente de susceptibilidade ligada ao sexo, uma vez que os machos se infectaram mais que as fêmeas. Diferindo de MILES *et alii* (1975), que não encontraram esta diferença entre os sexos. O único questionamento que fazemos em relação ao trabalho de PHILLIPS & BERTRAM (1967) e MAUDLIN (1976) é que ambos usaram como parâmetro o número de parasitas existentes no conteúdo das dejeções para estabelecer presença e densidade parasitária nos exemplares, o que pode ter levado a um falso resultado, uma vez que o número de *T. cruzi* nas dejeções nem sempre reflete o existente no conteúdo intestinal. Outros fatores parecem interferir nesta susceptibilidade. DIAS (1933), por exemplo, em sua tese de doutorado, relata: "*nos exemplares em que a hemólise é mais rápida a degeneração e lise dos tripanosomas é mais geral ... No T. megista (P. megistus), os fenômenos paralelos de hemólise e triponólise*

parecem ser muito influenciáveis pelo desenvolvimento da flora microbiana no conteúdo sangüíneo do estômago; de fato, nos caso em que estes fenômenos são precoces e intensos, a ponto de serem dificilmente encontráveis os tripanosomas ingeridos, às vezes em grande número e que foram destruídos em massa, observa-se quase sempre enormes quantidade de cocus e bacilos na massa em digestão, os quais provavelmente por meio de fermentos resultantes de seu metabolismo exerceram sua ação lítica". Este estudo, apesar de não ser recente, pareceu-nos ainda uma fonte inexorável de pesquisa, como também outras correntes de investigação com a perspectiva de esclarecer qual ou quais os fatores intrínsecos ao vetor, ou ligado a ele, que atuariam no desenvolvimento do parasita.

A melhor performance do *P. megistus* confirmou-se em outras publicações, tais como: a de SALGADO (1969) que, realizando xenodiagnóstico com *P. megistus* e *T. infestans* em pacientes crônicos, conseguiu, através do *P. megistus*, confirmar cerca de 10% de indivíduos positivos a mais do que os detectados por *T. infestans*. A mesma superioridade do *P. megistus* foi mostrada por MINTER *et alii* (1978), em comparação ao *T. infestans* e *R. prolixus*, na detecção do parasita em um grupo de 29 pacientes e de 6 gambás naturalmente infectados, a qual atribuiu-se ao fato de os hospedeiros serem procedentes de uma área endêmica no Estado da Bahia onde o *P. megistus* era o vetor local. Nessa investigação (MINTER *et alii*, 1978), o *P. megistus* somente foi menos efetivo do que o *T. infestans* nos xenodiagnósticos realizados no macaco Rhesus experimentalmente infectado. No entanto se especularmos o trabalho anterior do mesmo grupo de pesquisadores (MINTER *et alii*, 1977), onde quantificou-se o sangue ingerido pelas ninfas de primeiro estágio das espécies empregadas, pode-se comprovar que os exemplares de *T. infestans* ingeriram significativamente bem mais sangue do que as ninfas de *P. megistus* e *R. prolixus* quando as mesmas foram colocadas para sugar macaco Rhesus; não sendo esta diferença tão expressiva em relação a outros hospedeiros que serviram de fonte alimentar. Isto poderia explicar, em parte, a maior positividade das ninfas de *T. infestans* nos xenodiagnósticos praticados especificamente neste hospedeiro. Em dois estudos sobre o comportamento de determinadas espécies de triatomíneos frente ao *T. cruzi*, BRONFEN *et alii* (1984) e ALVARENGA & BRONFEN (1984) demonstraram, também, ser o *P. megistus* mais eficiente que o *T. infestans* nos parâmetros manutenção da infecção e número de exemplares positivos após alimentá-los em camundongos infectados experimentalmente com as cepas Y e Cl do *T. cruzi* na fase patente da parasitemia. Em uma publicação recente, PEREIRA *et alii* (1996), ao avaliarem 563 xenodiagnósticos praticados em pacientes de diversas regiões endêmicas no Brasil fazendo uso do mesmo protocolo de xenodiagnóstico adotado nesta tese, concluíram que o *P.*

megistus foi mais sensível na detecção do parasita do que o *T. infestans*, independentemente da área de origem, sexo e faixa etária dos indivíduos submetidos ao exame. Cada espécie, *P. megistus* e *T. infestans*, comprovou respectivamente 28,6% (161) e 21,3% (120) dos casos positivos; em relação ao número de ninfas positivas, o percentual por espécie foi de 4,9% para *P. megistus* e 3,0% para *T. infestans*, valores que confirmaram os nossos percentuais.

A menor susceptibilidade do *T. infestans* tem-se mostrado não apenas em relação ao *P. megistus*, mas também a outras espécies. Na investigação de ZELÉDON & VIETO (1957), das cinco espécies testadas em xenodiagnósticos praticados em cobaias infectadas experimentalmente, o *T. infestans* revelou-se um dos vetores menos capazes de detectar o parasita, ficando sua positividade abaixo das espécies *R. prolixus* e *R. pallenscens*. BENTO (1978), empregando o *T. infestans* e o *T. brasiliensis* no IV estágio ninfal em uma série de seis xenodiagnósticos realizados mensalmente em 18 chagásicos crônicos, comprovou através da primeira espécie 77,77% (14/18) dos pacientes com *T. cruzi* e da segunda, 94,4% (17/18). Apesar de a autora relatar que estes dados não foram diferentes sobre o ponto de vista estatístico, ao analisarmos 8 destes 18 pacientes cuja parasitemia havia sido negativa em xenodiagnósticos anteriores, verificamos que a diferença de positividade por espécie fica marcante. Do total de 46 pares de xenodiagnósticos aplicados, seis repetições para cada paciente (em apenas dois deles praticaram-se cinco repetições), foi possível comprovar parasita através do *T. infestans* em 13 xenodiagnósticos e do *T. brasiliensis* em 20, quase o dobro de diferença. Em um estudo comparativo entre *D. maxima* e *T. infestans*, BARRETO *et alii* (1978) demonstraram que ambas as espécies no IV e V estágio diagnosticaram o mesmo número de casos crônicos de Doença de Chagas em São Felipe; porém o *D. maxima* teve um número significativamente maior de exemplares positivos. De um total de 453 *D. maxima* aplicados, 52,3% (237) foram positivos, enquanto que de 473 *T. infestans*, 31,0% (147) apresentaram o parasita. Dando continuidade a investigação, CUBA *et alii* (1979), empregando 10 ninfas de *T. infestans* (III estágio) mais 10 de *D. maxima* (I e III estágios), conseguiram, através de cada uma delas, isolar *T. cruzi* em respectivamente: 18,9% e 22,1%, dos 190 pacientes sorologicamente positivos (pareando III com I estágio), e 18,8% e 48,0% em outros 175 casos (pareando III com III estágio) que compuseram o segundo grupo de pacientes. Além da menor eficiência em comprovar pacientes com parasita, o percentual de ninfas no III estágio de *T. infestans* que apresentou-se positivo foi inferior aos das ninfas de I e de III estágio de *D. maxima*, sendo de respectivamente 3,1%, 4,6% e 19,3%. No caso de *T. infestans* este percentual equiparou-se ao da nossa investigação.

Todavia existem relatos em que o *T. infestans* mostrou-se superior ou igual a outras espécies na susceptibilidade ao *T. cruzi*. No trabalho de CERISOLA *et alii* (1974), das sete espécies de triatomíneos de que se fez uso no xenodiagnóstico efetuado em três pacientes crônicos, o *T. infestans* foi o que apresentou maior número de caixas positivas. MILES *et alii* (1975), aplicando exemplares de *R. prolixus*, *T. infestans* e *P. megistus* sobre um macaco Rhesus na fase crônica da infecção, verificaram que o *T. infestans* apresentou um maior número de ninfas infectadas em relação ao *R. prolixus*; porém uma equiparação entre o *T. infestans* e o *P. megistus* neste mesmo critério. Esses autores relataram respectivamente para *R. prolixus*, *P. megistus* e *T. infestans* os seguintes valores: 56,8%, 75,8% e 76,7%. BRONFEN *et alii* (1989), ao utilizarem *P. megistus*, *T. infestans* e *D. maxima* em 59 xenodiagnósticos a que submeteram um grupo de pacientes chagásicos crônicos, não verificaram diferenças estatisticamente significativas no desempenho das 3 espécies em detectar o *T. cruzi*. Cada uma comprovou respectivamente 25,42% (15/59); 25,42% (15/59) e 22,03% (13/59) de pacientes positivos. Da mesma forma, na publicação seguinte, BRONFEN & ALVARENGA (1991), empregando as espécies: *P. megistus*, *T. infestans* e *R. neglectus* no xenodiagnóstico efetuado em 45 (denominado grupo I) dos 104 pacientes crônicos investigados, afirmaram não ter comprovado diferença estatisticamente significativa na capacidade dos 3 vetores em indicar caso positivo; mesmo obtendo 22,2% (10/45) de positividade com *P. megistus*; 26,7% (12/45) com *T. infestans* e apenas 11,1% (5/45) com *R. neglectus*. Nós acreditamos que esta semelhança entre as espécies vetoras nos percentuais globais de comprovação do parasita nesses dois grupos de pacientes pode ser explicada, em parte, pelo maior número de exemplares que os referidos autores fizeram uso em cada xenodiagnóstico, sendo de 120 ninfas em um grupo (BRONFEN *et alii*, 1989) e 90 ninfas no outro (BRONFEN & ALVARENGA, 1991), número mais alto do que o padrão utilizado na rotina do xenodiagnóstico, o que vem afirmar a nossa idéia de que a diferença global entre as espécies tende a tornar-se menor à medida que aumenta-se o número de ninfas em cada exame, ou quando os pacientes apresentam parasitemia não tão baixas. Em ambas as situações, haveria uma equiparação dos resultados entre as espécies, onde as diferenças intrínsecas só poderiam ser visualizadas medindo-se a densidade parasitária no tubo digestivo das ninfas e pelo número de ninfas infectadas. Um ponto abordado por BRONFEN & ALVARENGA (1991) na discussão e que não podemos deixar de mencionar é sobre a utilização de mais de uma espécie no xenodiagnóstico. Apesar de estatisticamente não ter sido demonstrada diferença na positividade, do xenodiagnóstico entre o grupo de 77 pacientes nos quais empregamos *T. infestans* e *P. megistus*, em relação aos 24 pacientes em que se fez uso de

apenas *P. megistus*, verificamos que no grupo em que houve associação das duas espécies, maior percentual de indivíduos foi comprovado com *T. cruzi*. A importância em se associar mais de uma espécie vetora no método do xenodiagnóstico já havia sido destacada por outros investigadores. SALGADO (1969) demonstrou, em 64 casos submetidos ao xenodiagnóstico, uma taxa de positividade de 23,4% para *T. infestans*, 32,8% para *P. megistus* e 37,5% com a associação das duas espécies. Também PIFANO *et alii* (1973) conseguiram uma positividade individual com *R. prolixus* e *T. pallidipennis* de, respectivamente, 26,48% e 35,15% dos indivíduos e com os dois vetores em 42,46%. Segundo BRONFEN & ALVARENGA (1991), se os xenodiagnósticos praticados em dois grupos de pacientes tivessem sido realizados só com *P. megistus*, 18 pacientes positivos seriam considerados negativos (8 do grupo I + 10 do grupo II); só com *T. infestans*, 16 (6 do grupo I + 10 do grupo II) e só com o *R. neglectus* ou *D. maxima*, 25 (13 do grupo I + 12 do grupo II). Na recente publicação de PEREIRA *et alii* (1996), entre 205 xenodiagnósticos positivos dos 563 aplicados, 85 (15,1%) foram devido às ninfas *P. megistus*, 44 (7,8%) às de *T. infestans* e 76 (13,5%) devido a ambas. Nós acreditamos que a comprovação da importância de associar-se espécies vetoras no xenodiagnóstico mereça investigações direcionadas especificamente neste sentido. Todos os dados comprovados com o *T. infestans*, nesta tese bem como em outras publicações, nos levam a uma visão crítica quando é sugerido o emprego do *T. infestans* nos xenodiagnósticos (SEGURA, 1987, CHIARI, 1992) e que, ao nosso ver, precisa ser revisto, uma vez que esta espécie tem mostrado pouca susceptibilidade a diferentes populações de *T. cruzi*. Provavelmente tal sugestão se deva ao seu importante papel vetorial em algumas partes da América Latina e sua fácil criação em laboratório, significando obter exemplares em grande escala.

Com relação aos números de ninfas que encontramos positivas, 4,1% para *P. megistus* e 3,0% para *T. infestans*, se os compararmos com os relatados por outros autores verificamos que nossos valores foram baixos, denotando um baixo número de parasitas circulantes nos indivíduos chagásicos da região de Oeiras e Colônia. Por exemplo, BRONFEN *et alii* (1989), em pacientes procedentes de Minas Gerais, comprovaram, respectivamente, uma percentagem de ninfas positivas de 16,7% (230/1380) para *P. megistus*, 12,0% (251/2090) para *T. infestans* e 16,4% (190/1160) para *D. maxima*, ressaltando que a pesquisa do parasita não foi individual e sim através do exame a fresco em *pool* de 10 tratos intestinais. Da mesma forma, no grupo I de outro trabalho (BRONFEN & ALVARENGA, 1991) em que se examinaram os exemplares individualmente, a taxa de detecção do *T. cruzi* por ninfas, segundo a espécie de triatomíneos, para *P. megistus*, *T. infestans* e *R. neglectus* correspondeu a

respectivamente: 10,1% (47/464), 8,6% (42/487), 3,3% (16/479). Nossas taxas globais de exemplares positivos foram também bem menores do que as relatadas por FREITAS (1952) e PIFANO (1954). O primeiro autor, em uma série de 251 xenodiagnósticos realizados em pacientes na fase crônica, constatou que 20,6% das 1025 ninfas que sugaram se infectaram. No entanto, ele observou que fazendo xenodiagnósticos em lotes grandes de exemplares, aplicando 60 insetos simultaneamente, apenas 1, 3, 4, no máximo 13 destes apresentaram parasita na leitura, o que de certa forma vem de encontro ao que encontramos, visto que, no máximo, 14 exemplares foram detectados com *T. cruzi* entre os 36 xenodiagnósticos positivos, sendo que na grande maioria deles encontrou-se 1 a 2 ninfas positivas (47,2% com uma, 19,4% com duas e 33,4% com três a quatorze ninfas positivas). Em uma outra investigação, PIFANO (1954) obteve 50% dos exemplares positivos, dos 1.236 exemplares de *R. prolixus* alimentados uma única vez em cada um dos 80 pacientes procedentes de uma área endêmica de doença de Chagas e de infecção por *T. rangeli* na Venezuela; o que aumentou para 73,5% no grupo de 1.120 que receberam duas alimentações no mesmo indivíduo suspeito. O autor explica que esta diferença deveu-se a maior chance que a segunda alimentação proporcionou às ninfas em "capturar" um parasita. Este elevado número de ninfas positivas relatadas por PIFANO (1954) pode ser explicado pela presença de casos agudos entre os 80 submetidos ao xenodiagnóstico, uma vez que em cerca de 6 deles comprovou-se a presença do parasita através da técnica de gota espessa. Em nossa experiência (PEREIRA *et alii*, 1996) ao longo de 8 anos de realização de xenodiagnósticos em que se fez uso das espécies *P. megistus* e *T. infestans* em indivíduos de diversas procedências do Brasil, os percentuais de triatomíneos positivos foram de respectivamente: 4,9% e 3,0% em cima dos examinados, valores similares aos achados nesta tese. Apesar de não explanado nessa publicação (PEREIRA *et alii*, 1996), o número de exemplares positivos nos 563 xenodiagnósticos raramente ultrapassou a 10; as exceções para mais normalmente ocorreram em pacientes imunossuprimidos por drogas ou pela infecção concomitante pelo vírus HIV (dados não publicados). Esta situação foi confirmada em uma publicação recente sobre o comportamento do xenodiagnóstico em pacientes com concomitância de infecção pelo *T. cruzi* e o vírus HIV, que demonstrou um resultado diferencial de 46,2% de triatomíneos infectados nos xenodiagnósticos efetuados nos pacientes com HIV e de 27,2% nos pacientes sem a infecção pelo HIV (RAMIREZ *et alii*, 1995). Nós concluimos, através desta análise comparativa com outras publicações, que o pequeno número de triatomíneos positivos nos xenodiagnósticos praticados nos 101 indivíduos sorologicamente da região de Oeiras e Colonia do Piauí confirma a baixa parasitemia desses indivíduos.

