

EFEITOS DO JEJUM E DA TEMPERATURA EM LABORATÓRIO NA INFECTIVIDADE DE TRIATOMÍNEOS POR *TRYPANOSOMA CRUZI**

José Eduardo TOLEZANO **
Maria de Fátima Lerenó de ARAÚJO ***
Suzel Scalón RIBEIRO ***
Maria Marcia Imenes ISHIDA ***

RIALAG/555

TOLEZANO; J.E.; ARAUJO, M.F.L.; RIBEIRO, S.S. & ISHIDA, M.M.I.
— Efeitos do jejum e da temperatura em laboratório na infectividade de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 43(1/2):25-32, 1983.

RESUMO: A tentativa de padronização de alguns parâmetros que envolvem a realização do xenodiagnóstico, levou os autores do presente trabalho a estudarem a influência do tempo de jejum e da temperatura de criação em laboratório sobre a evolução do *T. cruzi* em *Triatoma infestans*, assim como, sobre a própria evolução dos estádios ninfais destes artrópodes. Estudaram também, a quantidade de sangue ingerido por tais insetos quando mantidos em diferentes temperaturas e períodos de jejum. Foram utilizados quatro lotes de 50 ovos cada. Os lotes 1 e 2 foram mantidos em temperatura constante ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$) e umidade relativa do ar de 70-80%; os lotes 3 e 4 ficaram em temperatura ambiente ($19-31^{\circ}\text{C}$), variando a umidade livremente de acordo com as condições climáticas. Os lotes de números ímpares tiveram repastos quinzenais e os lotes de números pares, repastos mensais. Entre o 3.º e o 4.º estádios evolutivos, os barbeiros tomaram repasto contaminado com *T. cruzi*. Observou-se que a temperatura influenciou no tempo de eclosão e desenvolvimento, que foi maior em temperatura ambiente. Quanto ao jejum, verificou-se que tem uma importância menos acentuada sobre a evolução dos triatomíneos, porém, influenciou decisivamente na mortalidade e na infectividade, pois, quanto maior era o tempo de abstinência de alimento, menor a quantidade de sangue sugado.

DESCRITORES: *Triatoma infestans*, crescimento, influência do jejum e da temperatura em laboratório; *Triatoma infestans*, infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*; *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUÇÃO

Fundamentalmente a hemocultura e o xenodiagnóstico são os métodos mais utilizados ou aconselhados para o diagnóstico parasitológico da doença de Chagas em sua fase crônica.

Na literatura encontram-se relatos sobre estudos efetuados com hemocultura que mostram resultados os mais variáveis possíveis,

desde a positivação de 100% dos casos¹, até o resultado verificado por FREITAS¹⁰, em 1947, que não conseguiu positivar nenhuma das 37 culturas efetuadas em meios de McNeal, Novy & Nicolle (NNN) e de Bonacci. Tais variações podem até ser explicadas pelas diferentes modificações já propostas para esta técnica.

Quanto ao xenodiagnóstico, desde que BRUMPT⁴, em 1914, mostrou a possibilidade

* Realizado na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

*** Bolsista do Instituto Adolfo Lutz.

de utilização deste método no diagnóstico de moléstias parasitárias e, em particular, no da doença de Chagas, por intermédio do próprio vetor do agente causal da enfermidade, ou através da utilização de outras espécies vicárias que pudessem assegurar a evolução do parasita, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de demonstrar^{6, 7, 21, 22, 23} ou mesmo melhorar^{2, 10, 11} a eficiência deste procedimento laboratorial. Este método a que BRUMPT chamou de "cultura natural em hospedeiro favorável" é sem dúvida o de maior emprego para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da tripanosomíase americana, apesar dos inconvenientes de baixa eficiência da técnica, demora do resultado, necessidade de contato do barbeiro com o paciente, necessidade de criação de triatomíneos em laboratório etc.

RASSI *et alii*²², mesmo reconhecendo que o xenodiagnóstico deva ser o método de escolha para o diagnóstico da fase crônica da parasitose, dizem que os percalços ligados a esta técnica seriam reflexo de falta de padronização adequada. Em vista disso, e na tentativa de padronização de alguns parâmetros que envolvem a realização do xenodiagnóstico, os autores do presente trabalho estudaram a influência do tempo de jejum e da temperatura de criação em laboratório sobre a evolução do *T. cruzi* em triatomíneos, assim como, sobre a própria evolução dos estádios ninfais destes artrópodes. Estudaram, também, a quantidade de sangue ingerido por tais insetos, quando mantidos em diferentes temperaturas e períodos de jejum.

