

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Chagas's disease parasitological diagnosis

Maria de Fátima Lerenó de Araújo, Elizabeth Visone Nunes Westphalen, Márcia da Conceição Bisugo, Elaine Aparecida Cunha, Sansão da Rocha Westphalen, Antonio Marcos de Aparecida Levy
mlerenó@uol.com.br

Resumo

A infecção por *Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi* não causa sinais patognomônicos e mais da metade dos infectados não manifesta os principais sintomas da doença de Chagas, seja ela cardíaca ou digestiva. Os primeiros métodos de diagnóstico desenvolvidos foram os métodos parasitológicos. Em 1909, Carlos Chagas baseou-se no achado do *T. cruzi* em uma criança, para afirmar que este agente era o responsável pelas manifestações clínicas descritas. Tratava-se de fase aguda da doença e a pesquisa direta de *T. cruzi* no sangue periférico continua, 100 anos após, sendo realizada da mesma forma. O xenodiagnóstico, descrito por Brumpt em 1914, passou a ser utilizado rotineiramente somente após sua padronização em 1974. Na fase crônica, na qual a parasitemia é baixa, estas metodologias apresentam alta especificidade e baixa sensibilidade, contribuindo para a exclusão de reações sorológicas cruzadas, avaliação de tratamento e isolamento e caracterização de cepas. Todavia, devido à baixa sensibilidade, um exame negativo não afasta a possibilidade de infecção. Por outro lado, um exame positivo é um diagnóstico de certeza indiscutível. Na década de 1990, a reação em cadeia da polimerase (PCR) passa a ser recomendada como teste confirmatório. A disponibilidade nos laboratórios, o custo operacional e financeiro limitam a utilização de várias provas diagnósticas nas duas fases da infecção. Sendo assim, há 100 anos, os exames parasitológicos continuam a colaborar com a elucidação de casos suspeitos desta importante tripanossomíase.

Palavras-chave: Doença de Chagas, diagnóstico parasitológico, *Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi*, centenário da doença de Chagas.

Abstract

The *Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi* infection doesn't cause pathognomonic signs and the great number of infected persons doesn't show the main Chagas' disease manifestations, neither cardiac nor digestives. The first diagnosis are parasitological methods. In 1909, Carlos Chagas, observed *T. cruzi* infection in a child and affirmed to be this the etiological agent the responsible by the Chagas' disease symptoms. It was the acute phase and the method for identification of *T. cruzi* by direct examining anticoagulated blood continues to be in use as the same way, after one hundred years. The xenodiagnosis was described by Brumpt in 1914. Its frequent utilization started only in 1974 after standardization. In the chronic Chagas' disease the parasites level in the circulatory blood system is low. These methods present high specificity and low sensitivity having a role in: resolve cross-reaction serologic results, treatment evaluation, parasite isolation and specimens characterization. However due to the low sensitivity a negative result doesn't mean no infection. In the other hand a positive result is a indisputable certain diagnosis. The diagnosis via polymerase chain reaction – based assays has been studied since 1990. Then it was indicated to be used as a confirmation method. Many diagnosis techniques have limited use in routine in the both infection phases due to the need of specific laboratory facilities, high financier and operational costs. In this way in a period of one hundred years the parasitological tests have been collaborated to detected the suspect cases of this important trypanosomiasis.

Key-words: Chagas's disease, parasitological diagnosis, *Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi*, Chagas's disease centenary.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi*, assim como para infecções por outras etiologias, tem como base três parâmetros distintos: as manifestações clínicas que, quando presentes, permitem

ao clínico suspeitar da infecção; os antecedentes epidemiológicos, que também induzem à suspeita; e os métodos de diagnóstico, em geral laboratoriais, que permitem confirmar ou excluir a suspeita diagnóstica na maioria das situações. Como a doença de Chagas não apresenta nenhum sinal patognomônico, o seu diagnóstico repousa sobre a confirmação pelos dados laboratoriais da suspeita clínica. Na infecção por *T. cruzi*, mais da metade dos infectados não apresenta as principais manifestações da doença de Chagas, seja ela cardiológica ou digestiva^{1,2,3}.