O número de parasitas circulantes ou parasitemia, é dependente de características intrínsecas do hospedeiro, bem como da população de *T. cruzi*, e um dos fatores determinantes na sensibilidade dos métodos de diagnóstico que se baseiam na detecção do parasita, merece, por isso, uma discussão especial. O comportamento parasitológico diferencial dos indivíduos infectados na fase crônica vem sendo consolidado através de alguns trabalhos. As avaliações deste perfil parasitário têm sido realizadas, até o momento, de forma semiquantitativa e, na grande maioria das vezes, pelo método de xenodiagnóstico, seja avaliando o número individual ou em *pool* de ninfas positivas ou pela positividade de uma série de xenodiagnósticos efetuados durante um certo período. Provavelmente RAMOS *et alii* (1949) e FREITAS (1952) tenham sido os primeiros a fazer este tipo de avaliação ao comprovar uma oscilação na positividade do exame após realizar vários xenodiagnósticos no mesmo paciente. Eles verificaram que alguns pacientes ora apresentavam exame positivo ora, negativo e outros cujo exame era sempre negativo, só vindo a positivar após várias repetições. Num dos estudos, ocorreu de um dos pacientes, com dados clínicos, epidemiológicos e sorológicos (Reação de Fixação do Complemento) positivos para a infecção chagásica, apresentar 8 vezes xenodiagnóstico negativo; só na nona repetição é que o resultado inverteu-se. Esta mesma irregularidade na parasitemia foi comprovada por MAEKELT & ALCAÑIZ (1960) ao acompanharem a presença do *T. cruzi* na corrente sanguínea de uma cadela, experimentalmente infectada, através de 318 xenodiagnósticos efetuados durante 14 meses. Apesar da irregularidade determinada pelo número de ninfas positivas, os autores não observaram fases de ausência do parasita e nem oscilação da parasitemia em relação às estações do ano. Dos 3.753 insetos sobreviventes e examinados depois de 60 dias após uma única alimentação na cadela, somente 554 (14,8%) encontraram-se com tripanosomas (empregou-se o método de exame das dejeções e do conteúdo fecal). CANÇADO *et alii* (1973), submetendo chagásicos crônicos a xenodiagnósticos mensais consecutivos por períodos até de três anos, verificaram a variação da positividade do método; enquanto uns pacientes exibiram todos os exames positivos (100%), outros mostraram graus menores de positividade, havendo até os que apresentaram apenas xenodiagnóstico negativo. Eles explicaram o fenômeno admitindo a existência de níveis diferentes de parasitemia. Com o objetivo determinado de conhecer o perfil de parasitemia de um grupo de 30 chagásicos crônicos, CERISOLA *et alii* (1974) realizaram mensalmente, por um período até 3 anos, uma série de xenodiagnósticos semiquantitativos que consistiram basicamente na aplicação simultânea de 8 caixas contendo cada uma 10 ninfas no III estágio de *T. infestans*. Ao final do acompanhamento, dos 508 xenodiagnósticos realizados, 358 (70,5%) mostraram-se positivos,

e do total de 4.064 caixas aplicadas, 1.419 (35%) apresentaram ninfas com parasitas. Adotando como critério o número de caixas positivas, os autores concluíram que existiram indivíduos de alta, intermediária e baixa parasitemia. Um exemplo disto foram dois pacientes, um com que se obteve 98,2% de caixas positivas e outro que apresentou apenas 1,4% de caixas; porém 15 dos 30 pacientes tiveram entre 54,9% a 13,0% de caixas positivas. Outros três trabalhos que se destacaram nesta linha de investigação foram os de CASTRO *et alii* (1983), PEREIRA *et alii* (1989) e COURA *et alii* (1991), que avaliaram a parasitemia de pacientes crônicos em distintas regiões endêmicas aplicando três xenodiagnósticos em períodos diferentes. A metodologia de xenodiagnóstico empregada diferiu principalmente no exame das ninfas: no de CASTRO *et alii* (1983) praticou-se a leitura em *pool* de cinco ninfas dissecadas ou menos de cinco quando haviam exemplares mortos; no de PEREIRA *et alii* (1989) e COURA *et alii* (1991) examinou-se as dejeções das ninfas individualmente. A outra diferença coube à forma de avaliação da "densidade" parasitária ou parasitemia. CASTRO *et alii* (1983), baseando-se no número de *pools* de ninfas positivas sobre *pools* de ninfas examinadas, agrupou os 303 pacientes estudados em três níveis diferentes: alta parasitemia = 68% ou mais *pools* positivos, média parasitemia = 20 a 67,9% de *pools* positivos, baixa parasitemia = 0 a 19,9% de *pools* positivos. Com este padrão, eles encontraram com alta, média e baixa parasitemia, respectivamente: 28 (9,2%), 73 (24,1%) e 202 (66,7%) dos pacientes. PEREIRA *et alii* (1989) classificaram os 206 pacientes de acordo com o percentual de ninfas positivas sobre o total de examinadas, encontrando: 105 (51,0%) pacientes sem parasitemia detectada (todas as ninfas negativas); 55 (26,7%) pacientes com baixa parasitemia (percentual de ninfas positivas maior que 0 e inferior a 2,0%); 27 (13,1%) pacientes com média parasitemia (percentual de ninfas positivas maior que 2,0% e inferior ou igual a 7,0%) e 19 (9,2%) pacientes com alta parasitemia (percentual de ninfas positivas maior que 7,0%). COURA *et alii* (1991) adotaram o número de xenodiagnósticos positivos sobre o total de realizados, desta forma eles puderam observar que dos 158 indivíduos com sorologia positiva, 48 (30,3%) deles tiveram os três xenodiagnósticos negativos, 30 (18,9%) apenas um xenodiagnóstico positivo, 29 (18,3%) dois xenodiagnósticos positivos, 51 (32,3%) todos os três xenodiagnósticos positivos. Mesmo com a dificuldade de compararmos as três publicações, devido à forma diferente de avaliação empregada em cada uma, podemos concluir, através do trabalho de PEREIRA *et alii* (1989), que uma percentagem pequena de ninfas se infectam em relação ao total das examinadas no xenodiagnóstico, o que confirma nossos dados. Também ficou clara a predominância de pacientes sem parasitemia e com baixa parasitemia sobre os outros dois grupos, tanto nos pacientes da região endêmica de Mambaí

(CASTRO *et alii*, 1983), como nos procedentes da região de Virgem da Lapa (PEREIRA *et alii*, 1989). Um dado interessante observado por PEREIRA *et alii* (1989) foi o fato da cardiopatia crônica chagásica ter sido mais presente no grupo de pacientes com alta parasitemia em relação aos de baixa parasitemia. Se analisarmos os perfis de parasitemia pelo número de xenodiagnósticos positivos, conforme COURA *et alii* (1991), verificamos que CASTRO (1980) em seu trabalho anterior, onde investigava o mesmo grupo de pacientes do trabalho de 1983, e que PEREIRA *et alii* (1989) encontraram, respectivamente, 31,5% e 51,0% de pacientes com os três xenodiagnósticos negativos; 20,2% e 23,8% de pacientes com apenas um xenodiagnóstico positivo; 23,3% e 13,1% dos pacientes com dois xenodiagnósticos positivos e 25,0% e 12,1% dos pacientes com os três xenodiagnósticos positivos. Ao confrontarmos estes dados com os de COURA *et alii* (1991), verificamos uma maior parasitemia nos indivíduos da região endêmica de Pains e Iguatama investigados pelo último grupo de pesquisadores, uma vez que cerca de 50,6% desses indivíduos tiveram de dois a três xenodiagnósticos positivos. Não pudemos comparar nossos dados com os obtidos por esses três grupos, uma vez que realizamos apenas um xenodiagnóstico. Mas esta análise no corpo da tese demonstrou haver um perfil de densidade parasitária característico para indivíduos de uma região endêmica e que deveria ser considerado nas análises comparativas entre os métodos de detecção do *T. cruzi*. Nós admitimos, no entanto, a necessidade de parâmetros mais precisos e quantitativos que permitam averiguar qual o real número de parasitas circulantes em pacientes crônicos e qual a relação deste número com a evolução da patogenia da doença de Chagas, visto que através do xenodiagnóstico isto é realizado de forma semiquantitativa.

Ao enfocarmos os dois parâmetros: número de exemplares alimentados logo após a aplicação no paciente e percentual de ninfas que sobreviveram até o dia do exame (igual a taxa de ninfas examinadas), pretendemos, como primeiro objetivo, obter com maior exatidão, para fins de cálculo, o número de exemplares aplicados que realmente tiveram a chance de captar um parasita e que conseguiram sobreviver até a data do exame. O segundo objetivo, foi verificar se os exemplares selecionados para o xenodiagnóstico teriam sofrido biologicamente no transporte do laboratório de criação para a área de campo e as condições adversas em que foram mantidos até o retorno para o laboratório. Neste caso, o grupo controle seria o resultado obtido por outros autores que empregaram o *T. infestans* e o *P. megistus* e analisaram tais parâmetros. Secundariamente pode-se avaliar a voracidade e resistência, características, também, consideradas, além da susceptibilidade, na escolha de uma espécie para o xenodiagnóstico.

Analisado o primeiro parâmetro, verificamos que das 3.080 ninfas no IV estágio submetidas à alimentação, no grupo de 77 pacientes, 82,9% delas foram capazes de ingerir sangue durante 30 minutos, não havendo diferença significativa entre as duas espécies. No entanto, as ninfas de *P. megistus* aplicadas nos 24 xenodiagnósticos em que se fez uso apenas desta espécie, o percentual de alimentação foi inferior (75,3%) e estatisticamente significativo. Devido às condições de sucção serem as mesmas, não temos explicação para a diferença a mesma espécie de um grupo e outro. Esta diferença do *P. megistus* nos dois grupos de indivíduos refletiu-se na média de sangue ingerida por ninfas, sendo maior nos pacientes onde maior número de ninfas se alimentaram (grupo 1 = 0,10g) e menor no grupo em que menos exemplares conseguiram ingerir sangue (grupo 2 = 0,08g). Fica difícil compararmos neste parâmetro o *P. megistus* com o *T. infestans* pois o *P. megistus* comportou-se de duas formas diferentes sobre as mesmas condições. Resultados mais expressivos foram relatados por MILES *et alii* (1975); eles conseguiram que um número maior de ninfas no V estágio (100% de *P. megistus* e 88,2% de *T. infestans*), deixadas também em jejum de duas a três semanas, se alimentassem durante 30 minutos em um macaco Rhesus infectado experimentalmente. Neste caso a casuística apresentada foi bem pequena e os autores não realizaram uma análise estatística comparando ambas as espécies, que tiveram números diferentes de exemplares aplicados. Com valores bem próximos aos nossos, CUBA-CUBA *et alii* (1978) obtiveram um percentual de alimentação das ninfas no III estágio de *T. infestans* igual a 82,2% em xenodiagnósticos efetuados em 38 pacientes chagásicos crônicos. Realizando xenodiagnósticos também em pacientes crônicos divididos em dois grupos, BRONFEN & ALVARENGA (1991) encontraram os seguintes percentuais de exemplares, respectivamente, de *P. megistus* e *T. infestans* no III estágio que se alimentaram: 90,4% e 97,2% no grupo I e 65,5% e 91,4% no grupo III. Fica claro que o *T. infestans* foi a espécie com o maior número de ninfas que se alimentaram nos dois grupos, contrariamente ao encontrado nesta tese. Especificamente em relação ao *P. megistus*, os dados de BRONFEN & ALVARENGA (1991) se assemelham aos nossos, tanto na diferente capacidade de se alimentar desta espécie em dois grupos distintos de pacientes, como também na média de ninfas alimentadas resultante da soma dos valores encontrados nos dois grupos. Esta média correspondeu a 77,95% (grupo I e II de BRONFEN & ALVARENGA, 1991) e de 78,89% (grupo de 77 e 24 da nossa investigação). Em relação ao parâmetro sobrevivência, as ninfas de *P. megistus*, em nosso trabalho, tanto as empregadas no grupo de 77 pacientes como no grupo de 24 pacientes, cujos percentuais foram de 93,5% e 91,8% respectivamente, mostraram-se mais resistentes que os exemplares da espécie *T. infestans*, que apresentou uma taxa de

77,5%. Esta menor resistência do *T. infestans* já havia sido observada previamente pelo número de exemplares mortos encontrados nos recipientes de vidro, nos quais transportou-se e manteve-se os mesmos até o momento de serem aplicados. O mais interessante é que as ninfas mortas estavam mais cheias de sangue do que as que conseguiram manter-se vivas. Se considerarmos a resistência às condições ambientais adversas uma das características biológicas a ser ponderada na escolha da espécie para xenodiagnóstico, a espécie *P. megistus* parece preencher melhor este requisito do que o *T. infestans*.

Taxas variadas de mortalidade de exemplares de *T. infestans* no III estágio, em função do período de exame, foram relatadas por CERISOLA *et alii* (1974). Eles verificaram, na leitura aos 30 dias, um percentual igual a 11,8% de exemplares mortos, o que significou uma sobrevivência de 89,2%; nas duas leituras seguintes, aos 60 e 90 dias, os valores acumulados cresceram chegando a 29,0% (71,0% de vivos) e 63,9% (36,1% de vivos) respectivamente. Atribuiu-se o grande número de ninfas mortas, nas duas últimas leituras, ao longo jejum a que foram mantidas e ao traumatismo provocado pela manipulação para extração do conteúdo fecal. Pontos relevantes na análise da taxa de mortalidade foram abordados por BENTO (1978) ao empregar ninfas no IV estágio de *T. infestans* e *T. brasiliensis* nos xenodiagnósticos efetuados, durante o período de 1977 a 1978, em habitantes de duas regiões distintas no Brasil, sendo uma Oitis (Piauí), povoado que também investigamos, e a outra em Bambuí (Minas Gerais). Os percentuais de mortalidade descritos pela autora no grupo de ninfas da espécie *T. infestans* aplicadas respectivamente nos pacientes de Oitis e Bambuí foram de 34,43% e 56,48%, o que correspondeu a 65,57% e 43,52% de exemplares sobreviventes. Em relação às ninfas de *T. brasiliensis*, comprovou que 32,06% e 61,73% das ninfas utilizadas nos xenodiagnósticos praticados respectivamente em Oitis e Bambuí, não se mantiveram vivas até o momento do exame, significando que apenas 67,94% e 38,27% conseguiram permanecer vivas. Para a autora (BENTO, 1978), sobreviveram melhor as espécies naturalmente ocorrentes na área de procedência dos pacientes, *T. infestans* em Bambuí e *T. brasiliensis* em Oitis. Esta mesma correlação não pode ser feita com as espécies que fizemos uso, uma vez que o *P. megistus* e o *T. infestans* não foram ainda encontrados nos municípios de Oeiras e Colônia, existindo apenas relatos da presença de *T. infestans* na região sudeste e centro do Estado do Piauí (DIAS, 1987). Tanto os exemplares de *T. infestans* como os de *T. brasiliensis* empregados por BENTO (1978) mostraram terem resistido menos do que os nossos exemplares de triatomíneos; consideramos que isto se deva em parte aos mesmos motivos expostos por CERISOLA *et alii* (1974) anteriormente: jejum prolongado (cerca de 60 dias) e manipulação das ninfas para obtenção das dejeções aos 30 dias (primeiro

exame). Provavelmente contribuiu também o fato de BENTO (1978) ter mantido as ninfas que não se alimentaram no paciente (cujo abdome não se modificou quanto ao volume inicial), uma vez que elas foram submetidas a muito mais tempo sem alimentação; isto ficou concludente na correlação positiva entre ninfas que tiveram ótima alimentação e que sobreviveram até o último exame. Neste item, a autora faz referência à média de sangue ingerida pelas ninfas no IV estágio de *T. infestans* e *T. brasiliensis* que foi de respectivamente 0,09g e 0,11g, valores muito próximos aos nossos. Uma outra correlação importante feita pela outora refere-se as médias mensais de temperatura e umidade e a mortalidade de *T. infestans* e *T. brasiliensis*, entre outubro de 1977 a março de 1978, que não demonstraram correlação significativa entre estes parâmetros, o que denota não ter sido a taxa de sobrevivência influenciada pela umidade e temperatura ambiente.

MARSDEN *et alii* (1979), também praticando xenodiagnósticos em uma área de campo no interior do Brasil, comprovaram uma mortalidade de 9,9% no grupo de ninfas no III estágio de *T. infestans* e 20,4% no grupo de ninfas no I estágio de *D. maxima* aplicadas paralelamente, o que correspondeu a um percentual de exemplares vivos de 90,1% e 79,6% respectivamente. Segundo os autores, a possível explicação para o *D. maxima* ter morrido mais que a outra espécie deve-se ao fato de eles serem mais sensíveis a variações de temperatura e umidade, e mesmo à locomoção para a área de campo, o que confirma a nossa hipótese da influência do transporte para área de campo na mortalidade dos exemplares de determinadas espécies. Tanto o trabalho de CERISOLA *et alii* (1974), leitura aos 30 dias, como o de MARSDEN *et alii* (1979) demonstraram uma resistência maior das ninfas no III estágio de *T. infestans* em relação às do IV estágio da mesma espécie que empregamos nos 77 xenodiagnósticos (77,5% de sobrevivência). Isto nos leva ao questionamento se as ninfas de III seriam mais resistentes do que as de IV?

Quando comparamos nossos resultados de sobrevivência com os obtidos por FUNATSU (1990) em sua monografia de Bacharelado, na qual empregou o método de xenodiagnóstico fazendo uso de protocolo idêntico ao desta tese, verificamos que ela encontrou uma taxa de sobrevivência maior, tanto para *P. megistus* como para *T. infestans*, sendo esta de respectivamente 91,2% e 89,2%. A importância desta comparação é que tanto os triatomíneos utilizados por FUNATSU (1990) como o desta tese provieram da mesma colônia de criação, tendo como diferença básica o fato de que no primeiro estudo os exemplares não foram transportados, sendo sempre mantidos no mesmo laboratório, porque praticaram-se todos os xenodiagnósticos em um laboratório anexo ao da criação. Tudo indica que esta diferença seja circunstancial para explicar nossos resultados inferiores, uma vez que os

triatomíneos empregados por FUNATSU (1990) ficaram livres das situações adversas a que se submeteram os exemplares enviados ao campo. Provavelmente a sobrevivência relatada por FUNATSU (1990) teria sido maior se a autora não tivesse mantido as ninfas que não se alimentaram durante os 30 minutos; diferente da publicação de BRONFEN & ALVARENGA (1991), que separam as ninfas engorgitadas daquelas que não haviam sugado, sendo estas desprezadas, assim como o fizemos. Nessa investigação, nos dois grupos diferentes de pacientes submetidos ao xenodiagnóstico, BRONFEN & ALVARENGA (1991) relataram valores de sobrevivência de 96,4% e 89,3% para *P. megistus* e de 92,5% e 96,9% para *T. infestans*. Os dados demonstraram uma variação da mesma espécie nos dois grupos, que os autores não justificam, provavelmente por acharem muito pequena a diferença.

Na tentativa de verificar a influência da quantidade de sangue ingerida pelas ninfas aplicadas na positividade do xenodiagnóstico, nós resolvemos analisar as seguintes variáveis: quantidade de sangue ingerida pelos exemplares individualmente e em *pool* de cada espécie e a quantidade de sangue total ingerida pelas ninfas em cada xenodiagnóstico independente da espécie e sua relação com o resultado do exame.

Apesar da quantidade de sangue total ingerida pelos exemplares de *P. megistus*, a espécie que comprovou maior número de casos positivos, ter sido um pouco maior do que a ingerida pelos exemplares de *T. infestans*, a média por ninfa não foi estatisticamente significativa. Também não conseguimos demonstrar relação entre o volume de sangue e a positividade do xenodiagnóstico, o que se deveu, provavelmente, ao pequeno número de casos positivos e negativos nas faixas extremas de quantidade ingerida de sangue, conforme havíamos relatado em resultados. Também NEVES & CARVALHO (1972), ao tentarem correlacionar experimentalmente a capacidade elevada de ingestão de sangue de alguns triatomíneos com a positividade, não tiveram muito sucesso. Uma das espécies por eles testadas, o *T. vitticeps*, apesar de ter ingerido mais sangue que o *T. infestans*, utilizado comparativamente, no exame do conteúdo fecal mostrou uma pobreza de flagelados. Provavelmente o parâmetro quantidade de flagelados nas fezes e o pequeno número de exemplares alimentados (40 ninfas no V estágio para cada uma das 3 cepas inoculadas em cobaia) contribuíram para este resultado não conclusivo. Além da análise ter sido dificultada pelo fato de se alimentar os triatomíneos em cobaias com parasitemia patente, o que possibilitou a infecção de todos os exemplares, mesmo com pequenos volumes de sangue. O volume de sangue ingerido por cada espécie foi o correspondente a 0,390 ml e 0,575 ml respectivamente para *T. infestans* e *T. vitticeps*. O mesmo ocorreu com CERISOLA *et alii* (1974), que detectaram maior número de pacientes com parasita empregando uma espécie que

ingeriu pequenas quantidades de sangue, no caso o *T. infestans*, e nenhum caso positivo através da espécie que alimentou-se mais, o *T. dimidiata*. A média de sangue ingerida por essas ninfas *T. infestans* e *T. dimidiata* correspondeu a respectivamente 0,090g e 0,206g; sendo o valor de *T. infestans* idêntico ao que encontramos nesta tese. Ressaltando que nestes xenodiagnósticos aplicaram-se ninfas no III e IV estágio em apenas 3 pacientes crônicos.