MATERIAL E MÉTODOS

Antes de iniciar o experimento foram realizadas observações para determinação dos períodos de jejum a serem testados pela pesquisa. Assim, verificou-se o desenvolvimento ninfal de *Triatoma infestans* quando se lhes oferecia alimento duas vezes por semana, uma vez por semana, cada duas semanas ou cada mês. Não se notando nos três primeiros intervalos de tempo entre repastos grandes variações no tempo médio para evolução desses barbeiros até um estágio em que pudessem ser utilizados para o xenodiagnóstico (entre 3.º e 4.º estágio de desenvolvimento), optou-se por realizar a experiência com lotes alimentados quinzenalmente e lotes alimentados mensalmente.

Utilizaram-se quatro lotes, cada um com 50 ovos de *Triatoma infestans*, selecionados ao acaso do insetário de criação de triatomíneos da Seção de Parasitoses Sistemáticas do Instituto Adolfo Lutz, todos coletados no dia da desova. Esses 50 ovos foram subdivididos em dois frascos por lote, para evitar acúmulo de fezes, o que acarretaria morte das ninfas por afogamento em seus dejetos.

O lote 1 foi alimentado quinzenalmente e mantido em temperatura constante (28°C ±

2); o lote 2, mantido à mesma temperatura, foi alimentado a cada 30 dias. Os lotes 3 e 4 foram mantidos à temperatura ambiente (variando entre 19 e 31°C) e alimentados a cada 15 e 30 dias, respectivamente. Nos lotes 1 e 2 a umidade relativa do ar esteve constante em 70-80%, como aconselham NICOLLE & LWOLFF¹⁷; nos demais variou livremente, refletindo as condições ambientais.

Foram efetuadas pesagens dos barbeiros antes e após cada repasto, utilizando-se balança analítica Mettler H35AR, com capacidade de pesagem de 0,1 mg a 160 gramas.

O repasto alimentar foi padronizado para durar 60 minutos para todos os lotes, pelo oferecimento de sangue de coelho, administrado de forma semelhante à preconizada para o xenodiagnóstico artificial¹⁸. O último repasto sanguíneo, realizado entre o 3.º e o 4.º estádios ninfais nos lotes 1, 2 e 3 e, entre o 2.º e o 3.º estádios de desenvolvimento, no lote 4, consistiu em sangue de coelho, contaminado com a adição de aproximadamente $1,6 \times 10^4$ formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* por centímetro cúbico de sangue oferecido.

As condições a que foram submetidos os diferentes lotes no que se refere a temperatura, jejum e período escolhido para contaminação procuraram reproduzir as condições que, em regra, são utilizadas para criação dos triatomíneos e realização do xenodiagnóstico nos diversos laboratórios que mantêm tais atividades; a época do repasto com *T. cruzi* correspondeu aos estádios de preferência para a aplicação do xenodiagnóstico.

A cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada foi a cepa Y, mantida há mais de 15 anos, por repiques em meio de Ducrey, pela Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Efetuada a alimentação contaminada, realizaram-se até quatro leituras desses "xenodiagnósticos" respectivamente 20, 30, 60 e 90 dias após o repasto com *T. cruzi*. Em alguns exemplares foi feita dissecação do inseto.

RESULTADOS

Os resultados permitem observar que ovos de triatomíneos, quando mantidos em temperatura ambiente, apresentam tempo de eclosão significativamente superior ao verificado para ovos submetidos a temperatura controlada.

Assim, nos lotes 3 e 4 o tempo de eclosão máximo foi de até 46 dias, enquanto nos lotes 1 e 2 não superou 17 dias.

As taxas de eclosão também variaram conforme a temperatura: 68% quando os ovos foram mantidos em temperatura ambiente e 97% para os que permaneceram em temperatura constante. Fenômeno semelhante ocorreu com o desenvolvimento ninfal.