Os primeiros métodos de diagnóstico desenvolvidos foram os métodos parasitológicos. Carlos Chagas baseou-se no achado do *T. cruzi* em uma criança de nome Berenice, para afirmar que este agente era o responsável pelo quadro clínico anteriormente descrito⁴. Tratava-se de fase aguda da doença, e a pesquisa direta de *T. cruzi* no sangue periférico continua, 100 anos após, sendo realizada da mesma forma⁵.

O diagnóstico parasitológico pode ser aplicado nas duas fases da doença. Na fase aguda, em decorrência da elevada parasitemia, os diferentes métodos utilizados apresentam alta sensibilidade. Já na fase crônica, quando a parasitemia é mais escassa esta modalidade de diagnóstico, por ser altamente específica, visa à exclusão de reações sorológicas cruzadas, avaliação de tratamento e isolamento e caracterização de cepas^{1,2,3,6,7}.

Métodos diretos de diagnóstico parasitológico

O exame a fresco é o método mais simples para o diagnóstico parasitológico. Neste método, uma alíquota de sangue heparinizado (5 µL) obtida por punção venosa ou digital, é examinada entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico, em aumento de 400x. As coletas devem ser semanais, durante as seis primeiras semanas da doença. Este deve ser o método de primeira escolha para o diagnóstico na fase aguda, quando se verifica a alta parasitemia. É um dos métodos mais sensíveis (34% a 79%) e também o mais acessível sob todos os aspectos. Apresenta sensibilidade limitada na fase crônica quando a parasitemia é escassa^{1,2,3,5,8}.

Para melhor visualização do parasita, técnicas de coloração podem ser utilizadas com corantes panópticos como Giemsa ou Leishman. Um esfregaço é confeccionado com sangue heparinizado (5 µL) colhido da mesma forma que para pesquisa direta, ou uma gota espessa é obtida pela técnica para pesquisa de hematozoários; sendo ambas as preparações observadas ao microscópio com aumento de 400x ou 1000x^{1,2,3,5,8}.

Estas metodologias de coloração são importantes para diferenciar as forma de *T. cruzi* das de *T. (Herpetosoma) rangeli* em regiões onde existam as duas infecções. *T. cruzi* exibe dimensão menor (15 a 20 µm) do que *T. rangeli* (26 a 34 µm). Quando observados a fresco, também podem ser diferenciados pela movimentação rápida e sinuosa, de *T. cruzi*, e lenta, de *T. rangeli*^{9,10}.

As metodologias acima descritas alcançam alta sensibilidade na fase aguda e são frequentemente utilizadas na pesquisa de transmissão transfusional^{3,5,8,10}.

Existem ainda os métodos de concentração do sangue representados pelas técnicas de micro-hematócrito, teste de Strout, QBC (Quantitative Buffy Coat) e técnica de Ficoll-Hypaque que aumentam a possibilidade de detecção de baixas parasitemias^{2,3}.

Para o micro-hematócrito o sangue é centrifugado em tubo capilar heparinizado, prosseguindo-se a sua observação, ao microscópio, na interfase entre o plasma e as hemácias para o encontro dos parasitas no creme leucocitário. O capilar deve ser cortado na região dessa interfase, e o creme leucocitário observado entre lâmina e lamínula. Este procedimento, porém, oferece risco de transmissão acidental e o técnico deve estar atento às regras de biossegurança^{1,2,3}.

Na técnica de Strout são utilizados 5 a 10 mL de sangue obtidos sem anticoagulante, permitindo-se a sua coagulação. O soro, livre do coágulo, é submetido à dupla centrifugação; a primeira à 160 g por 3 minutos. Logo após, o sobrenadante é transferido para outro tubo e centrifugado, pela segunda vez, à 400g por 5 minutos para observar-se o sedimento ao microscópio³.