Nem sempre o insucesso que tivemos, assim como outros grupos de investigadores (NEVES & CARVALHO, 1972; CERISOLA *et alii*, 1974), em tentar associar o volume de sangue ingerido pelo vetor com a positividade do mesmo foi reproduzida em algumas investigações. Uma delas, a de ALMEIDA *et alii* (1973), pôde-se comprovar uma tendência ao aumento progressivo paralelo entre os índices de infecção e a quantidade de sangue ingerida pelos exemplares de *R. neglectus* submetidos à alimentação infectante, o estágio que ingeriu mais volume de sangue foi o que apresentou maior índice de infecção. Um outro dado interessante nessa investigação, e que estaria reforçando o que relatamos anteriormente, é que as diferenças nestes índices só puderam ser percebidas conforme a parasitemia tornava-se mais baixa nas cobaias que serviram de fonte de infecção. Os volumes variaram de 1 - 3 mg no I estágio a 110 - 140 mg no V estágio. Em uma outra investigação, PIFANO *et alii* (1973) partiram da hipótese de que a quantidade de sangue ingerida pelas ninfas aplicadas em indivíduos suspeitos da infecção chagásica seria possivelmente mais importante que o potencial de receptividade do vetor à população de parasitas circulantes na positividade do xenodiagnóstico. Eles conseguiram demonstrar que entre as duas espécies testadas, *R. prolixus* e *T. pallidipennis*, a que teve a capacidade de se alimentar com mais sangue apresentou maior número de ninfas positivas e foi capaz de comprovar mais pacientes com a infecção, mesmo não sendo a espécie vetora existente no local de procedência dos pacientes. As ninfas das espécies *R. prolixus* e *T. pallidipennis* ingeriram, respectivamente, 229,6 mg e 700,25 mg. Mesmo MILES *et alii* (1975), relatando que não puderam mostrar correlação entre a quantidade de sangue ingerida e a taxa de infecção das espécies *P. megistus*, *T. infestans* e *R. prolixus*, obtiveram o indicativo de que pequenos volumes de sangue ingeridos do hospedeiro falharam para produzir a infecção no vetor. Uma outra comprovação foi feita por MINTER *et alii* (1977), ao realizarem xenodiagnóstico com ninfas no I estágio de *T. infestans*, *P. megistus* e *R. prolixus* em 4 diferentes tipos de hospedeiros, verificaram, através das ninfas alimentadas em macacos Rhesus experimentalmente infectados, que o aumento individual na ingestão de sangue resultou em um aumento no percentual de triatomíneos infectados. Também concluíram que a baixa positividade dos xenodiagnósticos com ninfas no I estágio, devido ao pequeno volume de sangue que as mesmas se alimentam,

poderia ser compensada pela repetição do exame com um número maior de exemplares. Apesar de todos estes indicativos, CUBA-CUBA *et alii* (1978) não conseguiram achar correlação entre as três variáveis: quantidade de sangue ingerida, proporção de ninfas alimentadas e proporção de exemplares infectados das espécies *T. infestans* e *D. maxima*, ambas no I e III estágio ninfal, submetidas à alimentação em 38 pacientes chagásicos crônicos. Por outro lado, nesses mesmos xenodiagnósticos, significativamente maior proporção de pacientes foram diagnosticados utilizando-se 40 ninfas no III estágio de *T. infestans* do que com apenas 10 ninfas da mesma espécie e estágio, este é um dado sugestivo da importância que a quantidade total de sangue ingerida pelo *pool* de exemplares alimentados tem na positividade do método, uma vez que quanto maior o número de triatomíneos empregados mais aumenta a probabilidade de se ingerir sangue e conseqüentemente mais chance de se sugar um parasita, isto logicamente dentro de um limiar de parasitemia do hospedeiro. Esta lógica de raciocínio pode servir para explicar o resultado que MINTER-GOEDBLOED & MINTER (1987) obtiveram fazendo uso de ninfas no I estágio de *P. megistus* nos xenodiagnósticos praticados em pacientes na fase aguda, pós-aguda e crônica cuja positividade havia sido confirmada previamente em xenodiagnósticos anteriores empregando-se ninfas no IV e V estágio de *P. megistus* e *T. infestans*. Nesse estudo as ninfas no I estágio de *P. megistus* foram inábeis para confirmar a positividade da maioria dos pacientes crônicos, porém eficazes nos pacientes agudos.

Em uma das análises mais expressivas, MINTER *et alii* (1978) mostraram, através dos dados obtidos com xenodiagnósticos aplicados em 29 pacientes crônicos, 6 gambás naturalmente infectados e um macaco Rhesus infectado experimentalmente (fase crônica), que as diferenças interespecíficas na quantidade de sangue ingerida e diferenças intrínsecas na susceptibilidade do *T. cruzi* entre as espécies de triatomíneos são fatores limitantes na standardização e interpretação dos resultados do xenodiagnóstico. Nesses xenodiagnósticos fizeram uso de ninfas no I, IV e V estágios de 3 diferentes espécies: *P. megistus*, *T. infestans* e *R. prolixus*, sendo a quantidade média de sangue ingerida por *P. megistus* IV estágio igual a 168 mg (0,168 g) valor bem maior que a média de ingestão de sangue das ninfas de *P. megistus* aplicadas no xenodiagnóstico da nossa investigação. Reforçando a análise de MINTER *et alii* (1978) estão os dados obtidos nos xenodiagnósticos indiretos (*in vitro*) praticados em 63 pacientes encaminhados ao nosso laboratório no Departamento de Medicina Tropical do IOC. Dos 63 xenodiagnósticos indiretos em que se empregaram ninfas de *P. megistus* e *T. infestans* (IV estágio), a 34 ofereceu-se a mesma quantidade de sangue ingerida pelos exemplares das mesmas espécies aplicados

simultaneamente de forma direta (xenodiagnóstico tradicional - *in vivo*); e nos 29 xenodiagnósticos restantes forneceu-se às 40 ninfas uma quantidade fixa de 8 ml de sangue (2 ml para cada 10 ninfas), que foi sempre superior a quantidade ingerida pelas ninfas também aplicadas de forma tradicional. No último grupo o xenodiagnóstico *in vitro* superou em positividade o xenodiagnóstico tradicional demonstrando com isso a importância do volume de sangue ofertado; mas, em ambos os métodos, o *P. megistus* detectou maior número de pacientes infectados que o *T. infestans*, confirmando a presença de diferenças de susceptibilidade ao parasita entre as duas espécies (JUNQUEIRA *et alii*, 1995). Resta-nos saber agora qual o volume de sangue ideal do hospedeiro a ser coletado e ofertado aos triatomíneos, dentro do limiar da capacidade de ingestão das espécies, o que permitiria alcançar um padrão máximo de sensibilidade do método, sem ser necessário, é lógico, a aplicação de um grande número de ninfas, pois isso tornaria demorada e exaustiva a etapa de leitura, além dos problemas éticos.

O papel da quantidade de sangue ingerida pelos exemplares de triatomíneos ainda continua sendo para nós um ponto polêmico e que necessita de maiores investigações quantitativas. No entanto, nos parece óbvio que as espécies de triatomíneos com alta susceptibilidade ao parasita (ou a populações do parasita) e que possuam a capacidade de ingerir quantidades maiores de sangue mostrariam-se mais aptas para o xenodiagnóstico, pois teriam grande probabilidade de captar um parasita em parasitemias bem baixas. Na nossa investigação, o *P. megistus* parece ser um candidato, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa no parâmetro "volume de sangue ingerido" em relação ao *T. infestans*. Aliás, a constatação de não haver diferença estatisticamente significativa entre as espécies *T. infestans* e *P. megistus* em relação aos parâmetros "número de ninfas alimentadas" e "média de sangue ingerida por ninfa" vem a reforçar a idéia de que a maior capacidade do *P. megistus* em detectar *T. cruzi* nos xenodiagnósticos realizados deveu-se, ao que tudo indica, a uma característica inerente a essa espécie.

Um outro ponto a ser considerado, provavelmente um fator limitante do xenodiagnóstico que interagiria com a susceptibilidade e quantidade de sangue ingerida, refere-se à necessidade da ingestão de um número mínimo de parasitas para que o mesmo pudesse ser detectado no vetor. NEAL & MILES (1977a) demonstraram que o número ótimo de tripomastigotas ingeridas para se obter uma infecção mais intensa em *R. prolixus* seria na razão de 10^3 a 10^4 , uma vez que tanto os valores acima quanto os abaixo destes deram origem a infecções a nível mais reduzido, bem como uma população de até 177 formas sangüícolas (tripomastigotas) de *T. cruzi* mostrou-se suficiente para infectar o triatomíneo. Entretanto

BAHIA (1985) relatou que o número de formas sangüíneas ingeridas pelo vetor não apresenta associação direta com o número de flagelados eliminados nas fezes do triatomíneo. Esta associação não foi extrapolada pela autora para o número total de *T. cruzi* encontrado no tubo digestivo do vetor. Parece-nos que mais estudos experimentais usando parâmetros bem definidos tais como: números fixos e diferentes de inóculos, ajudariam a esclarecer melhor o papel do número e formas do *T. cruzi* na positivação do xenodiagnóstico. Além da susceptibilidade, esse ponto talvez seja uma das desvantagens do xenodiagnóstico em relação ao diagnóstico através da PCR, que não está à mercê da susceptibilidade e de um número maior que um parasita para apresentar resultado positivo, conforme veremos mais adiante.

Finalmente, não podemos deixar de abordar a praticidade do método de xenodiagnóstico nas condições que dispusemos durante todo o estudo desta tese. Neste caso, quatro etapas do protocolo serão ressaltadas: obtenção, transporte, manutenção e leitura das ninfas. Para conseguirmos o número de triatomíneos no IV estágio necessário para ser aplicado em todos os pacientes, tivemos que acasalar com bastante antecedência os exemplares adultos que dispúnhamos na nossa colônia, cerca de três meses antes da viagem. Aproximadamente 5.000 exemplares foram levados para a área endêmica (2.500 *P. megistus* e 2.500 *T. infestans*). Para o transporte tomou-se o cuidado de acomodar as ninfas no IV e III (prestes a mudar para o IV) em frascos devidamente acondicionados, não só como medida de segurança, mas também como de preservação dos triatomíneos; o que representou duas caixas de isopor de 20 litros cada. Apesar de todo este cuidado, um número expressivo de ninfas de *T. infestans* morreu. Na área endêmica, tornou-se necessário alimentar tanto as ninfas que ainda seriam empregadas, reservadas para os últimos xenodiagnósticos, como as que já haviam sido aplicadas nos pacientes que foram alimentadas em galinhas aos 23 dias após aplicação. Para essa atividade tivemos que contar com um funcionários da FNS. Finalmente a última etapa do protocolo, referente ao exame das ninfas, provavelmente uma das etapas mais trabalhosas, pois examinaram-se cerca de 5.000 lâminas (\cong 1.638 em *pool* e 3.277 individuais) e envolveu 6 profissionais. Nós poderíamos ter optado pela técnica de MAEKELT (1962) onde vários exemplares são processados ao mesmo tempo após subsequente trituração, filtração, centrifugação e exame em microscópio de contraste de fase; porém seria impossível detectar a atividade da infecção e criar um parâmetro de parasitemia semi-quantitativo dos pacientes, uma vez que não se poderia determinar o número de insetos positivos além da impossibilidade de preservação dos exemplares para estudos futuros. Todo este trabalho requerido para a realização do xenodiagnóstico em uma grande casuística mostrou-se como uma das maiores desvantagens do método.

Com a revisão da literatura, verificamos que a hemocultura não tem sido adotada com a mesma freqüência do xenodiagnóstico como método de diagnóstico da infecção chagásica na fase crônica. Isto se deve provavelmente a fatores tais como: não reprodutibilidade de bons resultados relatados por alguns grupos de pesquisa; ao exaustivo trabalho dispensado nas leituras, geralmente em 4 períodos diferentes (30, 60, 90 e 120 dias); longo tempo de espera para a conclusão do resultado, podendo ocorrer, às vezes, só na última leitura. O exemplo da grande discrepância nas taxas de sensibilidade são os trabalhos que, empregando protocolo praticamente idênticos, encontram valores bem diferentes, tais como: MOURÃO & MELLO (1975) e RASSI *et alii* (1981); LUZ *et alii* (1994) e MORA (1996) que conseguiram índices de sensibilidade em pacientes crônicos de respectivamente: 30% e 0% nos dois primeiros; 79% e 40% nos dois últimos.

Em nossa experiência adquirida através dos exames de hemocultura e xenodiagnóstico realizados em pacientes crônicos, provenientes de várias áreas endêmicas do Brasil, que são encaminhados ao nosso serviço no Rio de Janeiro para realização de ambos os exames, o xenodiagnóstico tem comprovado maior número de casos positivos que a hemocultura (dados não publicados). Quanto ao emprego da hemocultura em trabalhos epidemiológicos desenvolvidos diretamente em áreas endêmicas, esta foi a primeira vez que introduzimos a metodologia. Nossos resultados mais uma vez foram pouco promissores, uma vez que apenas 25,7% dos indivíduos tiveram comprovação do parasito pelo método. Entretanto, este percentual foi bem mais significativo que o de FIGUERÊDO-SILVA *et alii* (1991) que, ao empregarem a hemocultura para diagnosticar 265 indivíduos do povoado de Oitis (Piauí), não conseguiram detectar *T.cruzi* em nenhum dos cultivos (0%); enquanto que as reações de IFI e ELISA foram capazes de comprovar a presença de Acs anti-*T.cruzi* em cerca de 14% dos indivíduos. Talvez este insucesso se deva a pequena quantidade de sangue utilizada no cultivo, apenas 1 a 2 gotas por tubo de meio NNN (Novy-MacNeal-Nicoll) destinado a cada indivíduo; apesar de que MINTER-GOEDBLOED *et alii* (1978) conseguiram uma positividade de 44% nos casos crônicos, apenas semeando 0,1 a 0,2 ml de sangue por tubo de meio e destinando cerca de 2 a 4 tubos por paciente. Tanto FIGUERÊDO-SILVA *et alii* (1991) como MINTER-GOEDBLOED *et alii* (1978) aplicaram o xenodiagnóstico em paralelo à hemocultura e obtiveram uma percentagem de exames positivos, através do xenodiagnóstico, de, respectivamente, 22% (com 4 diferentes espécies de triatomíneos) e 69% (com ninfas de IV e V estágio de *P. megistus*).

Ao compararmos o valor de 25,7% com o de outros autores cujo protocolo de hemocultivo seguido foi semelhante ao nosso, verificamos que apenas o de BRONFEN *et alii* (1989) e de PEREIRA *et alii* (1989) foram inferiores; eles conseguiram 24,1% e 19,4% de positividade, respectivamente. Valores acima destes foram relatados por CHIARI *et alii* (1979), GALVÃO *et alii* (1993), LUZ *et alii* (1994), FERNANDES *et alii* (1995) e MORA (1996) que encontraram respectivamente: 55%; 47%; 79%; 53,3% e 40%. O de FERNANDES *et alii* (1995) e o de MORA (1996), bem como parte do nosso estudo objetivaram avaliar a utilização da hemocultura em amostras de sangue coletadas em condições de campo. Nos 3 protocolos, o sangue foi processado em condições pouco ideais, comuns de serem encontradas nas áreas endêmicas da doença de Chagas, porém existem pontos em cada um deles que merecem ser ressaltados e discutidos. No de FERNANDES *et alii* (1995), o sangue, após coletado, foi estocado em gelo até o momento do cultivo. O interessante teria sido se os autores tivessem comparado com sangue deixado em condições ambientais, uma vez que é impraticável conseguirmos gelo em locais onde não há energia elétrica ou muitas vezes a temperatura é tão alta e os locais distantes que o gelo não se mantém por muito tempo (experiência pessoal em transportar plasma para sorologia). Em contrapartida, MORA (1996) relata que processou o sangue imediatamente após a coleta, o que também nem sempre é possível, quando a investigação envolve outras atividades simultâneas que também requerem a presença do pesquisador e/ou técnico. O outro ponto refere-se a casuística da amostra investigada por MORA (1996) onde 30 dos 85 pacientes, que compuseram o estudo, previamente haviam se submetido ao xenodiagnóstico e a parasitemia comprovada, segundo critérios de CASTRO *et alii* (1983) relatados anteriormente; sendo de 6, 12 e 12 com, respectivamente, alta, média e baixa parasitemia. A hemocultura, neste grupo, teve maior chance de ser positiva, o que pode ter promovido um aumento distorcido da sensibilidade do método.

Existem trabalhos na literatura cujo procedimento metodológico também se baseou no cultivo em meio LIT do concentrado de células sangüíneas após centrifugação e lavagem, contudo a quantidade de sangue processada correspondeu a um terço ou metade da que fizemos uso no nosso protocolo. Entre estes estão o de MOURÃO & MELLO (1975), RASSI *et alii* (1981) e JÖRG & BÁEZ (1993), cujos respectivos percentuais de sensibilidade foram de 30%, 0% e 44,4%. O de JÖRG & BÁEZ distingue-se não apenas por demonstrar taxas altas de detecção de parasita, mas por encontrar uma relação inversa entre a positividade e o tempo de afastamento do paciente da área endêmica, onde provavelmente contraíram a primoinfecção. Em relação à taxa de 44,4% obtida por JÖRG & BÁEZ (1993), não sabemos

se os repiques seriados praticados em cada tubo semeado podem ter influenciado neste aumento da sensibilidade do hemocultivo. Ao estabelecermos uma analogia entre os resultados de JÖRG & BAÉZ (1993) com o de LUZ *et alii* (1994), podemos observar que quando ambos aumentaram o volume de sangue processado para o cultivo, de 15 para 120 ml e de 30 para 90 ml correspondentemente a primeira e segunda publicação, ocorreu um crescimento considerável na sensibilidade, de 44,4% passou para 86,6% (78 positivos em 90 casos) e de 79% para 94% (31 positivos em 34 casos).