Os dados expressos na figura indicam que as condições impostas ao lote 1 parecem ser as mais favoráveis para um rápido desenvolvimento até o estágio preferencial de uso dos triatomíneos no xenodiagnóstico, sugerindo que em temperatura ambiente existiria necessidade de maior número de repastos sanguíneos para evolução larval.

A tabela 1 mostra que os insetos do lote 1 sugaram maior quantidade de sangue que os dos outros lotes. Nos lotes 3 e 4 não foram precisos mais repastos e sim maior espaço de tempo para se realizarem os processos metabólicos de digestão e muda.

Pela tabela 2 observa-se que o tempo de desenvolvimento ninfal sofre maior efeito da temperatura, na medida em que se verifica nos lotes 3 e 4, mantidos a temperatura ambiente, necessidade de mais dias para atingir estádios mais avançados. Com relação ao jejum, nota-se importância menos acentuada sobre a evolução dos barbeiros.

Os valores de mortalidade nos lotes 1 e 2 (45,36%), comparados com os dos lotes 3 e 4 (44,12%) refletem a pouca importância da temperatura sobre este parâmetro. Quando comparado o lote 1 ao lote 2, ambos mantidos em condições controladas, vê-se que a taxa de sobrevivência foi em função do jejum, alcan-

çando 70,0% e 38,3%, respectivamente, até a realização do repasto contaminado. Já para os lotes 3 e 4 o jejum determina mortalidade de 47,05% e 41,18%, respectivamente. Deve porém ser ressaltado que ficou a impressão de ter havido interação do jejum e da temperatura na determinação da mortalidade do lote 4, fato não comprovado justamente por temer-se a perda de todo o grupo, pois no momento em que os insetos se encontravam ainda entre o 2.º e o 3.º estádios, apresentavam aspecto de sofrimento, o que provocou antecipação do repasto contaminado com *Trypanosoma cruzi*.

Pela tabela 3 vê-se maior positividade para infecção por *T. cruzi* nas condições a que foram expostos os elementos do lote 1. Os resultados dos lotes 2, 3 e 4, por sua vez, mostram relativa semelhança. Levando-se em consideração comparação dos valores de infectividade em função de temperatura, tem-se 82,18% (lotes 1 e 2) para os insetos em ambiente controlado contra 62,23% (lotes 3 e 4) dos reduvídeos em temperatura ambiente; já a confrontação da positividade ao *T. cruzi* em função do jejum revela a 28°C 100% (lote 1) contra 64,35% (lote 2) e, na temperatura do laboratório, 66,67% (lote 3) contra 57,89% (lote 4).

TABELA 1

Média dos pesos das ninfas antes e após cada repasto sanguíneo

Repasto \ Peso (g)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Antes do 1.º	0,0013	0,0013	0,0009	0,0009
Após o 1.º	0,0045	0,0044	0,0032	0,0034
Antes do 2.º	0,0027	0,0027	0,0025	0,0022
Após o 2.º	0,0099	0,0099	0,0032*	0,0027*
Antes do 3.º	0,0048	0,0037	0,0028	0,0023
Após o 3.º	0,0117	0,0068	0,0026*	0,0095
Antes do 4.º	0,0057	0,0044	0,0024	0,0060
Após o 4.º	0,0358	0,0256	0,0100	0,0208***
Antes do 5.º	0,0149	0,0093	0,0062	—
Após o 5.º	0,0885**	0,0432**	0,0146	—
Antes do 6.º	—	—	0,0114	—
Após o 6.º	—	—	0,0441**	—

* Alimentação recusada.

** Repasto contaminado com aproximadamente $1,6 \times 10^4$ forma epimastigota de *T. cruzi* por mililitro de sangue.

*** Repasto contaminado antecipado para evitar perda do lote.

— Não houve repasto.