O *Quantitative Buffy Coat Method*[®] (QBC) é uma técnica de concentração mais utilizada para pesquisa de plasmódios, cujo modelo também foi aplicado à doença de Chagas. O sangue é centrifugado em tubo capilar impregnado com corante vital laranja de acridina que cora os núcleos das células, especialmente o DNA. As formas

tripomastigotas são observadas em um microscópio para fluorescência a 490nm^{2,3}. Desde as avaliações realizadas por Amato Neto e colaboradores, em 1996, os kits de QBC não são encontrados tão facilmente no Brasil, pelo seu alto custo^{3,11}. Uma alternativa é a coloração por meio de azul de metileno, que também é um corante vital, e sua observação pode ser realizada em qualquer microscópio de boa qualidade¹².

A técnica de Ficoll-Hypaque consiste na centrifugação do sangue heparinizado sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque, mistura de polissacarídeos hidrofílicos neutros, à 400g por 20 minutos, podendo-se encontrar os parasitas na interfase, entre o plasma e o ficoll, na camada dos mononucleares³.

Os testes de concentração do sangue apresentam 80 a 90% de sensibilidade e são recomendados quando houver forte suspeita de doença de Chagas aguda e o exame direto a fresco for negativo. Em caso da presença de sintomas, há mais de trinta dias, os métodos de concentração devem ser a primeira escolha, devido ao declínio da parasitemia com o passar do tempo. Esses métodos são também os eleitos para o diagnóstico em recém-nascidos com infecção congênita pesquisando-se a medula óssea e líquido cefalorraquidiano. Nos pacientes imunocomprometidos a pesquisa do parasita deve ser realizada em outros fluidos biológicos ou tecidos^{3,8}.

Os métodos parasitológicos diretos devem ser empregados em toda a suspeita de fase aguda por qualquer forma de transmissão, observando-se a duração estimada da parasitemia^{2,5,8,13}. Na transmissão vetorial, a parasitemia é variável sendo maior até 60 dias de evolução da doença^{3,5}; na transfusional é muito elevada, com decréscimo aos 70 a 120 dias, e a doença de base, que demandou a transfusão, contribui para esta manifestação^{16,44}; na congênita, alguns estudos mostram correlação entre parasitemia e persistência de anticorpos até 6 a 9 meses de vida, devendo-se realizar a sorologia após esse período se os exames parasitológicos forem negativos^{3,5,8,14,16}; na oral, atualmente, a forma mais frequente de transmissão no Brasil, a suspeita de infecção costuma ser negligenciada, havendo maior possibilidade de exames parasitológicos negativos^{15,17,18}; na reativação da fase crônica em indivíduos imunocomprometidos, especialmente por HIV, a parasitemia é elevada com disseminação dos parasitas até o sistema nervoso central sendo indicada a pesquisa do líquido e até de outros fluidos biológicos pelo exame direto a fresco; em acidentes de laboratório a maioria dos casos apresenta positividade ao exame a fresco, se negativo, devendo-se fazer os exames de concentração de sangue^{3,5,8,13}.

A obtenção de um exame direto positivo depende do tempo de evolução da doença e do mecanismo de transmissão. Nos primeiros dez dias esses exames são frequentemente negativos e, após trinta dias do início dos sintomas, os parasitas circulantes decrescem sendo necessário o exame de várias lâminas ou de exames sucessivos^{3,8}.

Métodos indiretos de diagnóstico parasitológico

Os métodos indiretos são métodos que visam a ampliar a parasitemia. Como são demorados seu uso é mais recomendado na fase crônica^{3,19}.

O xenodiagnóstico, descrito por Brumpt em 1914, inicialmente foi pouco utilizado²⁰. As primeiras referências do emprego desse método no diagnóstico da doença de Chagas são de Torrealba, na Venezuela, em 1934; de Emmanuel Dias, no Brasil, em 1940 e de Bacigalupo, na Argentina, em 1936⁵. O método só passou a ser utilizado rotineiramente após sua padronização por Cerisola e colaboradores, em 1974²¹. A partir de então foi um dos métodos indiretos mais submetidos a sucessivas revisões até hoje, visando à otimização dos resultados^{19,22-29}. Consiste na alimentação de ninfas de triatomíneos de qualquer espécie, principalmente *Triatoma infestans*, uma das mais adaptadas às condições de criação e manutenção em laboratório, com sangue do paciente²⁵⁻³¹. O xenodiagnóstico pode ser natural ou artificial. Para o xenodiagnóstico natural são utilizadas de 30 a 40 ninfas, de 3º e 4º estágio, em jejum, de 15 a 25 dias, contidas em frascos de plástico protegidos por tela de filó. Quando são escolhidas ninfas de *D. maximus*, uma espécie que tem grandes dimensões, utilizam-se ninfas de 1º estágio. Estes frascos são aplicados sobre a pele de braços e antebraços do paciente por 30 minutos ou até a repleção das ninfas^{2,3,5}. As ninfas de 3º e 4º estágio chegam a aumentar até cinco vezes o seu peso corpóreo; de 8 a 11 mg para 48 a 61 mg, e de 28 a 45 mg para 136 a 179 mg, respectivamente³².