A baixa sensibilidade da hemocultura no nosso estudo merece uma análise especial, uma vez que a quantidade de sangue processada para o exame foi bem alta, rigorosamente 30 ml de cada paciente. Com este volume acreditamos que a oportunidade de captar um parasita tinha sido bem maior que a dos outros dois métodos: xenodiagnóstico e PCR, cujos resultados mostraram-se mais significativos. Segundo NEAL & MILES (1977a, b), são necessárias cerca de, no mínimo, 10 formas tripomastigotas para poder se obter uma cultura positiva. Contudo, nos experimentos de ORREGO *et alii* (1980) empregando meio de Warren, conseguiu-se identificar parasitas nos tubos em que o volume final semeado continha apenas um parasita. Acreditamos que valores menores, como relatado por ORREGO *et alii* (1980), possam ser suficientes para identificarmos *T.cruzi* nos cultivos processados em meio LIT, pois este meio é rico em nutrientes bem como muito usado nos laboratórios de pesquisa para o isolamento do parasita, obtenção de massa de diferentes cepas de *T.cruzi* (CHIARI, 1992) e em protocolos de clonagem. Mesmo assim, não podemos deixar de considerar a possibilidade da população circulante de parasitas nos indivíduos procedentes da área investigada ter tido dificuldade em se adaptar no meio empregado, devido às características biológicas e bioquímicas diferentes daquelas dos pacientes em que o hemocultivo teve sucesso (CHIARI *et alii*, 1979, GALVÃO *et alii*, 1993, LUZ *et alii*, 1994). Essa abordagem foi dada por BRONFEN *et alii* (1989) para justificar o baixo índice de isolamento obtido através da hemocultura realizada em pacientes crônicos procedentes de várias regiões de Minas Gerais. Um outro fato interessante, e que pode estar relacionado com isto, é que, das 26 hemoculturas, em apenas uma não conseguimos manter o parasita isolado, mesmo após várias tentativas de repique. Uma outra explicação plausível seria a não diferenciação, no meio de cultivo, das formas amastigotas desenvolvidas a partir de tripomastigotas sanguíneas em formas flageladas, o que tornaria difícil o reconhecimento a fresco, sendo necessário o exame de preparações coradas para identificação desta forma não flagelada, e isto não foi feito. Este fenômeno de estabilização no estágio de amastigota foi enfatizado por MINTER-

GOEDBLOED (1978), MINTER-GOEDBLOED *et alii* (1978) e BASSO & MORETTI (1984).

O último ponto a ser abordado na tentativa de explicar a baixa taxa de sensibilidade, e que nos parece ser o mais relevante, é a presença de possíveis fatores inibidores do crescimento no sangue processado. As condições disponíveis no local onde realizamos toda a etapa de centrifugação e lavagem das células sangüíneas nos obrigou a promover alterações nesta etapa da técnica em relação ao protocolo original de LUZ *et alii* (1994). Em vez de uma centrífuga refrigerada, utilizamos uma centrífuga clínica; a retirada do plasma e a lavagem da papa de hemáceas processou-se em uma caixa de madeira tipo capela com bico de Bunsen dentro e não em câmara de fluxo laminar; o sangue após coleta permaneceu em temperatura ambiente por cerca de 4 a 6 horas antes de ser centrifugado e lavado. Provavelmente esta última alteração, de não processar o sangue imediatamente, tenha agido de maneira negativa na sobrevivência do *T.cruzi*, uma vez que este permaneceu em contato com fatores existentes no sangue total que poderiam ter agido de forma letal sobre ele; além de ficar submetido à alta temperatura existente no laboratório que improvisamos. Existem vários relatos sobre a ação negativa de fatores sangüíneos sobre o parasita, entre eles podemos citar: MUNIZ & BORRIELLO que em 1945 haviam demonstrado o poder lítico do soro de alguns indivíduos infectados sobre o *T.cruzi in vitro*; KRETTLI & BRENER (1976) verificaram a ação lítica e aglutinante que o soro de animais imunes causavam sobre as formas tripomastigotas de algumas cepas do parasita; PIFANO (1960) que enfoca o potencial macrofágico dos leucócitos transportados como um dos elementos condicionantes no isolamento do parasita, sem, no entanto, apresentar dados experimentais sobre esta afirmativa; MINTER-GOEDBLOED (1978) também atribuiu, entre outros fatores, aos humorais e celulares presentes no sangue semeado de pacientes crônicos a responsabilidade pelos resultados inferiores encontrados num dos grupos por ele estudado. Na prática do hemocultivo ficou demonstrada, por CHIARI *et alii* (1978) e CHIARI *et alii* (1979), a importância que a retirada do plasma antes do cultivo produzia sobre a positividade do hemocultivo.

A outra hipótese a ser considerada seria atribuímos a nossa baixa positividade ao fato de termos empregado o anticoagulante heparina. Segundo BARBOSA *et alii* (1983), após uma série de 4 experimentos, a heparina comportou-se como um agente bloqueador importante para o isolamento do *T.cruzi*. Nesse trabalho, eles justificam que os bons resultados, relatados na literatura, empregando a heparina como anticoagulante no sangue coletado para hemocultivo devem-se à remoção da mesma após a etapa de lavagem realizada nos protocolos executados. Isto nos pareceu contraditório, uma vez que em um dos quatro

experimentos promovidos por BARBOSA *et alii* (1983), também em uma das etapas do protocolo, removeu-se o plasma para a seguir promover-se a lavagem das células existentes no sedimento e, no entanto, este experimento não apresentou caso positivo de isolamento. Baseados nisto e nos achados de CHIARI *et alii* (1978) e de GALVÃO *et alii* (1988), que verificaram não haver aumento de positividade nas hemoculturas em que a heparina foi substituída pelo anticoagulante EDTA, nós desconsideramos a hipótese do papel bloqueador da heparina.

Apesar dos cuidados de assepsia tomados desde a coleta até o processamento do sangue no local onde improvisamos nosso laboratório, a taxa de contaminação dos tubos semeados foi alta, em torno de 3 tubos contaminados por 5 semeados, por paciente. FERNANDES *et alii* (1995) e MORA (1996) referem-se a um índice de contaminação de, respectivamente, 1,6% e 17%. O índice mais baixo, encontrado por FERNANDES *et alii* (1995), talvez se deva ao fato deles terem manuseado menos sangue, uma vez que, após retirada do plasma, aboliram a etapa de lavagem das células sangüíneas, sendo estas diretamente semeadas em 4 tubos contendo meio LIT. ORREGO *et alii* (1980), em suas experiências com hemocultura, demonstraram que a centrifugação prévia do sangue para retirada do plasma facilitou a contaminação do cultivo. Torna-se importante ressaltar que a contaminação comprovada na nossa investigação ocorreu na área endêmica, pois os tubos que foram deixados no Rio de Janeiro para cultivo de amostras rotineiramente repicadas não apresentaram nenhum tipo de contaminação e nem problemas de crescimento. O que nos resta especular é: até que ponto a contaminação dos tubos semeados, aliada a fatores mencionados inicialmente, possam ter contribuído para a inibição do crescimento do parasita e, conseqüentemente, influenciado na sensibilidade da hemocultura? Apesar de que na tese de MORA (1996), a única de todos os trabalhos consultados a avaliar de forma mais criteriosa o índice de contaminação, não se atribuir à contaminação papel importante nos resultados finais das hemoculturas. No entanto, ao analisarmos com atenção os dados relatados, verificamos que, dos 51 tubos encontrados contaminados durante a investigação, apenas 4 estavam positivos; e dos 374 tubos não contaminados, 57 apresentavam parasita, o que corresponderia a um percentual de positividade por tubo de respectivamente 7,84% e 15,25%, indicando uma influência negativa da contaminação no desenvolvimento do parasita, apesar de que, segundo a autora, não foi possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas pelo pequeno número de observações em cada categoria.

MOURÃO & CHIARI (1975) afirmaram que: "... a probabilidade de obtenção de culturas positivas estaria relacionada ao número de tubos semeados, semelhante ao que

ocorre na técnica de xenodiagnóstico de SCHENONE et alii (1968) onde o aumento do número detriatomíneos concorre para obter-se maior positividade". Esta sustentação dos autores demonstra a direta relação entre a quantidade de sangue semeado ou ingerido e a positividade de ambos os métodos. É ponto básico e de partida para o sucesso da hemocultura, e como veremos mais adiante da PCR, que se estabeleça um volume mínimo, mais suficiente de sangue, que possibilite "a captura" de pelo menos um parasita no ato da coleta de sangue. A quantificação dos tubos positivos semeados em cada série de hemoculturas permite que se tenha uma idéia aproximada deste volume mínimo, além de fornecer um perfil indireto da parasitemia do paciente. Neste trabalho, em que processamos 30 ml de sangue, apenas 41 (8,1%), dos 505 tubos semeados, apresentaram crescimento de parasita, percentuais semelhantes aos descritos por PIFANO (1954), MOURÃO & CHIARI (1975) e CHIARI & DIAS (1975); sendo apenas superados pelos de MOURÃO & MELLO (1975) e MORA (1996). Cada um deles descreveu, respectivamente, os seguintes percentuais: 87 (9,77%), em 890; 54 (4,04%), em 1.337; 12 (8,3%), em 144; 25 (17,12%), em 146 e 61 (17,84%), em 340. CHIARI et alii (1979) encontraram 3 valores intermediários ao nosso, que foram decorrentes do tempo e do tipo de estocagem realizada com o sangue antes de ser processado. Estes percentuais de tubos positivos decresceram de 26,6% para 18,0% e 7,2%, respectivamente, em função do sangue ter sido: imediatamente processado e semeado; estocado em geladeira por 24 e 48 horas com a retirada prévia do plasma; estocado em geladeira por 24 e 48 horas sem a substituição prévia do plasma (estocagem do sangue integral). Os autores justificam essa variação de positividade como sendo causada pela ação lítica de imunoglobulinas presentes no plasma do paciente ou devido ao potencial macrofágico existente nos linfócitos do sangue. Isto endossa a nossa discussão anterior com relação aos fatores contidos no sangue que agiriam de forma negativa sobre o parasita.

LUZ *et alii* (1994) utilizaram o número de tubos positivos em cada hemocultura como parâmetro para medir a parasitemia dos indivíduos submetidos à hemocultura, assim como fizeram CERISOLA *et alii* (1974), CASTRO *et alii* (1983) e PEREIRA *et alii* (1989), só que empregando a relação entre, respectivamente, o número de caixas ou em *pool* ou individual de ninfas positivas no total de examinadas. Em relação aos 6 tubos semeados em cada exame (teste), LUZ *et alii* (1994) verificaram que: 59% (31/52) dos indivíduos investigados apresentavam entre 1 a 2 tubos positivos (baixa parasitemia); outros 16% (8/52), 3 tubos positivos (média parasitemia) e os 25% (13/52) restantes, de 4 a 6 tubos positivos (alta parasitemia); somando-se estes 3 percentuais comprova-se que todos os indivíduos foram positivos, porém isto não foi relatado pelos autores. Estes dados diferem dos apresentados por

MORA (1996) que encontrou 18,8% (16/85), 10,6% (9/85), 10,6% (9,85) e 60% (51/85) com respectivamente baixa (1 tubo +), média (2 tubos +), alta (de 3 a 5 tubos +) e nenhuma parasitemia comprovada. Para este tipo de aferição, deve-se tomar o cuidado de distribuir igualmente, entre os tubos de meio destinados à hemocultura, o sangue coletado e processado; caso contrário, poderá ocorrer erro de interpretação, pois os tubos, que receberam mais e menos sangue, terão maior e menor chance de serem positivos. Apesar de não termos classificado os pacientes segundo os critérios de parasitemia dos autores anteriores, nós podemos supor que a maioria deles deviam exibir um baixo número de parasitas circulantes no tecido sangüíneo no momento da coleta do sangue, uma vez que mais da metade dos indivíduos positivos apresentaram apenas um tubo com parasita (65,4%), além do fato de a maior parte dos pacientes submetidos à hemocultura não possuir nenhum tubo positivo (74%).

Com relação à parte do sangue que foi semeada, não existiu nenhuma diferença de positividade entre o tubo inoculado com a camada leucocitária (*buffy coat*) dos outros quatro que receberam a papa de hemáceas, ao contrário de LUZ *et alii* (1994 b) e MORA (1996), que comprovaram maior número de tubos denominados n° 01 (*buffy coat*) positivos.

O tempo prolongado de cultivo, no nosso trabalho, foi representativo, uma vez que 26,9%, dos 26 casos positivos, tiveram sua positividade comprovada na leitura entre 90 e 120 dias. Percentagens menores foram relatadas por LUZ *et alii* (1994) e MORA (1996), que conseguiram aumentar a taxa de positividade em 18% e 9% após os 60 dias, respectivamente. Apenas FERNANDES *et alii* (1995) é que precisaram de um período mais longo de incubação para encontrar positividade na maioria dos hemocultivos; mais da metade dos indivíduos (56,2%) foi detectada positiva entre 90 e 120 dias. Também MINTER-GOEDBLOED (1978) aumentaram o tempo de observação dos tubos por até 6 meses, o que tornou possível comprovar 5 positivos, do total de 7 pacientes crônicos, pela hemocultura: 3, entre 70 a 90 dias e 2, após 120 dias.

Assim como MORA (1996), na nossa investigação a pesquisa de parasita no sedimento obtido após centrifugação, realizada aos 120 dias dos tubos que se mantiveram negativos, não acrescentou um caso positivo. Ao contrário de MOURÃO & MELLO (1975), que acharam 6 sedimentos positivos nos tubos centrifugados. Nesse estudo, a última leitura ocorreu aos 60 dias, período curto de incubação para algumas cepas que apresentam crescimento lento, sendo necessária, para identificação, a concentração de material semeado.

A importância de emprego conjunto da hemocultura com o xenodiagnóstico no aumento da sensibilidade de detecção do *T.cruzi* confirmou-se através dos nossos resultados. Isoladamente, o xenodiagnóstico e a hemocultura foram capazes de comprovar

respectivamente: 35,6% e 25,7% de pacientes com *T. cruzi*. A união dos dois permitiu que mais 6 pacientes fossem diagnosticados parasitologicamente, aumentando para 42%. Esta associação foi enfatizada por CHIARI & BRENER (1966) ao conseguirem aumentar a maior positividade de 31,4%, alcançada pelo xenodiagnóstico, para 42,8% com a introdução do resultado obtido através da hemocultura (25,7%). Também confirmada por PIFANO (1973), ao empregar o xenodiagnóstico e a hemocultura para detectar o parasita em 219 pacientes com sorologia positiva na Venezuela, demonstrou que a hemocultura e o xenodiagnóstico, separadamente, foram capazes de detectar; respectivamente, 110 (50,22%) e 57 (26,02%) casos e a associação de ambos possibilitou comprovar tripanossomas no sangue de 128 (58,44%); destes, 2 casos eram por *T. rangeli*. Resultados semelhantes são encontrados nas publicações de BASSO & MORRETTI (1984), BRONFEN *et alii* (1989), que conseguiram taxas de 65% e 49,2% com o uso conjunto dos dois métodos parasitológicos, sendo o resultado individual de xenodiagnóstico e da hemocultura respectivamente: 48% e 55% (primeira publicação); 42,4% e 24,1% (segunda publicação). Nos relatos de CHIARI & BRENER, 1966; PIFANO, 1973; BRONFEN *et alii*, 1989 e no nosso, o xenodiagnóstico foi superior à hemocultura, o que não deixa de ser um indicativo da dificuldade de adaptação da população de parasitas circulantes ao meio de cultivo, uma vez que a chance de captar *T. cruzi* no volume de sangue coletado para a hemocultura foi muito maior que no ingerido pelas ninfas do xenodiagnóstico.

Nesta década, os resultados promissores obtidos com a utilização do método da PCR na detecção do *T. cruzi* em um número expressivo de amostras biológicas vieram firmar esta nova linha de diagnóstico na detecção da infecção chagásica (AVILA *et alii*, 1993; WINCKER *et alii*, 1994 a; WINCKER *et alii*, 1994 b; BRITTO *et alii*, 1995 a; BRITTO *et alii*, 1995 b; BRENIÈRE *et alii*, 1995). Os protocolos desenvolvidos até o momento tiveram como objetivo a amplificação de uma seqüência alvo altamente repetitiva e específica do agente etiológico; em alguns deles introduziram-se modificações que tornaram determinadas etapas do procedimento técnico mais simplificadas (AVILA *et alii*, 1991; BRITTO *et alii*, 1993). Vários alvos têm sido explorados, tais como: uma seqüência conservada de 195 pb do DNA nuclear (MOZER *et alii*, 1989); seqüências conservadas e variáveis dos minicírculos do kDNA (STURM *et alii*, 1989); uma seqüência satélite de 1025 pb (REQUENA *et alii*, 1992); genes de mini-exon (MURTHY *et alii*, 1992); um domínio divergente do RNA ribossômico 24S α (SOUTO & ZINGALES, 1993); seqüência SRE presente no espaçador intergênico ribossômico (GONZALES *et alii*, 1994).

Optando por um dos protocolos mais simplificados, averiguamos a aplicabilidade e reprodutibilidade da PCR na detecção do *T. cruzi* em um número representativo de indivíduos residentes em uma área endêmica da doença de Chagas; comparativamente realizamos simultaneamente dois métodos parasitológicos clássicos. Tomamos o cuidado básico de coletar o sangue para ser processado pela técnica de PCR e de hemocultura no mesmo momento em que as ninfas do xenodiagnóstico foram aplicadas. Seguindo esta conduta, nós conseguimos detectar produto amplificado em 60 (59,4%) amostras de sangue, das 101 coletadas com guanidina-EDTA, do grupo de indivíduos que tiveram a reação sorológica de IFI positiva no eluato e no plasma. Um dado interessante é que, entre essas 60 amostras, estavam aquelas procedentes de 2 dos 4 indivíduos em que a ELISA havia sido negativa. Casos como esses foram também relatados por AVILA *et alii* (1993), WINCKER *et alii* (1994 a, b) e BRITTO *et alii* (1995 a, b), que presenciaram DNA de *T. cruzi*, através do PCR, em amostras de sangue de certos pacientes cuja sorologia mostrou-se negativa ou duvidosa. Cada um desses autores comprovou respectivamente 3, 4, 2, 3 e 1 pacientes que se enquadraram nessa situação. Alguns desses casos tinham forma clínica característica de Chagas ou parasitológico positivo, denotando assim que a positividade não se deveu à contaminação da PCR, até porque nos protocolos empregados foram tomados os cuidados necessários para que isso não ocorresse, além da inclusão de amostras comprovadamente negativas que serviram para controlar a presença de DNA exógenos.

Um dado importante no que se refere aos pacientes PCR negativos é que, nesse grupo de indivíduos, 13 apresentavam problemas cardíacos e 2 digestivos, alterações estas sugestivas da patologia chagásica. O que veio a confirmar a presença de sorologia positiva para *T. cruzi* neste grupo. Com relação ao pequeno grupo de indivíduos sorologicamente negativos, eles apenas entraram como grupo controle, não merecendo por isso uma discussão maior.