TABELA 2

Influência do jejum e da temperatura sobre a mortalidade do Triatoma infestans

Lote 1			Lote 2			Lote 3			Lote 4		
Repasto	Total ninfas vivas	Mortalidade %	Repasto	Total ninfas vivas	Mortalidade %	Repasto	Total ninfas vivas	Mortalidade %	Repasto	Total ninfas vivas	Mortalidade %
1.º	50*	—	1.º	47*	—	1.º	34*	—	1.º	34*	—
2.º	45	10,0	**	41	12,76	2.º	33	2,94	**	31	8,82
3.º	41	18,0	2.º	34	27,65	3.º	25	26,47	2.º	24	29,41
4.º	37	26,0	**	29	38,3	4.º	22	35,29	**	23	32,33
5.º	35***	30,0	3.º	24	48,03	5.º	22	35,29	3.º	22	35,29
—	—	—	**	22	53,2	6.º	18***	47,05	**	21	38,24
—	—	—	4.º	19	59,57	—	—	—	4.º	20****	41,18
—	—	—	**	18	61,7	—	—	—	—	—	—
—	—	—	5.º	18***	61,7	—	—	—	—	—	—

* Ninfas que eclodiram do total de 50 ovos selecionados para o lote.

** Período correspondente a 15 dias antes do repasto seguinte.

*** Repasto contaminado com *T. cruzi*

**** Repasto contaminado com *T. cruzi*, antecipado para evitar a perda do lote.

— Não houve repasto.

TABELA 3

Porcentagem de positividade observada para cepa Y de *Trypanosoma cruzi* após oferta de alimento contaminado com aproximadamente $1,6 \times 10^4$ formas epimastigotas para as ninfas de *Triatoma infestans* *

Leitura do xenodiagnóstico	Positividade %	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
	1. ^a Leitura (20 dias)		29,03	50,0 **	55,55***
2. ^a Leitura (30 dias)		41,15	52,94	58,82	57,89****
3. ^a Leitura (60 dias)		52,36	64,35	66,67	—
4. ^a Leitura (90 dias)		100,0	—	—	—

* Ninfas positivas em uma leitura passavam a ser assim consideradas na contagem total dos positivos, mesmo que mortas quando de leitura posterior, isto para cálculo de percentagem total de positividade para *T. cruzi* no lote estudado.

** Algumas ninfas foram positivadas pelo exame por dissecação.

*** Todas as ninfas positivas foram examinadas por dissecação.

**** Todas as ninfas negativas foram examinadas por dissecação.

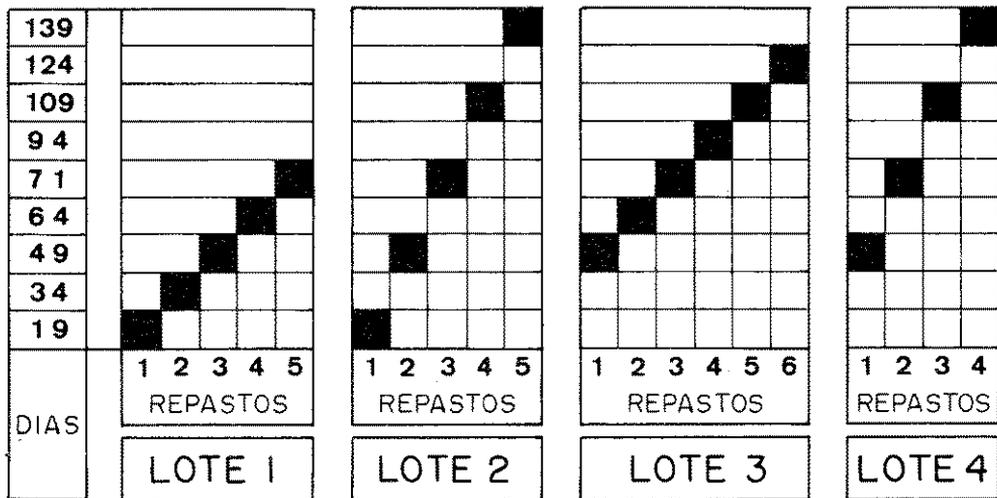


FIGURA — Comparação entre os diferentes lotes testados, quando considerados os dias decorridos da fase de ovo até os vários repastos sangüíneos efetuados.

Associando os dados constantes nas tabelas 1, 2 e 3 aos da figura, percebe-se que nos triatomíneos do lote 1 todos os parâmetros mensurados (tempo de desenvolvimento embrionário e ninfal, mortalidade, quantidade de sangue ingerida e taxa de infecção por *T. cruzi*) apresentaram desempenho melhor do que nos demais lotes.