O xenodiagnóstico artificial foi uma variação introduzida para evitar reações de hipersensibilidade em pacientes alérgicos ou imunocomprometidos, pacientes estes que aumentaram em número com o advento da síndrome da

imunodeficiência adquirida (AIDS). Esta metodologia evita o desconforto do contato do paciente com os insetos³³⁻³⁵. A utilização do xenodiagnóstico artificial possibilita o uso de espécies como *Rhodnius sp* e *T. palidipennis* que são altamente suscetíveis ao parasita³⁶.

Nesta técnica o sangue (cerca de 8 mL) é colhido com anticoagulante, preferencialmente heparina, colocado em frasco vedado com filme plástico especial ou condom, sem espermicidas e lubrificantes e oferecido às ninfas contidas em outro frasco³⁷⁻³⁹. No Laboratório de doença de Chagas do Instituto Adolfo Lutz segue-se a seguinte metodologia: o sangue colhido é colocado em frasco de borrel, aquecido a 37° C e vedado com filme plástico comum. O sangue é oferecido às ninfas contidas em outro frasco. O conjunto de frascos é envolto por serpentinas plásticas por onde passa água aquecida por banho-maria a 37°C, por quarenta e cinco minutos, (aparato desenvolvido no laboratório de doença de Chagas do Instituto Adolfo Lutz). Neste mesmo laboratório o xenodiagnóstico natural é aplicado somente em animais silvestres⁴⁰.

Após o repasto sanguíneo natural ou artificial os frascos com ninfas são mantidos em insetário climatizado a 26-28°C e umidade de 75 a 85%. As fezes obtidas por compressão abdominal são examinadas no método artificial aos 25, 35 e 60 dias, após o repasto, e no natural 30 e 60 dias, após a alimentação. As fezes são colocadas com uma gota de solução fisiológica entre lâmina e lamínula para observação ao microscópio com aumento de 400x para observação de tripomastigotas metacíclicas e também de epimastigotas, que podem ser vistas em caso de compressão muito intensa. A periodicidade do exame das ninfas e a forma de obtenção das fezes (compressão individual, em “pool” ou por dissecação dos insetos) variam de acordo com a experiência de cada autor^{3,41}. Em nosso laboratório realiza-se o exame individual que permite melhores resultados, uma vez que o uso de “pool” de fezes pode diluir as amostras, no caso de baixa parasitemia.

Quando utilizado na fase aguda, para evitar a demora nos resultados, a primeira observação pode ser antecipada para cerca de 15 dias após o repasto. Em nossa prática rotineira, além do exame do material fecal, faz-se a dissecação de algumas ninfas, com leitura do conteúdo intestinal. A sensibilidade do xenodiagnóstico na fase aguda é de 85 a 100 % e na maioria dos serviços, quando aplicado em pacientes crônicos, é de 50%. A especificidade também é alta, excetuando-se os casos de infecção por *T. rangeli* e a possibilidade de contaminação do insetário por *Blastocrithidia triatomae* um parasita de triatomíneos^{3,42}. As formas epimastigotas de blastocritídias são aparentemente iguais às de *T. cruzi*, com a diferença de que são mais numerosas, apresentam grande número de vacúolos em seu citoplasma e um flagelo longo ao qual podem estar aderidas formas encistadas assemelhadas à bandeirinhas de São João (*straphangers*)⁴³.