A PCR, ao comprovar 59,4% de indivíduos com parasita, demonstrou sua maior sensibilidade em relação ao xenodiagnóstico e a hemocultura, uma vez que estes, individualmente ou conjuntamente, não superaram o índice de 42%. Entretanto nossos valores percentuais, referentes à PCR, foram inferiores aos de AVILA *et alii* (1993), WINCKER *et alii* (1994 a, b) e BRITTO *et alii* (1995 a), que acharam em pacientes com sorologia reagente, respectivamente: 100% (91/91); 96,5% (93/96); 93% (26/28) e 90% (55/61) de positividade com a PCR. Somente conseguimos superar os índices de BRITTO *et alii* (1995 b), que obtiveram, empregando o ensaio de amplificação, uma positividade de apenas 45%. Porém um dado foi consenso entre a nossa investigação e os trabalhos anteriores, o da superioridade da

PCR sobre o xenodiagnóstico; como também em relação a outros métodos parasitológicos, tais como a hemocultura (conforme demonstramos) e o teste de "buffy coat" (WINCKER *et alii*, 1994 b).

O número expressivo de indivíduos PCR negativa com sorologia positiva e a presença, dentre estes, de 5 casos positivos através da hemocultura ou do xenodiagnóstico, nos conduziu a uma avaliação mais detalhada desse grupo composto de 51 indivíduos. Inicialmente verificamos se a negatividade dos 5 casos poderia ser atribuída a uma variação na seqüência de DNA que serviu de molde para a amplificação. Para este fim, resolvemos submeter o DNA extraído da população de *T. cruzi* isolada de 4 destes 5 casos ao ensaio da PCR. A revelação da reação mostrou um produto de 330 pb de todas as 4 populações, o que nos conduziu a uma outra direção, que foi verificar a existência de inibidores no lisado de sangue + guanidina-EDTA (GE), não apenas nessas 5 amostras de sangue mais nas outras 46 restantes que se mantiveram negativas. Realizamos então a amplificação do gen da β -globina humana; a revelação da reação mostrou um produto 110 pb procedente de todas as 51 amostras, denotando com isso não haver inibidores neste material. O fenômeno de negatificação da PCR, devido a inibidores existentes no sangue humano, foi aventado por DIAZ *et alii* (1992) após efetuarem a PCR de uma mistura de DNA de *T. cruzi* mais DNA total de sangue humano e não visualizarem o produto resultante dessa amplificação. Ainda nesse trabalho, os autores afirmaram não ter conseguido detectar DNA de *T. cruzi* no sangue de 15 camundongos, na fase crônica da infecção, empregando o método de PCR, apesar da comprovação de DNA do parasita no músculo e no coração de alguns desses animais. No experimento, nenhum método direto para comprovação do parasita foi praticado paralelamente e nem a inclusão de controles positivos.

A hipótese de estar havendo algum tipo de problema com os reagentes de amplificação, que justificasse a ausência de banda no gel das 51 amostras, foi descartada desde o início, uma vez que processamos amostras comprovadamente positivas em conjunto com as testadas. Para maior controle utilizamos dois controles positivos com intensidade diferente de bandas.

Casos parasitologicamente positivos e PCR negativa não foram reportados por outros autores nas publicações em que se faz uso de protocolo semelhante ao nosso (AVILA *et alii*, 1993; WINCKER *et alii*, 1994 a, b; BRITTO *et alii*, 1995 a, b), faz-se exceção à investigação de WINCKER *et alii* (submetido a publicação, 1996) que detectaram *T. cruzi*, através do método de *buffy coat*, em uma criança que apresentou PCR negativa. BRENIÈRE *et alii* (1995), empregando um protocolo diferente, também não obtiveram sucesso com o

método de PCR na comprovação de *T. cruzi* em 22 amostras de fezes coletadas da espécie *T. infestans* que, segundo o exame parasitológico direto, estavam infectados com o parasita. Os autores sugeriram que isto deveu-se à presença de inibidores nas fezes dos exemplares. Mesmo levantando este argumento, BRENIÈRE *et alii* (1995) conseguiram amplificar 0,2 pg de DNA de *T. cruzi* que havia sido adicionado à amostra de fezes, obtidas de triatomíneos criados em laboratórios, em um segundo experimento de reconstituição. Por outro lado, a PCR foi positiva em somente 30% das amostras artificialmente infectadas, tanto com 10fg como com 100 fg de DNA. Isso conduziu os autores a concluir que o método de PCR pode ser capaz de detectar um único parasita, uma vez que uma célula contém aproximadamente 150 - 200 fg de DNA. Um outro dado importante refere-se ao fato que nenhum dos exemplares das outras três espécies vetoras investigadas teve a positividade comprovada pelo método parasitológico direto; em contrapartida a PCR detectou o parasita em alguns deles. Nós acreditamos que essa variação de sensibilidade entre o procedimento parasitológico clássico e o molecular, encontrada por BRENIÈRE *et alii* (1995), se deva, em parte, ao fato de não se ter examinado todo o conteúdo intestinal e sim apenas as fezes, visto que nem sempre os parasitas são eliminados de forma regular nas dejeções dos vetores.

Após toda análise proferida anteriormente, nós continuávamos sem uma explicação que justificasse a baixa sensibilidade alcançada, no grupo de 101 indivíduos, empregando o método de PCR, quando na literatura existiam relatos de taxas de positividade beirando os 100%. Resolvemos direcionar nossa análise para um outro ponto que nos pareceu lógico e simples. Partindo do princípio que o DNA que serve de molde (*template*) procede de um parasita íntegro, que estaria no sangue circulante do hospedeiro ou no conteúdo intestinal do vetor, nós poderíamos deduzir que a ausência de um único parasita no volume de 5 ml de sangue que coletamos seria a explicação para não termos conseguido obter produto amplificado de 51 amostras de sangue. Isso nos conduziu a afirmar que o volume de sangue coletado foi insuficiente para a “captura” de um único parasita; até porque a sensibilidade do diagnóstico através de PCR é tão alta que torna possível comprovar 1% do kDNA existente em um único parasita, além de possibilitar a detecção de apenas 1 parasita em 20 ml de sangue total (STURM *et alii*, 1989; AVILA *et alii*, 1991 e 1993). Dentro dessa linha de raciocínio, poderíamos considerar que a detecção da infecção chagásica pelo método de PCR estaria à mercê da parasitemia do indivíduo (número de parasitas vivos na corrente sanguínea) assim como o xenodiagnóstico e a hemocultura; apresentando, no entanto, a vantagem de independer da susceptibilidade das diferentes populações de *T. cruzi*. Conseqüentemente, o outro fator limitante seria o volume de sangue utilizado, já que quanto maior o volume coletado mais

chance existiria de "capturarmos" um parasita. Neste caso, a sugestão, de RUSSOMANDO *et alii* (1992), de se utilizar o plasma deveria ser revista, pois haveria menos chance de encontrarmos parasita nessa fração do que no sangue total. Citaremos, a seguir, alguns dados existentes na literatura que vêm reforçar a nossa idéia. A menor taxa de positividade da PCR que encontramos relatada, 45%, ocorreu em uma investigação onde se coletou 5 ml de sangue de cada um dos pacientes crônicos que apresentava a característica de ter baixa parasitemia, já que o xenodiagnóstico só positivou em cerca de 13% dos pacientes (BRITTO *et alii*, 1995 b). Em outro estudo, os autores, ao acompanharem pacientes crônicos antes do tratamento e após ele com uma droga anti-*T.cruzi*, verificaram um percentual de detecção, através da PCR, de 90,1% (antes do tratamento) e 28,1% (após o tratamento), cuja positividade do xenodiagnóstico correspondeu, respectivamente, a 43% e a 10,5%; nesse protocolo da PCR empregou-se 10 ml de sangue em ambas as etapas do acompanhamento (BRITTO *et alii*, 1995 a). Existe também um dado em nosso estudo que endossa essa idéia e refere-se ao fato que nos 5 pacientes, cujo parasitológico foi positivo e a PCR negativa, o xenodiagnóstico e a hemocultura terem apresentado apenas 1 a 2 de triatomíneos positivos ou 1 tubo de cultura positivo, indicando de certa forma o baixo número de parasitas circulantes nesses indivíduos. O quarto e último estudo, que parece reforçar a importância da parasitemia, foi realizado em crianças residentes em uma área de transmissão ativa. Nele os investigadores, mesmo coletando 5 ml de sangue, conseguiram uma alta taxa de detecção pela PCR; o que é claramente justificada pela alta parasitemia encontrada nas faixas etárias inferiores e pelo fato da possível presença de casos agudos nessa casuística. Ambas as características compensariam o menor volume de sangue processado (BRENIÈRE *et alii*, 1995).

Na tentativa de achar algum outro indicativo que reforçasse a nossa hipótese, procuramos correlacionar alguns dos nossos dados; porém, não obtivemos sucesso, ficando por isso algumas perguntas sem respostas com relação ao método da PCR:

1^a - Caso o volume de sangue tenha importância na sensibilidade da PCR, principalmente nas populações de baixa parasitemia, qual a quantidade ideal para se obter o melhor resultado ?

2^a - Seria possível amplificar também o DNA resultante dos restos celulares dos parasitas destruídos pelo organismo hospedeiro ? Caso a resposta seja sim, quanto tempo esse DNA permaneceria sem sofrer degradação na circulação e na célula do hospedeiro ?

Finalmente, não poderíamos deixar de abordar a praticidade do método. Independente dos melhores resultados obtidos pela PCR, este procedimento mostrou uma grande vantagem sobre os dois métodos parasitológicos na primeira fase de investigação, que

ocorreu no campo, pois apresentou-se mais simples, tanto em relação à menor quantidade de material que requereu para a coleta do sangue destinado a ser processado pela técnica, conseqüentemente menor volume transportado, como também pela simples conservação, em temperatura ambiente, do sangue até o momento de retorno ao Rio de Janeiro, onde se processou a amostra. Essa qualidade do método é um ponto importante nos levantamentos efetuados em áreas endêmicas, onde os recursos locais disponíveis são precários. Inferior em praticidade, no que se refere a essa fase, segue-se o método de xenodiagnóstico, ficando a hemocultura como procedimento mais trabalhoso. Porém, se analisarmos as etapas seguintes da PCR, esse perfil de simplicidade não se repete. Foi necessária uma infra-estrutura laboratorial maior (a nível de equipamentos) e mais sofisticada em comparação à do xenodiagnóstico e à da hemocultura, além de exigir, pelo menos, dois espaços físicos totalmente separados para as etapas de extração da amostra e de revelação do produto amplificado. Aliado a isso, talvez uma das maiores desvantagens ou problema do método de PCR para diagnóstico de agentes infecciosos seja a contaminação das amostras com DNA exógeno, resultando em casos falso positivos (KITCHIN & BOOTMAN, 1993). No entanto, a contaminação quase não ocorreu durante todo o processamento das 121 amostras; a qual foi identificada pela visualização de bandas no controle da reação e/ou nos controles negativos. Quando isso aconteceu (em cerca de 5 vezes), nós repetimos a etapa de amplificação ou extração de toda série que havia sido processada em conjunto. Essa situação indesejada foi controlada executando-se procedimentos laboratoriais básicos, conforme relatamos inicialmente em "Materiais e Métodos" (RYS & PERSING, 1993). Não abordaremos o problema de especificidade, levantado por alguns autores, uma vez que isso só ocorreria se na região endêmica investigada houvesse também a espécie *T. rangeli* (VALLEJO *et alii*, 1994; MACEDO *et alii*, 1995). Também evitaremos comentar o custo operacional dos procedimentos técnicos, porque não levantamos os dados necessários para tal análise.

Com o que foi exposto e investigado, nós concluímos que o método de diagnóstico de detecção do *T. cruzi* através da PCR mostrou-se mais uma vez promissor e mais sensível que os métodos parasitológicos clássicos de xenodiagnósticos e de hemocultura.

7. CONCLUSÕES

- A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) mostrou-se mais sensível que os métodos do xenodiagnóstico e da hemocultura na detecção do *T. cruzi*, uma vez que comprovou maior percentual de indivíduos com parasita.

- Dos dois métodos parasitológicos clássicos empregados nesta investigação, o xenodiagnóstico foi capaz de comprovar a infecção em um número maior de casos que a hemocultura.

- Nos xenodiagnósticos em que foram aplicadas duas espécies de triatomíneos, o *P. megistus* demonstrou ser mais susceptível à população de parasitas circulantes nos indivíduos submetidos ao exame do que o *T. infestans*.

- Ao correlacionarmos a quantidade de sangue ingerida pelo *pool* de exemplares de triatomíneos aplicados e a positividade do xenodiagnóstico, não encontramos associação estatisticamente significativa.

- A aplicação conjunta do xenodiagnóstico com a hemocultura possibilitou que se isolasse parasita de um número maior de indivíduos, do que se apenas um dos métodos houvesse sido utilizado. Entretanto, a detecção de *T. cruzi* através da hemocultura foi mais tardia do que através do xenodiagnóstico.

- Constatamos que, independente do grupo etário e do sexo do indivíduo, os maiores índices de positividade foram sempre alcançados pelo método da PCR; a seguir pelo xenodiagnóstico e os mais baixos pela hemocultura

- A hemocultura mostrou-se menos prática para ser utilizada nos trabalhos realizados no campo, uma vez que o processamento do sangue no próprio local de coleta requereu uma estrutura laboratorial mínima e um volume de material expressivo a ser transportado para a área endêmica.

- Acreditamos que a menor positividade da PCR observada no nosso trabalho, em relação a de outros autores, se deva à menor quantidade de sangue (5 ml) por nós coletada.

- A única explicação que encontramos para justificar o baixo percentual de pacientes positivos obtido com a hemocultura em relação ao relatado por LUZ *et alii* (1994) tenha sido o fato de não termos processado o sangue imediatamente após a coleta.

8. SUMMARY

The sensitivities for Chagas disease diagnosis of haemoculture, xenodiagnosis, and polymerase chain reaction (PCR) amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast deoxyribonucleic acid (DNA) were compared for 101 patients living in an endemic region of north-eastern Brazil who were serologically positive for *T. cruzi*. The three methods all together could detect *T. cruzi* in 65 patients (64,3%). PCR gave 60 positive results (59,4%), while a haemoculture was positive in 26 cases (25,7%) and xenodiagnosis in 36 (35,6%). Four xenodiagnosis-positive but PCR-negative patients were examined in detail. The discrepancies were not due to inhibition of the PCR reactions, as the samples were used successfully to amplify a human β -globin sequence. Nor were they due to a variation in kinetoplast DNA sequences, as the kinetoplast DNA of the parasite strains isolated from these patients after xenodiagnosis gave rise to the expected product when amplified by the PCR. We concluded that no parasite was present in the 5 ml of blood used for PCR, while probably a single *T. cruzi* cell was present in the blood volume ingested by the insects during xenodiagnosis (about 3 ml). This suggests that the total blood quantity collected for the PCR may be important with patients with low parasitaemia. Finally, in our experience, PCR-based amplification of *T. cruzi* kinetoplast DNA was more sensible than xenodiagnosis and this more than haemoculture for the diagnosis of chronic Chagas infection. That future improvements of this PCR method may focus on determining the optimal blood volume to be collected.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, R. D., FERNANDES, L. R., FUNAYAMA, G. K., FERRIOLLI, F., SIQUEIRA, A. F. Hemoculturas Seriadas com o Meio de Warren em Pacientes com Reação de Guerreiro Machado Positiva. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.14, p.1-5, 1972.
- ALMEIDA, S. P., MILES, M. A., MARSDEN, P. D. Verificação da Susceptibilidade à Infecção por *Trypanosoma cruzi*, dos Estágios Evolutivos de *Rhodnius Neglectus*. Rev. Brasil. Biol., v.33, p.43-52, 1973.
- ALVARENGA, N. J., BRENER, Z. Development of *Trypanosoma cruzi* in the Vector in the Absence of Blood. Acta Tropica, v.35, p.315-317, 1978.
- ALVARENGA, N. J., BRONFEN, E. Interação do *Trypanosoma cruzi* com Diferentes Vetores: Uso para o Xenodiagnóstico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.17, p.145-149, 1984.
- AMATO NETO, V., MATSUBARA, L., LANURA, P. N. B. Avaliação do Sistema "Quantitative Buffy Coat" (QBC) no Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: Estudo em Modelo Experimental Murino. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.29, p.59-61, 1996.
- ARAÚJO, F. G. Perspectives for Confirmatory Tests. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.219-223.
- AVILA, H. A., PEREIRA, J. B., THIEMANN, O., PAIVA, E., DEGRAVE, W., MOREL, C. M., SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in Blood Specimens of Chronic Chagasic Patients by Polymerase Chain Reaction Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA: Comparison with Serology and Xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol., v.31, p.2421-2426, 1993.
- AVILA, H. A., SIGMAN, D. S., COHEN, L. M., MILLIKAN, R. C., SIMPSON, L. Polymerase Chain Reaction Amplification of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast Minicircle DNA Isolated from whole Blood Lysates: Diagnosis of Chronic Chagas' Disease. Mol. Biochem. Parasitol., v.48, p.211-222, 1991.
- BAHIA, M. T. Comportamento Biológico de Cepas de *Trypanosoma cruzi* no Invertebrado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1985. 131p. (Dissertação, Mestrado em Parasitologia).
- BARBOSA, W., CZEREWUTA, A. C., OLIVEIRA, R. L. Tentativa de Isolamento Primário de *T. cruzi* de Pacientes Crônicos de Doença de Chagas por Hemocultura - Agentes Bloqueadores. Rev. Pat. Trop., v.12, p.155-163, 1983.
- BARKER JR., R. H. DNA Probe Diagnosis of Parasitic Infections. Exp. Parasitol., v.70, p.494-499, 1990.