DISCUSSÃO

As observações do tempo de eclosão dos ovos mantidos a temperatura ambiente e constante não estão em desacordo com o constatado por outros autores^{8, 13, 19 e 20}. A taxa de eclosão de 97% observada em ambiente controlado de temperatura, está próxima dos

80-90% vistos por PERLOWAGORA-SZUMLEVICZ¹⁹, em temperatura entre 24-28°C, e de taxa mostrada por JUAREZ¹⁴, com insetos a 25 e 30°C e umidade entre 50-60%.

HACK¹³, em 1955, fala em 69,69% de eclosão em temperatura ambiente de laboratório, enquanto no presente estudo viu-se 68% de eclosão a esta exposição térmica (22-30°C na fase embrionária).

Quanto ao verificado na figura, sobre o retardamento ninfal quando em temperatura ambiente, HACK¹³ já fazia menção sobre isto em seus estudos de criação de *Triatoma infestans*; o mesmo afirmou BARRETTO³, em 1968, PERLOWAGORA-SZUMLEVICZ²⁰ mostra que a evolução deve ser mais rápida em exposição à temperatura variável entre

24-28°C; observação idêntica foi feita por JUAREZ¹⁴, quando os insetos ficavam a 30°C.

O tempo de evolução dos estádios menores para os maiores esteve neste experimento também dependente, porém em menor escala (figura), das oportunidades de efetuar alimentação, quando comparados os lotes mantidos em condições térmicas idênticas. NICOLLE & LWOLFF¹⁷ dizem que barbeiros, sem sugar sangue, não conseguem evoluir, embora DIAS⁹, em 1965, tenha mostrado a ocorrência de uma única muda em alguns insetos mantidos em jejum desde a muda anterior.

A observação de que a variação da temperatura obriga os triatomíneos a terem maiores períodos de tempo para sofrer os processos de digestão e ecdise (tabela 1) não difere da vista em DIAS⁹, que obteve um metabolismo mais rápido em insetos mantidos a temperatura constante.

O jejum, por sua vez, interfere na mortalidade, conforme mostra a tabela 2. Confrontando-se as taxas de mortalidade entre os elementos dos lotes 1 e 2, tem-se 30,0% e 61,7%, respectivamente, para cada lote, que tinham como única diferença o período de tempo entre repastos, até o momento de receberem sangue contaminado com *T. cruzi*.

Mesmo não tendo sido possível concluir sobre a interação de variáveis na determinação da mortalidade nos lotes 3 e 4, julga-se válido ressaltar a inexistência de indícios favoráveis à incriminação da temperatura como fator determinante da mortalidade nos lotes 1, 2 e 3 e, talvez, no lote 4.

É possível mostrar, no entanto, que a infectividade é função de interação das variáveis temperatura e jejum pois, levando-se em consideração o fator térmico, tem-se 82,18% de positividade em ambiente controlado, contra 62,22% na condição de temperatura ambiente, influência já mostrada por NEVES¹⁸, que falava da manutenção do *T. cruzi* em triatomíneos submetidos a diferentes temperaturas. Quando o jejum é examinado, vê-se ação deste fator sobre a infecção pelo flagelado. Quanto à semelhança dos resultados observada nos lotes 2 e 3, acredita-se que a diferença (10,0%) verificada na positividade do lote 4 em relação aos lotes 2 e 3 é devida ao fato de os insetos deste grupo terem tomado o repasto contaminado entre o 2.º e 3.º estádios evolutivos, o que resultou em quantidade sugada de sangue menor do que a observada nos outros grupos.

Os dados obtidos no presente trabalho permitem afirmar que exemplares de *T. infestans*, criados em temperatura de 28°C, umidade de 70 a 80% e alimentados com intervalos máximos de duas semanas, evoluirão mais rapidamente para estádios que os tornam aptos para uso em xenodiagnóstico, sugando grande quantidade de sangue. JUAREZ¹⁴, em 1970, mos-

trou que triatomíneos de 2.º e 3.º estádios, quando mantidos a 30°C, sugavam mais sangue do que outros, submetidos a temperatura de 25°C, atribuindo tal fato à aceleração do metabolismo nos insetos mantidos em temperatura mais alta. Este pesquisador sugere, ainda, que o maior aproveitamento do sangue ingerido nos triatomíneos mantidos a temperatura mais elevada seria responsável pela menor necessidade de alimento nos demais estádios evolutivos. No presente trabalho não se pode testar esta hipótese pois os triatomíneos foram observados apenas até o 3.º e 4.º estádios ninfaís.