- BARRETO, A. C., MARSDEN, P. D., CUBA-CUBA, C., ALVARENGA, N. J. Estudo Preliminar sobre o Emprego de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1984) (Triatominae) na Técnica do Xenodiagnóstico em Forma Crônica da Doença de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.20, p.183-189, 1978.
- BASSO, B., MORETTI, E. R. A. Detección del *Trypanosoma cruzi* por Hemocultivo en Pacientes con Enfermedad de Chagas Crónica. Medicina (Buenos Aires), v.44, p.41-47, 1984.
- BENTO, D. N. C. Estudo Comparado do Xenodiagnóstico com *Triatoma brasiliensis* e *Triatoma infestans*, em Chagásicos Crônicos de uma Área Endêmica do Estado do Piauí (Oitis). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1978. 100p. (Dissertação, Mestrado em Parasitologia).
- BEROLDINGEN, C. H., BLAKE, E. T., HIGUCHI, R. SENSABAUGH, G. F., ERLICH, H. Applications of PCR to the Analysis of Biological Evidence. In: ERLICH, H. A. (Ed.). PCR Technology; Principles and Applications for DNA Amplification. New York: M. Stocton Press, 1989, p. 209-223.
- BIRCH, D. E., KOLMODIN, L., LAIRD, W. J., MCKINNEY, N., WONG, J., YOUNG, K. K. Y., ZANGENBERG, G. A., ZOCCOLI, M. A. Simplified Hot Start PCR. Nature, v.381, p.445-446, 1996.
- BORZONE, R. A. El Ojo Almendrado y el Xenodiagnostico Artificial en la Investigacion de la Enfermedad de Chagas. Arch. Sec. Sal. Publ., v.5, p.151-153, 1949.
- BRASILEIRO FILHO G., PENA, S. D. J. Molecular Biological Techniques for the Diagnosis of Infections Diseases. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.25, p.59-71, 1992.
- BRENIÈRE, S. F., BOSSENO, M. F., REVOLLO, S., RIVERA, M. T., CARLIER, Y., TIBAYRENC, M. Direct Identification of *Trypanosoma cruzi* Natural Clones in Vectors and Mammalian Hosts by Polymerase Chain Reaction Amplification. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.46, p.335-341, 1992.
- BRENIÈRE, S. F., BOSSENO, M. F., TELLERIA, J., CARRASCO, R., VARGAS, F., YAKSIC, N., NOIREAU, F. Field Application of Polymerase Chain Reaction Diagnosis and Strain Typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian Triatomines. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.53, p.179-184, 1995.
- BRITTO, C., CARDOSO, M. A., RAVEL, C., SANTORO, A., BORGES-PEREIRA, J., COURA, J. R., MOREL, C. M., WINCKER, P. *Trypanosoma cruzi*: Parasite Detection and Strain Discrimination in Chronic Chagasic Patients from Northeastern Brazil Using PCR Amplification of Kinetoplast DNA and Nonradioactive Hybridization. Exp. Parasitol., v.81, p.462-471, 1995b.
- BRITTO, C., CARDOSO, M. A., MONTEIRO-VANNI, C. M., HASSLOCHER-MORENO, A., XAVIER, S. S., OELEMANN, W., SANTORO, A., PIRMEZ, C., MOREL, C. M., WINCKER, P. Polymerase Chain Reaction Detection of *Trypanosoma cruzi* in Human Blood samples as a Tool for Diagnosis and Treatment Evaluation. Parasitology, v.110, p.241-247, 1995a.

- BRITTO, C., CARDOSO, M. A., WINCKER, P., MOREL, C. M. A Simple Protocol for the Physical Cleavage of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA Present in Blood Samples and Its Use in Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Diagnosis of Chronic Chagas Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.88, p.171-172, 1993.
- BRONFEN, E., ALVARENGA, N. J. O Xenodiagnóstico e os Critérios para Avaliar o Nível de Parasitemia do Paciente Chagásico Crônico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.24, p.37-42, 1991
- BRONFEN, E., DIAS, J. C. P., GOUVEIA, S. C. Infecção Experimental de *Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus* pela Cepa Y do *Trypanosoma cruzi* (Silva e Nussenzweig, 1953). Rev. Pat. Trop., v.13, p.1-7, 1984.
- BRONFEN, E., ROCHA, F. S. A., MACHADO, G. B. N., PERILLO, M. M., ROMANHA, A. J., CHIARI, E. Isolamento de Amostras do *Trypanosoma cruzi* por Xenodiagnóstico e Hemocultura de Pacientes na Fase Crônica da Doença de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.84, p.237-240, 1989.
- BRUMPT, E. O Xenodiagnostico. Aplicação ao Diagnostico de Algumas Infecções Parasitarias e em Particular á Trypanosomose de Chagas. An. Paul. Med. Cirug., v.3, p.97-102, 1914.
- CAMARGO, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.6, p.93-100, 1964.
- CAMARGO, M. E. An Appraisal of Chagas Disease Serodiagnosis. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.) Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.165-178.
- CAMARGO, M. E. Apreciação das Técnicas Sorológicas Atuais para o Diagnóstico da Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v. 25, (Suppl. III): p.10-11, 1992.
- CAMARGO, M. E. Fluorescent Antibody Test for the Serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical Modification Employing Preserved Culture Forms of *Trypanosoma cruzi* in a Slide Test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.8, p.227-234, 1966.
- CAMARGO, M. E., AMATO-NETO, V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM Antibodies as Serological Evidence of Recent Infection. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.16, p.200-202, 1974.
- CAMARGO, M. E., REBONATO, C. Cross-Reactivity in Fluorescence Tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* Antibodies. A Simple Inhibition Procedure to Ensure Specific Results. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.18, p.500-505, 1969.
- CAMARGO, M. E., SHIMIZU, S. H. Metodologia Sorológica na Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Goiana Med., v.20, p.47-65, 1974.

- CAMARGO, M. E., TAKEDA, G. K. F. Diagnóstico de Laboratório. In: BRENER, Z., ANDRADE, Z. (Ed.) Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.175-198.
- CAMPOS, R., AMATO NETO, V., MATSUBARA, L., MOREIRA, A. A. B., PINTO, P. L. S. Estudos sobre o Xenodiagnóstico *in vitro*. I. Escolha de Anticoagulante e de Membrana. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo, v.43, p.101-103, 1988.
- CANÇADO, J. R., MARRA, U. D., MOURÃO, O. G., ALVARES, J. M., OLIVEIRA, J. P. M., MACHADO, J. R., SALGADO, A. A. Bases para a Avaliação do Tratamento Específico da Doença de Chagas Humana Segundo a Parasitemia. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.7, p.155-166, 1973.
- CASTRO, C. N. Influência da Parasitemia no Quadro Clínico da Doença de Chagas. Rev. Pat. Trop., v.9, p.73-136, 1980.
- CASTRO, C. N., ALVES, M. T., MACEDO, V. O. Importância da Repetição do Xenodiagnóstico para Avaliação da Parasitemia na Fase Crônica da Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.16, p.98-103, 1983.
- CEDILLOS, R. A., TORREALBA, J. W., TONN, R. J., MOSCA, W., ORTEGÓN, A. El Xenodiagnostico Artificial en la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panam., v.93, p.240-248, 1982.
- CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R. W., DEL PRADO, C. E. Rendimiento del Xenodiagnóstico en la Infección Chagásica Crónica Humana Utilizando Ninfas de Diferentes Especies de Triatomíneos. Bol. Chil. Parasitol., v.26, p.57-58, 1971.
- CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R., DEL PRADO, C. E. Sensibilidad del Xenodiagnostico en Infeccion Chagasica Cronica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.6, p.364-365, 1972.
- CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R. W., SEGURA, E. L., DEL PRADO, C. E., ALVAREZ, M., MARTINI, G. J. W. El Xenodiagnóstico. Buenos Aires: Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben", 1974. 111p. (Monografía).
- CHAGAS, C. Nova Tripanozomiaze Humana. Estudos sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo do *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, Agente Etiológico de Nova Entidade Morbida do Homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.1, p.1-62, 1909. Reimpresso.
- CHIARI, E. Parasitological Diagnosis. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.) Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.153-164.
- CHIARI, E., BRENER, Z. Contribuição ao Diagnóstico Parasitológico da Doença de Chagas na sua Fase Crônica. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.8, p.134-138, 1966.

- CHIARI, E., DIAS, J. C. P. Nota sobre uma Nova Técnica de Hemocultura para Diagnóstico Parasitológico na Doença de Chagas na Fase Crônica. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.9, p.133-136, 1975.
- CHIARI, E., DIAS, J. C. P., LANA, M., CHIARI, C. A. Hemocultures for the Parasitological Diagnosis of Human Chagas' Disease in the Chronic Phase. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, 1979, Rio de Janeiro. Anais Abstracts. Rio de Janeiro: [s.n], 1979. p.N1-N5.
- CHIARI, E., LANA, M., DIAS, J. C. P. Crescimento e Inibição do *Trypanosoma cruzi* em Hemoculturas de Pacientes na Fase Crônica da Doença de Chagas. In: 14º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL E 3º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 1978, João Pessoa. Resumo dos Temas Livres. João Pessoa: Editora Universitária da UFPb, 1978. p.40.
- CHOU, Q., RUSSELL, M. BIRCH, D. E, RAYMOND, J., BLOCH, W. Prevention of pre-PCR Mis-Priming and Primer Dimerization Improves Low-Copy-Number Amplifications. Nucleic Acids Res., v.20, p.1717-1723, 1992.
- CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO e TECNOLÓGICO (CNPq). Epidemiologia da Doença de Chagas. Objetivos e Metodologia dos Estudos Longitudinais. Relatório Técnico nº 1, 1974.
- CONTRERAS, M. DEL C., SCHENONE, H., ROJAS, A. Positividad del Xenodiagnóstico en Personas con Reacción de Hemaglutinación Indireta para Enfermedad de Chagas Positiva, de Acuerdo a los Títulos de Dicha Reacción. Bol. Chil. Parasitol., v.43, p.22-24, 1988.
- CORNEJO, A. Enfermedad de Chagas-Mazza. Xenodiagnostico - Modificacion de Borzone al Metodo de Brumpt. Semana Méd., v.56, p.181-183, 1949.
- CORREIA-LIMA, F. C. Doença de Chagas no Município de Oeiras, Piauí: Estudo Seccional nas Localidades de Colônia e Oitis. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da UFRJ, 1976. 67p. (Dissertação, Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias).
- COURA, J. R., ABREU, L. L., DUBOIS, L. E. G., CORREIA-LIMA, F., ARRUDA JÚNIOR, E., WILLCOX, H. P. F., ANUNZIATO, N., PETANA, W. Morbidade da Doença de Chagas. II. Estudos Seccionais em Quatro Áreas de Campo no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.79, p.101-124, 1984.
- COURA, J. R., ABREU, L. L., WILLCOX, H. P. F., PETANA, W. Evaluation of the Xenodiagnosis of Chronic Chagas Patients Infected Ten Years or over in an Area where Transmission has been Interrupted - Iguatama and Pains, West Minas Gerais State, Brazil, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.86, p.395-398, 1991.
- COURA, J. R., BORGES-PEREIRA, J., ALVES FILHO, F. I., CASTRO, J. A. F., CUNHA, R. V., COSTA, W., JUNQUEIRA, A. C. V. Morbidade da Doença de Chagas em Áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.29, p.197-205, 1996.

- CUBA-CUBA, C. A., ALVARENGA, N. J., BARRETO, A. C., MARSDEN, P. D., CHIARINI, C. Nuevos Estudios Comparativos entre *Dipetalogaster maximus* e *Triatoma infestans* en el Xenodiagnóstico de la Infección Chagásica Crónica Humana. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.20, p.145-151, 1978.
- CUBA, C. C., ALVARENGA, N. J., BARRETO, A. C., MARSDEN, P. D., MACEDO, V., GAMA, M. P. *Dipetalogaster maximus* (Hemiptera, Triatominae) for Xenodiagnosis of Patients with Serologically Detectable *Trypanosoma cruzi* Infection. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.73, p.524-527, 1979.
- CURA, E., WENDEL, S. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre, Washington, D.C., PAHO/HPC/HCT. 1994, 61p.
- DEAN, A. D., DEAN, J. A., COULOMBIER, D., BURTON, A. H., BRENDEN, K. A., SMITH, D. C., DICKER, R. C., SULLIVAN, K. M., FAGAN, R. F. Epi Info, version 6: A Word-Processing, Database and Statistics Program for Public Health on IBM-Compatible Microcomputers, 1994. Produced by: The Division of Surveillance and Epidemiology, Epidemiology Program Office, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, Georgia. 30.333.
- DEGRAVE, W. M. Molecular Diagnosis of Chagas Disease. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.225-236.
- DEGRAVE, W., FRAGOSO, S. P., BRITTO, C., VAN HEUVERS WYN, H., KIDANE, G. Z., CARDOSO, M. A. B., MUELLER, R. U., SIMPSON, L., MOREL, C. M. Peculiar Sequence Organization of Kinetoplast DNA Minicircles from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., v. 27, p. 63-70, 1988.
- DIAS, E. Chagas' Disease: A Comparative Study of the Susceptibility of Four Natural Vectors to the Experimental Development of *Schizotrypanum cruzi*. In: Third International Congress for Microbiology. New York, Abstracts of Communications, p.164, 1939. Report of Proceedings, p.421, 1940a apud DIAS, E. Xenodiagnosticos Seriados em Caes Infectados com Amostras Venezuelanas de *Schizotrypanum cruzi*. Brasil-Med, v.52, p.859-861, 1940c.
- DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro, 1933. 115 p. (Tese, Doutorado em Medicina)
- DIAS, E. Le Xénodiagnostic Appliqué a la Trypanosomiase Américaine. C. R. Soc. Biol. v.118, p.287-289, 1935.
- DIAS, E. Técnica do Xenodiagnostico na Molestia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.35, p.335-342, 1940 b.
- DIAS, E. Xenodiagnóstico e Algumas Verificações Epidemiológicas na Moléstia de Chagas. In: IX Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional, 1936, Mendoza. v.1, p.89-119.

- DIAS, E. Xenodiagnosticos Seriados em Caes Infectados com Amostras Venezuelanas de *Schizotrypanum cruzi*. Brasil-Med., v.52, p. 859-861, 1940c.
- DIAS, J. C. P. Control of Chagas Disease in Brazil. Parasit. Today, v.3, p.336-341, 1987.
- DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas Disease. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.49-80.
- DIAZ, C., NUSSENZWEIG, V., GONZALEZ, A. An Improved Polymerase Chain Reaction Assay to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 46, p.616-623, 1992.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G. Immunochemistry, v.8, p.871-874, 1971.
- ERLICH, H. A., GELFAND, D., SNINSKY, J. J. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. Science, v. 252, p. 1643-1651, 1991.
- FEILIJ, H., MULLER, L., CAPPA, S. M. G. Direct Micromethod for Diagnosis of Acute and Congenital Chagas' Disease. J. Clin. Microbiol., v.18, p.327-330, 1983.
- FERNANDES, A. J., DIOTAIUTI, L., AZEREDO, B. V. M., BUSEK, S. V., CHIARI, E. Viabilidade da Utilização da Hemocultura no Diagnóstico da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Amostras Coletadas em Condições de Campo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.28, (Supl. I): p.123, 1995.
- FERREIRA, A. W. Tests for Chagas Disease Serodiagnosis: A Review. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.179-193.
- FERREIRA, A. W., BELEM, Z. R., MOURA, M. E. G., CAMARGO, M. E. Aspectos da Padronização de Testes Sorológicos para Doença de Chagas: Um Teste Imunoenzimático para Triagem de Doadores de Sangue. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.33, p.123-128, 1991.
- FIFE, E. H., MUSCHEL, L. H. Fluorescent-Antibody Technic for Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v.101, p.540-543, 1959.
- FIGUERÊDO-SILVA, J., KANEDA, Y., TACHIBANA, H., FURUSHIMA, R., TATENO, S., CORREIA-LIMA, F. G., BENTO, D. N. C. Epidemiological Survey of *Trypanosoma cruzi* Infection in North-Eastern Brazil Using Different Diagnostic Methods. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.33, p.193-198, 1991.
- FLOCH, H., LAJUDIE, P. Recherches sur la Trypanosomíase Humaine Américaine en Guyane Française. *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius pictipes* Vecteurs Naturels de Choix de *S. cruzi*. Publs. Inst. Pasteur Guyane, v.117, p.1-5, 1945.

- FLORES, M. A., TREJOS A., PAREDES A. R., RAMOS A. Y. El Método de Concentración de Strout en el Diagnóstico de la Fase Aguda de la Enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol., v.21, p.38-39, 1966.
- FORATTINI, O. P., COTRIM, M. D., GALATI, E. A. B., SARZANA, S. B., CRUZ, C. F., DINTEREN, N. H. S., GOTLIEB, S. L. D. Estudo sobre a Utilização de *Rhodnius neglectus* para Xenodiagnósticos Realizados em Marsupiais (*Didelphis*). Rev. Saúde Públ. São Paulo, v.10, p.335-343, 1976.
- FRASCH, A. C. C., REYES, M. B. Diagnosis of Chagas Disease Using Recombinant DNA Technology. Parasit. Today, v.6, p.137-139, 1990.
- FREITAS, J. L. P. Contribuição para o Estudo do Diagnóstico da Moléstia de Chagas por Processos de Laboratório. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP, 1947. 160p. (Tese, Doutorado em Parasitologia).
- FREITAS, J. L. P. O Diagnóstico de Laboratório da Moléstia de Chagas. Rev. Clin. São Paulo, v.28, p.11-20, 1952.
- FREITAS, J. L. P. Observações sobre o Tempo Ótimo para Exame de Triatomídeos Empregados em Xenodiagnóstico. Folia Clin. Biol., v.16, p.180-185, 1950.
- FREITAS, J. L. P., NUSSENZWEIG, V., AMATO NETO, V., SONNTAG, R. Estudo Comparativo entre Xenodiagnósticos Praticados *in vivo* e *in vitro* em Formas Crônicas da Moléstia de Chagas. O Hospital, v.47, p. 101-110, 1955.
- FUENTE, C. LA, URJEL, R., CORDOVA, F. Estudio Comparativo entre el Examen Parasitologico Directo y la Diseccion de Triatominos para la Investigacion de *Trypanosoma cruzi*. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., v.65, (Suppl.1): p.101-102, 1985.
- FUNATSU, I. R. K. Estudo Comparativo entre o Xenodiagnóstico e a Hemocultura em Chagásicos Crônicos. Rio de Janeiro: Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO), 1990. 45p. (Monografia, Bacharelado em Ciências Biológicas).
- GALVÃO, L. M. C., CANÇADO, J. R., REZENDE, D. P., KRETTLI, A. U. Hemocultures in Chronic Chagasic Patients Using EDTA or Heparin as Anticoagulants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.83, (Suppl.I): p.49, 1988.
- GALVÃO, L. M. C., NUNES, R. M. B., CANÇADO, J. R., BRENER, Z., KRETTLI, A. U. Lytic Antibody Titre as a Means of Assessing Cure after Treatment of Chagas Disease: a 10 Years follow-up Study. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.87, p. 220-223, 1993.
- GARCIA, E. S., MACARINI, J. D., GARCIA, M. L. M., UBATUBA, F. B. Alimentação de *Rhodnius prolixus* no Laboratório. An. Acad. Brasil Ciênc., v.47, p.537-545, 1975.
- GONÇALVES, A. M., NEHME, N. S., SARAVIA, N., SEGURA, I., MOREL, C. M. Schizodeme Analysis with the Restriction Endonuclease *RSa I* Differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.86, p. 447-478, 1991.

- GONZÁLEZ, N., GALINDO, I., GUEVARA, P., NOVAK, E., SCORZA, J. V., AÑEZ, N., SILVEIRA, J. F., RAMÍREZ, J. L. Identification and Detection of *Trypanosoma cruzi* by Using a DNA Amplification Fingerprint Obtained from the Ribosomal Intergenic Spacer. J. Clin. Microbiol., v.32, p.153-158, 1994.
- GUERREIRO, C., MACHADO, A. Da Reação de Bordet e Gengou na Moléstia de Carlos Chagas como Elemento Diagnostico. Brazil Med., v.27, p.225-226, 1913.
- GUHL, F., MARINKELLE, C. J. Antibodies against *Trypanosoma cruzi* in Mice Infected with *T. rangeli*. Ann. Trop. Med. Parasitol., v.76, p.361, 1982.
- HOARE, C. A. Classification In: The Trypanosomes of Mammals, A Zoological Monograph. 1. ed. Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications LTD, 1972, p. 60-80.
- ISAC, E. Influência da Heparina e do Citrato de Sódio no Xenodiagnóstico Artificial. Rev. Pat. Trop., v.23, p.121-143, 1994.
- JANKEVICIUS, I. S., MAEJIMA, K. H., JANKEVICIUS, J. V., SANTOS, L. R., MARTINEZ, M. M., MAEDA, L. A. *Trypanosoma cruzi* Hemoculture in Blood Banks. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE DOENÇA DE CHAGAS, 1979, Rio de Janeiro. Anais Abstracts. Rio de Janeiro: [s.n], 1979. p.150.
- JONES, E. M, COLLEY, D. G., TOSTES, S., LOPES, E. R., VNENCAK-JONES, C. L., McCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA Sequence from Inflammatory Lesions in Human Chagasic Cardiomyopathy. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.48, p.348-357, 1993.
- JÖRG, M. E., BÁEZ, V. J. Parasitemia en Infectados Crónicos por *Trypanosoma cruzi*, Indeterminados y Sintomaticos, Evidenciada por Hemocultivo. CM Publicación Médica, v.6, p.71-79, 1993.
- JUNQUEIRA, A. C. V., FIGUEIREDO, A. R., COURA, J. R. Sensibilidade do Xenodiagnóstico com *P. megistus* e *T. infestans* na Fase Crônica da Doença de Chagas. Estudo Preliminar. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.84, (Suppl. II): p. 115, 1989a.
- JUNQUEIRA, A. C. V., SANTOS, L. C., CELANO, V. S., FUNATSU, I. R. K., COURA, J. R. Xenodiagnóstico Quantitativo Direto e Indireto em Pacientes Chagásicos Crônicos, Utilizando-se Duas Espécies de Triatomíneos. In: 11ª REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS. Resumo dos Temas Livres. Uberaba: (não impresso), 1995.
- JUNQUEIRA, A. C. V., VELAZQUEZ, C. R. D. B., COURA, J. R. Avaliação do Rendimento do Xenodiagnóstico com Diferentes Espécies de Triatomíneos. I. Utilização de uma Espécie Vetora Local (*P. megistus*) em Relação ao *T. infestans*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.22, (Suppl. II): p.136, 1989b.
- KITCHIN, P. A., BOOTMAN, J. S. Quality Control of the Polymerase Chain Reaction. Medical Virology, v.3, p.107-114, 1993.

- KRAUTZ, G. M., GALVÃO, L. M. C., TRAVASSOS, L. R., KRETTLI, A. U. Use of Shed Antigens from *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Assess Cure in Human Chagas' Disease after Specific Treatment. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.87, (Suppl. II): p.173, 1992.
- KRETTLI, A. U., BRENER, Z. Antigenic Variation in Bloodstream Forms of *Trypanosoma cruzi* from Different Strains. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.18, p. 134-135, 1976.
- KRETTLI, A. U., BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* Associated to Anti-Living Trypomastigote Antibodies. J. Immunol., v.128, p.2009-2112, 1982.
- LEVY, A. M. A., PEREIRA, V. L., BOAINAIN, E. Avaliação da Técnica de Lise Mediada pelo Complemento em Pacientes Chagásicos Crônicos Tratados com Drogas Tripanosomicidas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.30, p.32-39, 1988.
- LIMA, D. F., SILVA, N. N., SANTOS, J. F. C., ZINGANO, A. G., FRÓES, O. M., CHAER, J. A. B. Resultado Parcial do Xenodiagnóstico Realizado em um Grupo de Pacientes Serologicamente Positivos para a Doença de Chagas e Internados no Hospital São Pedro (de Alienados), em Pôrto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., V.4, p.367-370, 1970.
- LITTLE, J. W., TAY, J., BIAGI-F., F. A Study on the Susceptibility of Triatomid Bugs to some Mexican Strains of *Trypanosoma cruzi*. J. Med. Ent., v.3, p.252-255, 1966.
- LUQUETTI, A. O. Megaesôfago e Anticorpos Anti-*Trypanosoma cruzi*. Rev. Goiana Med., v.33, p.1-16, 1987.
- LUZ, E., BORBA, A. M. Sobre o Tempo de Permanência do *Trypanosoma cruzi* Chagas no *Triatoma infestans* Klug. An. Fac. Med. Uni. Fed. Paraná, v.11-12, p. 147-157, 1968-1969.
- LUZ, Z. M. P., COUTINHO, M. G., CANÇADO, J. R., KRETTLI, A. U. Hemocultura: Técnica Sensível na Detecção do *Trypanosoma cruzi* em Pacientes Chagásicos na Fase Crônica da Doença de Chagas, Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.27, p. 143-148, 1994a.
- LUZ, Z. M. P., GALVÃO, L. M. C., COUTINHO, M. G., CANÇADO, J. R., KRETTLI, A. U. Changes in the Hemoculture Methodology Improve the Test Positivity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.89, (Suppl.I): p.53, 1994b.
- MACEDO, A. M., VALLEJO, G. A., CHIARI, E., GALVÃO, L. M. C., PENA, S. D. J. Hypervariable DNA Markers in Profiling Genetic Relationships between Strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.90, (Suppl. I): p.47-48, 1995.
- MAEKELT, G. A. A Modified Procedure of Xenodiagnosis for Chagas' Disease. Amer. J. Trop. Med. Hyg., v.13, p.11-15, 1964.
- MAEKELT, G. A. Un Procedimiento Modificado de Xenodiagnostico para la Enfermedad de Chagas. Archiv Venezol. Med. Trop. y Parasit. Med., v.IV, p.277-287, 1962.
- MAEKELT, G. A., ALCANIZ A., M. de P. Contribucion para el Estudio de la Parasitemia del *Schizotrypanum cruzi* en el Huesped Mamifero. Acta Cient. Venez., v.11, p.137-142, 1960.

- MAIFRINO, L. B. M., RAMOS, M. C., SCHMIDT, L., FRAGATA FILHO, A. A. Estudo Comparativo entre *T. infestans* e *T. pallidipenis* no Teste de Xenodiagnóstico Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.89, (Suppl. I): p.207, 1994.
- MARSDEN, P. D. *Dipetalogaster maxima* ou *D. maximus* Como Agente no Xenodiagnóstico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.19, p.205-207, 1986.
- MARSDEN, P. D., BARRETO, A. C., CUBA, C. C., GAMA, M. B., ACKERS, J. Improvements in Routine xenodiagnosis with First Instar *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Triatominae) Am. J. Trop. Med. Hyg., v.28, p.649-652, 1979.
- MARSDEN, P. D., MOTT, K. E., PRATA, A. The Prevalence of *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in 8 Families in an Endemic Area. Gaz. Méd. Bahia, v.69, p.65-69, 1969.
- MARTÍNEZ-SILVA, R., LÓPEZ, V. A., COLÓN, J. I., CHIRIBOGA, J. Isolation of *Trypanosoma cruzi* from Blood of Acutely and Chronically Infected Mice in Tissue Culture. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.48, p.878-884, 1969.
- MAUDLIN, I. Inheritance of Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection in *Rhodnius Prolixus*. Nature, v.262, p.214-215, 1976.
- MILES, M. A., PATTERSON, J. W., MARSDEN, P. D., MINTER, D. M. A Comparison of *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* in the Xenodiagnosis of a Chronic *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Infection in a Rhesus Monkey (*Macaca mullatta*). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.69, p.377-382, 1975.
- MINTER, D. M., MINTER-GOEDBLOED, E., FERRO-VELA, C. Quantitative Studies with First-Instar Triatomines in the Xenodiagnosis of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Experimentally and Naturally Infected Hosts. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.71, p.530-541, 1987.
- MINTER, D. M., MINTER-GOEDBLOED, E., MARSHALL, T. F. de C. Comparative Xenodiagnosis with Three Triatomine Species of Different Hosts with Natural and Experimental Chronic with *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.72, p. 84-91, 1978.
- MINTER-GOEDBLOED, E. Hemoculture Compared with Xenodiagnosis for the Detection of *T. cruzi* Infection in Man and in Animals. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NEW APPROACHES IN AMERICAN TRYPANOSOMIASIS RESEARCH, 1975, Belo Horizonte. New Approaches in American Trypanosomiasis Research; Proceedings of an International Symposium. Washington: PAHO, 1976. p.245-252. (Pan American Health Organization. Scientific Publication, 318).
- MINTER-GOEDBLOED, E. The Primary Isolation by Haemoculture of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* from Animals and from Man. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg. v.72, p.22-30, 1978.
- MINTER-GOEDBLOED, E., MINTER, D. M. Value of First-Instar Triatomines (Hemiptera; Reduviidae) In Comparative Xenodiagnosis of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Parasitol. Res., v.73, p.565-567, 1987.

- MINTER-GOEDBLOED, E., MINTER, D. M., MARSHALL, T. F. C. Quantitative Comparison between Xenodiagnosis and Haemoculture in the Detection of *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in Experimental and Natural Chronic Infections. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.72, p.217-225, 1978.
- MONCAYO, A. Chagas' Disease. UNDP WORLD BANK WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). Tropical Disease; Progress in International Research. Geneva: World Health Organization, 1993. p.67-75. (Programme Report, 11).
- MONCAYO, A., LUQUETTI, A. O. Multicentre Double Blind Study for Evaluation of *Trypanosoma cruzi* Defined Antigens as Diagnostic Reagents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.85, p.489-495, 1990.
- MORA, M. X. C. Avaliação de uma Técnica Modificada de Hemocultura para *T. cruzi*, na Forma Crônica da Doença de Chagas em uma Área Endêmica. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, 1996. 119 p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Tropical).
- MOSER, D. R., KIRCHHOFF, L. V., DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol., v.27, p.1477-1482, 1989.
- MOTT, K. E., FRANÇA, J. T. I., BARRET, T. V., HOFF, R., OLIVEIRA, T. S., SHERLOCK, I. A. Cutaneous Allergic Reactions to *Triatoma Infestans* after Xenodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.75, p.3-10, 1980.
- MOURÃO, O. G., CHIARI, E. Comprovação Parasitológica na Fase Crônica da Doença de Chagas por Hemoculturas Seriadas em Meio "LIT". Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.9, p.215-219, 1975.
- MOURÃO, O. G., MELLO, O. C. Hemoculturas para o Diagnóstico Parasitológico na Fase Crônica da Doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.9, p.183-188, 1975.
- MULLIS, K. B., FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA *in vitro* Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. Methods in Enzymol., v.155, p.335-350, 1987.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Simp. Quant. BIOL., v.51, p.263-273, 1986.
- MUNIZ, J., BORRIELLO, A. Estudo sobre a Ação Lítica de Diferentes Sôros sobre as Formas de Cultura e Sanguícolas do "*Schizotrypanum cruzi*" Rev. Brasil. Biol., v.5, p.563-576, 1945.
- MURTHY, V. K., DIBBERN, K. M., CAMPBELL, D. A. PCR Amplification of Mini-exon Genes Differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Mol. Cell. Probes, v.6, p.237-243, 1992.
- NEAL, R. A. Superiority of the Culture Technique over Xenodiagnosis for Detection of Trypanosomes in Chagas' Disease. In: Int. Cong. Tro. Med. and Mal., 1973, Atenas,

- Grécia, 1, 56 apud CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R. W., SEGURA, E. L., DEL PRADO, C. E., ALVAREZ, M., MARTINI, G. J. W. El Xenodiagnóstico. Monografía Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatała Chaben". Buenos Aires. Argentina, p.1-111, 1974.
- NEAL, R. A., MILES, R. A. The Number of Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, Required to Infect *Rhodnius prolixus*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.19, p.177-181, 1977 a.
- NEAL, R. A., MILES, R. A. The Sensitivity of Culture Methods to Detect Experimental Infections of *Trypanosoma cruzi* and Comparison with Xenodiagnosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.19, p.170-176, 1977 b.
- NEVES, D. P. Influência da Temperatura na Evolução do *Trypanosoma cruzi* em Triatomíneos. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.13, p.155-161, 1971.
- NEVES, D. P., CARVALHO, A. L. M. Comportamento do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) em Xenodiagnóstico. Rev. Pat. Trop., v.2, p.277-281, 1972.
- NICOLLE, P. Appareil pour L'alimentation Artificielle des Réduvidés Hémophages. Bull. Soc. Path. Exot., v.34, p.179-184, 1941.
- NICOLLE, P., LWOFF, M. Recherches sur la Nutrition des Réduvidés Hémophages. III- Alimentation Artificielle de *Triatoma infestans* Klug au Moyen de Sang Défibriné Hémolysé. Bull. Soc. Pathol. Exot., v.36, p.154-167, 1943.
- NICOLLE, P., LWOFF, M. Thermotropisme et Alimentation Artificielle des Réduvidés Hémophages. Paris C. R. Soc. Biol., v.138, p.164-165, 1944.
- NUSSENZWEIG, V., SONNTAG, R. Xenodiagnóstico Artificial. Novo Processo. Primeiros Resultados Positivos. Rev. Paul. Med., v.40, p.41-43, 1952.
- ORREGO, L. A., LANSETTI, J. C., BOZZINI, J. P., WYNNE DE MARTINI, G. J. Hemocultivo como Metodo de Diagnostico de la Enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires), v. 40, (Suppl.I): p.56-62, 1980
- PÄÄBO, S. Ancient DNA: Extraction, Characterization, Molecular Cloning, and Enzymatic Amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.86, p.1939-1943, 1989.
- PAOLASSO, R. W. de, BASSO, B. Hemocultivos en la Enfermedad de Chagas-Mazza Neonatal. Pren. Méd. Argent., v.66, p.594-597, 1979.
- PEREIRA, J. B. Morbidade da Doença de Chagas. Estudos Seccional e Longitudinal em Área Endêmica - Virgem da Lapa, MG. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, 1983. 131p. (Dissertação, Mestrado em Medicina Tropical).
- PEREIRA, J. B., COURA, J. R. Morbidade da Doença de Chagas em Populações Urbanas do Sertão da Paraíba. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.20, p.101-107, 1987.
- PEREIRA, J. B., JUNQUEIRA, A.C.V., SANTOS, L. C., CASTRO, A. F., ARAÚJO, I. B., COURA J. R. Xenodiagnóstico na Doença de Chagas Crônica. I - Sensibilidade de

- Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.29, p.341-347, 1996.
- PEREIRA, J. B., WILLCOX, H. P. F., MARCONDES, C. B., COURA, J. R. Parasitemia em Pacientes Chagásicos Crônicos, Avaliada pelo Índice de Triatomíneos Infectados no Xenodiagnóstico. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 22, p.39-44, 1989.
- PEREIRA, V. L., LEVY, A. M. A., BOAINAIN, E. Xenodiagnóstico, Hemocultura e Teste de Lise Mediada pelo Complemento, como Critérios de Seleção de Pacientes Chagásicos Crônicos para Quimioterapia. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.31, p.301-307, 1989.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ Species and Stage Interaction in the Feeding Behaviour of Vectors of Chagas Disease (The Importance of Determinants in Planning for Greater Efficacy and Standardization of Xenodiagnostic Procedures). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.15, p.139-150, 1973.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., CRUZ, H. N. Estudo sobre a Capacidade de Sugar de Transmissores da Doença de Chagas em todas as Fases do Ciclo Evolutivo. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.6, p.366, 1972.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., MOREIRA, C. J. C. *In Vivo* Differentiation of *Trypanosoma cruzi* - 1. Experimental Evidence of the Influence of Vector Species on Metacyclogenesis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.89, p.603-618, 1994.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., MULLER, C. A. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Hosts with Chagas' Disease. 1-Comparative Xenodiagnosis with Nine Triatomine Species of Animals with Acute Infections by *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.77, p.37-53, 1982.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., MULLER, C. A. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Hosts with Chagas' Disease. 2-Attempts to Upgrade the Reliability and the Efficacy of Xenodiagnosis in Chronic Chagas' Disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.82, p. 259-272, 1987.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., MULLER, C. A., MOREIRA, C. J. C. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Hosts with Chagas' Disease. 3-On the Interaction of Vector Species and Parasite Strain in the Reaction of Bugs to Infection by *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saúde Públ. São Paulo, v.22, p.390-400, 1988.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A., MULLER, C. A., MOREIRA, C. J. C. Studies in Search of a Suitable Experimental Insect Model for Xenodiagnosis of Hosts with Chagas' Disease. 4-The Reflection of Parasite Stock in the Responsiveness of Different Vector Species to Chronic Infection with Different *Trypanosoma cruzi* Stocks. Rev. Saúde Públ. São Paulo, v.24, p.165-177, 1990.
- PETANA, W. B. Sensitivity of the Indirect Fluorescence Test (IFI) for Chagas' Disease in Large-Scale Serologic Surveys. In: International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research, 1975, Belo Horizonte. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research; Proceedings of an International Symposium.*

- Washington: PAHO, 1976, p.289-291. (Pan American Health Organization. Scientific Publication, 318).
- PETRAY, P., BONARDELLO, N., CLARK, R., AGRANATTI, M., CORRAL, R., GRINSTEIN, S. Evaluación del Método de ELISA para Detección de Antígenos y Complejos Inmunes Circulantes de *Trypanosoma cruzi* através de un Estudio de Campo en una Zona Endémica de Argentina. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.34, p.141-147, 1992.
- PHILLIPS, N. R., BERTRAM, D. S. Laboratory Studies of *Trypanosoma cruzi* Infections. J. Med. Ent., v.4, p.168-174, 1967.
- PHILLIPS, N. R. Experimental Studies on the Quantitative Transmission of *Trypanosoma cruzi*: Aspects of the Rearing, Maintenance and Testing of Vector Material, and of the Origin and Course of Infection in the Vector. Ann. Trop. Med. Parasitol., v.54, p.397-414, 1960.
- PIFANO, C. F. El Diagnostico Parasitologico de la Enfermedad de Chagas en Fase Cronica. Estudio Comparativo entre la Gota Gruesa, el Xenodiagnóstico, el Hemocultivo y las Inoculaciones Experimentales en Animales Sensibles. Archiv. Venezol. Patol. Trop. y Parasit. Med., v.2, p.121-156, 1954.
- PIFANO, C. F. Estado Actual de las Investigaciones en Venezuela sobre una Nueva Trypanosomiasis Humana de la Region Neotropica Producida por el *Trypanosoma rangeli*. Archiv. Venezol. Patol. Trop. y Parasit. Med., v.1, p.135-152, 1949.
- PIFANO, C. F. Evaluacion de los Procedimientos de Laboratorio Empleados en el Diagnostico de la Enfermedad de Chagas. Bol. Of. Sanit. Panamer., v.49, p.563-571, 1960.
- PIFANO, C. F. La Dinamica Epidemiologica de la Enfermedad de Chagas en el Valle de los Naranjos, Estado Carabobo, Venezuela. II- La Infección Chagásica en la Población Rural del Área. Archiv. Venezol. Med. Trop. Parasitol. Med., v.5, p.31-45, 1973.
- PIFANO, C. F., MORRELL, J. R., ORTIZ, M. D. Estudio Comparativo entre el *Rohdnius prolixus* Stal, 1959 y el *Triatoma pallidipennis* (Stal, 1872) Pinto, 1927 en la Prueba Xenodiagnostica Realizada en Casos Cronicos de Enfermedad de Chagas. Arch. Venezol. Med. Trop. Parasit. Méd., v.5, p. 85-94, 1973.
- PLESS, M., JURANEK, D., KOZARSKY, P., STEURER, F., TAPIA, G., BERMUDEZ, H. The Epidemiology of Chagas' Disease in a Hyperendemic Area of Cochabamba, Bolivia: A Clinical Study Including Electrocardiography, Seroreactivity to *Trypanosoma cruzi*, Xenodiagnosis, and Domiciliary Triatomine Distribution. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.47, p.539-546, 1992.
- PRATA, A. Formas Clínicas. In: CANÇADO J. R. (Ed.). Doença de Chagas. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p.344-358.
- PRATA, A., MAYRINK, W., SODRÉ, A. G., ALMEIDA, J. O. Discrepâncias Relativas entre Resultados de Reações de Guerreiro-Machado Executadas em Tres Diferentes Laboratórios. Rev. Pat. Trop., v.4, p.35-38, 1975.