A rápida evolução do triatomíneo para estádios mais avançados deveu-se, com certeza, ao fato de ter sido permitida alimentação até a saciedade, o que acarretou necessidade de um único repasto sanguíneo, no 1.º e no 2.º estádio, para que estes insetos sofressem ecdise. Isto se assemelha ao observado por NEIVA¹⁵, em 1914, e GOODCHILD¹², em 1955, e difere do visto por NICOLLE & LWOLFF¹⁷, em 1942, e CORREA⁵, em 1962, que registraram mais de uma alimentação em cada estádio; isto talvez por adotarem períodos entre repastos de 3 a 4 dias. SIQUEIRA²⁴, em 1968, prefere esperar 15 dias sem alimentar os insetos que seriam utilizados em xenodiagnóstico. É lícito dizer, em concordância com Siqueira, que a melhor eficiência do xenodiagnóstico em comparação aos outros processos de demonstração do parasita (exame a fresco, esfregaço, gota espessa ou hemocultura) seja consequência do maior volume de sangue sugado pelos barbeiros e, daí, esperar-se que a utilização de triatomíneos com capacidade de sugarem maior quantidade de sangue, desde que suscetíveis ao *Trypanosoma cruzi*, acarretará maior possibilidade de reprodução do protozoário no hospedeiro invertebrado.

CONCLUSÕES

Para as condições adotadas e amostras estudadas é possível concluir:

— A evolução embrionária e ninfa do *Triatoma infestans* sofreu interferência da temperatura em que os insetos foram criados.

— A interferência da temperatura tem reflexos na aceleração ou diminuição do metabolismo do inseto.

— O jejum mostrou uma menor interferência no desenvolvimento, mas influenciou decisivamente na mortalidade.

— Parece ter havido interação destas duas variáveis na determinação da mortalidade dos elementos do lote 4, mantido a temperatura ambiente e períodos mensais de jejum.

— Nos lotes 1, 2 e 3 não foi verificada importância da temperatura para determinação da mortalidade dos barbeiros.

— Quando mantidas as condições de temperatura a 28°C, umidade 70-80% e intervalos de alimentação não superiores a 15 dias, deve-se esperar maior rapidez de desenvolvimento do *T. infestans* até os estádios preferenciais para utilização em xenodiagnóstico.

— A utilização de *T. infestans*, criados nas condições acima citadas, permitirá que estes tenham maior necessidade de sugar sangue, acarretando maior possibilidade de positivação do xenodiagnóstico.

RIALA6/544

TOLEZANO, J.E.; ARAUJO, M.F.L.; RIBEIRO S.S. & ISHIDA, M.M.I. — Effects of fasting and laboratory temperature on the infectivity of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2):25-32, 1983.

ABSTRACT: A study was made of the influence of fasting and rearing temperature on the evolution of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*, on the evolution of nymphal stages of these arthropods, and on the amount of blood ingested by the insects maintained at various temperatures and fasting periods. Four lots, each comprising 50 eggs, were employed. Lots 1 and 2 were maintained in an incubator at 28°C ± 2.k and relative humidity of 70-80%. Lots 3 and 4 were left at room temperature of 19°—31°C and relative humidity varying according to environmental conditions. Lots 1 and 3 received nutrients every two weeks while Lots 2 and 4, every month. Between the third and fourth evolutive stages, the insects were fed food containing *T. cruzi*. The temperature influenced the eclosion and growth which were greater at room temperature. Fasting had less influence on the evolution of the triatomids but influenced clearly mortality and infectivity. In fact, the longer the fasting period the lesser the amount of blood ingested.

DESCRIPTORS: *Triatoma infestans*, growth, influence of fasting and laboratory temperature; *Triatoma infestans*, experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma cruzi*.

BIBLIOGRAFIA

1. ALBUQUERQUE, R.D.R.; FERNANDES, L.A.R.; FUNAYAMA, G.K.; FERRIOLI F.ºF. & SIQUEIRA, A.F. — Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 14:1-5, 1972.
2. ALMEIDA, S.P.; SHERLOCK, I.A. & FAHEL, E. — Novo procedimento de xenodiagnóstico na forma crônica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 74:285-8, 1976.
3. BARRETO, M.P. — Transmissores. In: CANÇADO, J.R., ed. — *Doença de Chagas*. — Belo Horizonte, 1968 p. 202.
4. BRUMPT, E. — Le xénodagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. *Bull. Soc. Path. exot.*, 7:706-10, 1914.
5. CORREA, F.M. de A. — Estudo comparativo do ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* alimentado em diferentes animais (Hemiptera, Reduviidae). *Pap. Avulsos Dep. Zool.*, São Paulo, 15:177-200, 1962.
6. DIAS, E. — Criação de triatomídeos no laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 33: 407-12, 1938.
7. DIAS, E. — Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 35:335-42, 1940.
8. DIAS, E. — Notas sobre o tempo de evolução de algumas espécies de triatomíneos em laboratório. São Paulo, 1947. 160 p. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]
9. DIAS, J.C.P. — Observações sobre o comportamento de triatomíneos brasileiros frente ao jejum, em laboratório. *Rev. bras. Malariol. Doenças trop.*, 17:55-63, 1965.
10. FREITAS, J.L.P. — Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. São Paulo, 1947. 160 p. [Tese — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]
11. FREITAS, J.P.L. de — Observações sobre o tempo ótimo para o exame de triatomídeos empregados em xenodiagnósticos. *Folia clin. biol.*, 16:180-5, 1950.

TOLEZANO, J.E., ARAUJO, M.F.L.; RIBEIRO, S.S. & ISHIDA, M.M.I. — Efeitos do jejum e da temperatura em laboratório na infectividade de triatomíneos por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43(1/2):25-32, 1983.

12. GOODCHILD, A.J.P. — Some observations on growth and egg production of blood-sucking reduviids *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *Proc. R. entomol. Soc. London*, Ser. A, 30:127-36, 1955.
13. HACK, W.H. — Estudios sobre biología del *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hem. Reduviidae). *Ann. Inst. Med. region.*, 4: 125-47, 1955.
14. JUAREZ, E. — Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Rev. Saúde pública*, S. Paulo, 4: 147-66, 1970.
15. NEIVA, A. — Revisão de género *Triatoma* Lap. Rio de Janeiro, Tipografia do Jornal do Comércio, 1914. 80 p.
16. NEVES, D.P. — Influência da temperatura na evolução do *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos. *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 13:155-61, 1971.
17. NICOLLE, P. & LWOFF, M. — Recherches sur la nutrition des réduvidés hémophages I. Développement des stades larvaires de *Triatoma infestans* Klug dans les conditions habituelles d'élevage. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 35:219-32, 1942.
18. NUSSENZWEIG, V. & SONNTAG, R. — Xenodiagnóstico artificial. Novo processo. Primeiros resultados positivos. *Rev. paul. Med.*, 40:41-3, 1952.
19. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. — Ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* em condições de laboratório. *Rev. bras. Malariol. Doenças trop.*, 5:35-47, 1953.
20. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. — Estudo sobre a biologia do *T. infestans*, o principal vetor da doença de Chagas no Brasil (Importância de algumas de suas características biológicas no planejamento de esquema de combate a esse vetor). *Rev. bras. Malariol. Doenças trop.*, 21: 117-59, 1969.
21. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. — Studies in search of a suitable experimental insect. Model for xenodiagnosis of hosts with Chaga's disease. 1. Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77:37-53, 1982.
22. RASSI, A.; AMATO NETO, V. & OLIVEIRA, R.L. — Observações sobre a hemocultura em meio de LIT para *Trypanosoma cruzi* segundo Mourão e Mello (1975). *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 23:57-60, 1981.
23. SCHENONE, H.; ALFANO, E.; REYES, H. & TAUCHER, E. — Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica. *Bol. chil. Parasitol.*, 23:149-54, 1968.
24. SIQUEIRA, A.F. de — Diagnóstico parasitológico. In: CANÇADO, J.R. ed. — *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, 1968. p. 261-278.

Recebido para publicação em 23 de janeiro de 1983.