- RAMIREZ, L. P., FERREIRA, M. S., NUNES, E. V., BUGARELLI, M. K., SILVA, A. C., SARTORI, A. M. C., SHIKANAI-YASUDA, M. A., CRUZ, A. M., GUILHERME, C. S., OLIVEIRA JR, O. C., TIBAYRENC, M., TOLEZANO, J. E. Estudo sobre a Utilização do Xenodiagnóstico em Situação de Concomitância Doença de Chagas e AIDS. In: Resumos dos Temas Livres do XXXI Cong. Soc. Bras. Med. Trop., São Paulo, 1995, p.122.
- RAMOS, J. FREITAS, J. L. P., BORGES, S. Moléstia de Chagas. Estudo Clínico e Epidemiológico. Arq. Bras. Card., v.2, p111-162, 1949.
- RASSI, A., AMATO NETO, V., OLIVEIRA, R. L. Observações sobre a Hemocultura em Meio LIT, para *Trypanosoma cruzi*, Segundo Mourão & Mello (1975). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v. 23, p.57-60, 1981..
- RASSI, A., AMATO NETO, V., SIQUEIRA, A. F. Comportamento Evolutivo da Reação de Fixação do Complemento na Fase Crônica da Moléstia de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.11, p.430-435, 1969.
- RASSI, A., LUQUETTI, A. O. Therapy of Chagas Disease. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.). Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p. 237-247
- REQUENA, J. M., JIMENEZ-RUIZ, A., SOTO, M., LOPEZ, M. C., ALONSO, C. Characterization of a Highly Repeated Interspersed DNA Sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. Mol. Biochem. Parasitol., v.51, p.271-280, 1992.
- ROHWEDDER, R. W., DEL PRADO, C. E., CERISOLA, J. A., REBOSOLAN, J. B. Aportes al Método del Examen del Xenodiagnóstico Previo Licuado de Los Triatomíneos. Bol. Chil. Parasitol., v.25, p.106-110, 1970.
- ROLFS, A., SCHULLER, I., FINCKH, U., WEBER-ROLFS, I. PCR: Clinical Diagnostics and Research. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. 271p.
- ROLLO, F., SALVI, R., AMICI, A., ANCONETANI, A. Polymerase Chain Reaction Fingerprints. Nucleic Acids Res., v.15, p.9094, 1987.
- ROMAÑA, C., BRIONES, S. El Xenodiagnostico como Metodo para Diagnosticar Casos Agudos de Enfermedad de Chagas. An. Inst. Med. Reg., v.4, p.35-41, 1954.
- ROMAÑA, C., GIL, J. Xenodiagnóstico Artificial. An. Inst. Med. Regional, v.2, p.57-60, 1947.
- RUSSOMANDO, G., FIGUEREDO, A., ALMIRÓN, M., SAKAMOTO, M., MORITA, K. Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Serum. J. Clin. Microbiol., v.30, p.2864-2868, 1992.
- RUTLEDGE, L. C., WARD, R. A., GOULD, D. J. Studies on the Feeding Response of Mosquitoes to Nutritive Solutions in a New Membrane Feeder. Mosquito News, v.24, p.407-419, 1964.

- RYCKMAN, R. E. Epizootiology of *Trypanosoma cruzi* in Southwestern North America. Part V: Host Parasite Specificity Between *Trypanosoma cruzi* and Triatominae (kinetoplastida: Trypanosomidae) (Hemiptera: Triatominae). J. Med. Ent., v.2, p.96-99, 1965.
- RYS, P. N., PERSING, D. H. Preventing False Positives: Quantitative Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products. J. Clin. Microbiol., v.31, p.2356-2360, 1993.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science, v.239, p.487-491, 1988.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of β -globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science, v.230, p. 1350-1354, 1985.
- SALGADO, A. A. Consideraciones sobre Metodología y Sensibilidad del Xenodiagnóstico. Bol. Chil. Parasitol., v.24, p.9-13, 1969.
- SALGADO, A. A. Xenodiagnosis in the Selection of Patients and Evaluation of Treatment. In: International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research, 1975, Belo Horizonte. New Approaches in American Trypanosomiasis Research; Proceedings of an International Symposium. Washington: PAHO, 1976, p.223-226. (Pan American Health Organization. Scientific Publication, 318).
- SALGADO, J. A., SALGADO, A. A., ESPÍNOLA, H. N. Contribuição ao Conhecimento das Reações às Picadas de Triatomíneos. Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop., v.20, p.231-235, 1963.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. Molecular Cloning: Laboratory Manual. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Book 01
- SANTOS, A. H., SILVA, I. G., RASSI, A. Estudo Comparativo entre o Xenodiagnóstico Natural e o Artificial, em Chagásicos Crônicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., v.28, p.367-373, 1995.
- SANTOS, L. C., CELANO, V. S., JUNQUEIRA, A. C. V., COURA, J. R. Estudo Comparativo entre o Xenodiagnóstico Direto e Indireto e a Hemocultura em Meio LIT e NNN em Pacientes Chagásicos Crônicos. In: 1^a REUNIÃO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (FIOCRUZ/CNPq), 1993, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/CNPq, 1993. p.131.
- SARKAR, G., SOMMER, S. S. Shedding Light on PCR Contamination. Nature, v.343, p.27, 1990.
- SCHENONE, H., ALFARO, E., REYES, H., TAUCHER, E. Valor del Xenodiagnóstico en la Infección Chagásica Crónica. Bol. Chil. Parasitol., v.23, p.149-154, 1968.
- SCHENONE, H., ALFARO, E., ROJAS, A. Bases y Rendimiento del Xenodiagnóstico en la Infección Chagásica Humana. Bol. Chil. Parasitol., v.29, p.24-26, 1974.

- SCHENONE, H., CONCHA, L., ARANDA, R., ROJAS, A., ALFARO, E., KNIERIM, F., ROJO, M. Valor do Xenodiagnóstico na Avaliação do Tratamento da Infecção Crônica pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Goiana Méd., v.16, p.179-184, 1970.
- SCHENONE, H., CONTRERAS, M. del C., ROJAS, A. Rendimiento del Xenodiagnóstico, Según el Número de Cajas Utilizadas, en 1.181 Personas con Infección Chagásica Crónica Diagnosticada Mediante la Reacción de Hemaglutinación Indirecta. Bol Chil. Parasitol., v.46, p.58-61, 1991.
- SCHOFIELD, C. J. The Control of Chagas Disease in America: Conference XXVIII Brazilian Congress of Tropical Medicina, Belém, Brasil. February, 1992 apud DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas Disease. In: WENDEL, S., BRENER, Z., CAMARGO, M. E., RASSI, A. (Ed.). Chagas Disease (American trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1992. p.49-80.
- SCHMUÑIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the Etiologic Agent of Chagas' Disease: Status in the Blood Supply in Endemic and Nonendemic Countries. Transfusion, v.31, p.547-557, 1991.
- SEGURA, E. L. Xenodiagnosis. In: BRENNER, R. R., STOKA, A. M. (Ed.). Chagas' Disease Vectors. Boca Raton: CRC PRESS, INC., 1987. vol.II, cap.3, p.41-45.
- SILVA, I. G. Nova Técnica para a Leitura do Xenodiagnóstico. Rev. Goiana Med., v.36, p.37-41, 1990.
- SILVA, I. I. Sobre la Conveniencia de Realizar el Xenodiagnóstico Fuera del Organismo Human em todos los Casos. Rev. Fac. Med. Tucuman, v.1, p.405-415, 1958.
- SIMPSON, L. The Mitochondrial Genome of Kinetoplastid Protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. Ann. Rev. Microbiol., v.41, p.363-382, 1987.
- SIQUEIRA, A. F. Diagnóstico Parasitológico da Moléstia de Chagas. In: CANÇADO, J. R. (Ed.). Doença de Chagas. Belo Horizonte: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968, p. 261-278.
- SOTO, R. U., SOTO, S. T. Valor del Xenodiagnóstico en la Fase Crónica de la Enfermedad de Chagas. Rev. Fac. Med. (Maracaibo), v.1, p.23-30, 1968.
- SOUTO, R. P., ZINGALES, B. Sensitive Detection and Strain Classification of *Trypanosoma cruzi* by Amplification of a Ribosomal RNA Sequence. Mol. Biochem. Parasitol., v.62, p.45-52, 1993.
- SOUZA, H. B. W. T., MOREIRA, A. A. B., MATSUBARA, L., CAMPOS, R., AMATO NETO, V., PINTO, P. L. S., TAKIGUTI, C. K. Estudo sobre o Xenodiagnóstico *in vitro*: II. Comparação com o Xenodiagnóstico *in vivo*. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo, v.43, p.165-167, 1988.
- SOUZA, O. E. Forty-third Annual Report of the Work an Operation of The Gorgas Memorial Laboratory. U.S. Govt. Printing Office. Washington, 1971 apud CERISOLA, J. A., ROHWEDDER, R., SEGURA, E. L., DEL PRADO, C. E., ALVAREZ, M., DE

- MARTINI, G. J. W. El Xenodiagnóstico. Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fátala Chaben". Buenos Aires. Argentina, 1974.
- SOUZA, S. L., CAMARGO, M. E. The Use of Filter Paper Blood Smears in a Practical Fluorescent Test for American Trypanosomiasis Serodiagnosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.8, p.255-258, 1966.
- STROUT, R. G. A Method for Concentrating Hemoflagellates. J. Parasitol., v.48, p.100, 1962.
- STURM, N. R., DEGRAVE, W., MOREL, C. M., SIMPSON, L. Sensitive Detection and Schizodeme Classification of *Trypanosoma cruzi* Cells by Amplification of Kinetoplast Minicircle DNA Sequences: Use in Diagnosis of Chagas' Disease. Mol. Biochem. Parasitol., v.33, p.205-214, 1989.
- STURM, N. R., SIMPSON, L. Kinetoplast DNA Minicircles Encode Guide RNAs for Editing of Cytochrome Oxidase Subunit III mRNA. Cell, v.61, p.879-884, 1990.
- TAIBI, A., GUEVARA-ESPINOZA, A., SCHÖNECK, R., YAHIAOUI, B., OUAISSI, A. Improved Specificity of *Trypanosoma cruzi* Identification by Polymerase Chain Reaction Using an Oligonucleotide Derived from Amino-Terminal Sequence of a Tc24 Protein. Parasitology, v.111, p.581-590, 1995.
- TAYLOR, G. R. Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Automation. In: McPHERSON, M. J., QUIRKE, P., TAYLOR, G. R. (Ed.). PCR: A Practical Approach. 2.ed. New York: Oxford University Press, 1993, p.1-14.
- TORREALBA, J. F. Algo mas sobre Tripanosomosis. Ensayos de Xenodiagnóstico. Cac. Méd. Caracas, v.33, p.33-37, 1934.
- TORRES, M. Alguns Fatos que Interessam á Epidemiologia da Molestia de Chagas. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.7, p.120-138, 1915.
- UMEZAWA, E. S., KLOETZEL, J. Isolamento de *T. cruzi*, de Camundongos com Infecção Crônica, por Hemocultura em Linhagem de Células LLC-MK₂. In: 13º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 1977, Brasília. Resumos dos Temas Livres. Brasília: [s.n.], 1977. p.75.
- UMEZAWA, E. S., SHIKANAI-YASUDA, M. A., SILVEIRA, J. F., COTRIM, P. C., PARANHOS, G., KATZIN, A. M. *Trypanosom cruzi*: Detection of a Circulating Antigen In Urine of Chagasic Patients Sharing Common Epitopes with an Immunodominant Repetitive Antigen. Exp. Parasitol., v.76, p.352-357, 1993.
- URDANETA-MORALES, S., RUEDA, I. G. A Comparative Study of the Behavior of Venezuelan and Brazilian Strains of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* In the Venezuelan Invertebrate Host (*Rhodnius Prolixus*). Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.19, p.241-250, 1977.
- URRIBARRÍ, R. S. El Xenodiagnóstico. Experiencia Personal en 100 Casos de Enfermedad de Chagas Crónica. Kasmera, v. 3, p. 167-225, 1970.

- VALLEJO, G. A. *Trypanosoma rangeli*: Caracterização Intra e Interespecífica pela Análise dos Polimorfismos de DNA Nuclear e kDNA. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1994. 135p. (Tese, Doutorado em Ciências).
- VERGARA, U., VELOSO, C., GONZALEZ, A., LORCA, M. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Chagas' Disease Using Synthetic Peptides. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.46, p.39-43, 1992.
- WEISS, J. B. DNA Probes and PCR for Diagnosis of Parasitic Infections. Clin. Microbiol. Reviews, v.8, p.113-130, 1995.
- WHO. Chagas' Disease. In: UNDP WORLD BANK WHO SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES (TDR). Tropical Disease; Progress in International Research, 1987-1988. Geneva: World Health Organization, 1989. p.79-84. (Programme Report, 9).
- WINCKER, P., BOSSENO, M. F., BRITTO, C., YAKSIC, N., CARDOSO, M. A., MOREL, C. M., BRENIÈRE, S. F. High Correlation between Chagas' Disease Serology and PCR-based Detection of *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA in Bolivian Children Living in an Endemic Area. FEMS Microbiology Letters, v.124, p. 419-423, 1994b.
- WINCKER, P., BRITTO, C., PEREIRA, J. B., CARDOSO, M. A., OELEMANN, W., MOREL, C. M. Use of a Simplified Polymerase Chain Reaction Procedure to Detect *Trypanosoma cruzi* in Blood Samples from Chronic Chagasic Patients in a Rural Endemic Area. Am. J. Trop. Med. Hyg., v.51, p.771 - 777, 1994a.
- WISNIVESKY-COLLI, C., RUIZ, A. M., GURTLER, R. E., SOLARZ, N. D., LAZZARI, J., LEDESMA, O., BUJAS, M. A., RISSIO, A. M., MARTELEUR, A., SEGURA, E. L. Dynamics of Transmission of *Trypanosoma cruzi* in a Rural Area of Argentina. IV. Serologic, Parasitologic and Eletrocardiographic Study of the Human Population. Medicina (Buenos Aires), v.49, p.341-350, 1989.
- WOO, P. T. K. Evaluation the Haematocrit Centrifuge and other Techniques for the Field Diagnosis of Human Trypanosomiasis and Filariasis. Acta Trop., v.28, p.298-303, 1971.
- WOOD, S. F. A Potencial Infectivity Index for Triatoma Harboring *Trypanosoma cruzi* Chagas. Exp. Parasitol., v.10, p.356-365, 1960
- WOOD, S. F. Environmental Temperature as a Factor in Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma protracta*. Exp. Parasitol., v.3, p.227-233, 1954.
- WRIGHT, P. A., WYNFORD-THOMAS, D. The Polymerase Chain Reaction: Miracle or Mirage? A Critical Review of its Uses and Limitations in Diagnosis and Research. J. Pathol., v.162, p.99-117, 1990.
- WRISCHNIK, L. A., HIGUCHI, R. G., STONEKING, M., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N., WILSON, A. C. Length Mutations in Human Mitochondrial DNA: Direct Sequencing of Enzymatically Amplified DNA. Nucleic Acids Res., v.15, p.529-542, 1987.

ZELEDÓN, R. Host-Parasite Relationships in the Vector. In: International Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis, 1975, Belo Horizonte. New Approaches in American Trypanosomiasis Research; Proceedings of an International Symposium. Washington: PAHO, 1976, p.09-15 (Pan American Health Organization. Scientific Publication, 318).

ZELEDÓN, R., VIETO, P. L. Susceptibilidad de Varias Especies de Triatóminos a una Cepa Costarricense de *Schizotrypanum cruzi* Chagas, 1909. Rev. Biol. Trop., v.5, p.195-199, 1957.

10. ANEXO

Meio LIT (LIVER INFUSION TRYPTOSE)

Na preparação do LIT, cumprem-se as seguintes etapas:

1^a) Preparação da solução mãe constituída de:

NaCL (Vetec - Brasil)	4,0 g
KCl (Pró Analyti - Brasil)	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (Merck do Brasil)	9,24g
H ₂ O destilada q.s.q.	1000 ml

Misturam-se as substâncias acima, ajusta-se o pH para 7.2 e transfere-se a solução para o refrigerador a 4°C até a preparação do LIT.

2^a) Preparação do meio LIT propriamente dito, utilizam-se:

Solução mãe	360 ml
Triptose (DIFCO Laboratories - USA)	2,0 g
Infuso de fígado (Liver Infusion Broth-Dehydrated) (DIFCO - USA)	2,0 g
Soro fetal bovino (WL Imunoquímica Prod. Imunoquímicos Ltda.) ...	40 ml

Dissolve-se a triptose e o infuso de fígado na solução mãe, mistura-se a seguir o soro fetal bovino e deixa-se em banho-maria a 68°C por 1 hora. Depois espera-se esfriar e adiciona-se: 24 mg de penicilina sódica (Penicillin-G - SIGMA Chemical Co - USA); 40 mg de estreptomicina (Streptomycin Sulfate - SIGMA Chemical Co - USA); 800 mg de glicose (Dextrose, P.A. - C₂H₁₂O₆ - Reagen - Quimibrás Indústrias Químicas S. A. - Brasil) e 4 ml de solução de hemoglobina humana (produzida em nosso laboratório) a 10%. Porém antes,

centrifuga-se a hemoglobina durante 5 a 10 minutos a 3.500 rpm. Verifica-se o pH que deverá estar 7.2.

Preparada a solução, esta é filtrada em papel de filtro por 2 vezes e a seguir pelo Sistema de filtração Millipore (Millipore Corporation - USA).