A hemocultura é um método indireto introduzido como diagnóstico parasitológico desde a década de 1940. Apresentava resultados bem inferiores ao xenodiagnóstico, não sendo então muito utilizado. Os resultados eram comprometidos, pois o sangue total era semeado em grande quantidade em poucos tubos, o que inibia o desenvolvimento das formas de *T. cruzi*^{3,5}. Após os trabalhos de Chiari e Brener, em 1966⁷, com sucessivos aperfeiçoamentos, revistos por Chiari, em 1992, voltou a ser empregado até os dias de hoje com resultados comparáveis aos do xenodiagnóstico^{44,45}. Várias modificações foram introduzidas e, atualmente, existe um consenso quanto a algumas variáveis: o volume de sangue a ser semeado deve ser de 20 a 30 mL; o anticoagulante mais usado é a heparina na concentração de 10 unidades/mL; o processamento do sangue deve ser imediatamente após centrifugação a 4°C; a separação e o descarte do plasma é fator indispensável, pois os anticorpos e o complemento podem lisar os parasitas; a semeadura somente de hemácias e do creme leucocitário é realizada em vários tubos (em geral seis tubos), para evitar a contaminação de todo o material. O meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) é o mais empregado e as culturas são mantidas em estufa a 28 °C para serem observadas mensalmente até 90 ou 120 dias. Para o diagnóstico da fase aguda, é interessante realizar leituras precoces (cerca de 15 dias)^{3,46}.

A hemocultura da mesma forma que o xenodiagnóstico é empregada para o isolamento de cepas, avaliação de tratamento e para a realização de estudos de caracterização biológica e bioquímica dos parasitas^{40, 47, 48}.

Os exames parasitológicos indiretos podem ser empregados também em estudos de campo e experimentais com diferentes mamíferos silvestres, para o isolamento e monitoramento das cepas circulantes em diferentes regiões⁴⁰.

A xenocultura é uma metodologia que consiste em semear o trato digestivo obtido por dissecação dos triatomíneos positivos no xenodiagnóstico, em meios de cultivo bifásicos, mantidos em estufa a 28 °C com observação semanal até 30 dias. Esta prática é indicada para otimizar o isolamento de cepas e não comumente para o diagnóstico de rotina^{40,49}.

A inoculação em animais suscetíveis era praticada com frequência em décadas passadas. Na fase crônica da tripanossomíase, nos primeiros anos após a sua descoberta, o diagnóstico de laboratório era feito por inoculação do sangue dos pacientes em cobaias. Chagas descreveu a presença de formas parasitárias esquizogônicas no pulmão destes animais infectados, julgando serem formas de *T. cruzi*. Este achado passou a constituir um método diagnóstico na infecção experimental de cobaias até 1913, quando foi demonstrado que se tratava, na verdade, de outro parasito, o *Pneumocystis carini*, e o método foi abandonado⁵. Atualmente esta metodologia é pouco utilizada na rotina diagnóstica. Um dos fatores limitantes é a necessidade da existência de biotérios para manutenção de animais isogênicos, como os camundongos BalbC, mais suscetíveis ao *T. cruzi*. Porém, quando há a possibilidade de sua execução, a maior possibilidade de sucesso é alcançada com a inoculação de sangue de paciente na fase aguda. São colhidos 5mL de sangue heparinizado e se procede a inoculação intraperitoneal de 0,1 mL desse sangue em camundongos machos jovens (1 mês), por serem considerados mais suscetíveis. Prossegue-se então com a observação diária do sangue retirado da cauda dos animais por 30 dias. Mesmo tendo o inóculo sido sangue de paciente em fase aguda, a parasitemia nos camundongos é baixa e persiste durante alguns poucos dias. Este método é mais utilizado em institutos de pesquisa para estudos experimentais. Pouco usado em diagnóstico de rotina, mas, todavia, é mais uma alternativa diagnóstica, quando os métodos diretos são negativos, tanto na fase aguda quanto na crônica^{2,3,5}.

Pela reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir da década de 1990, são amplificados os ácidos nucleicos do parasita^{3,8}. O método pode ser aplicado em sangue de pacientes, fezes de triatomíneos^{50,51} ou outros materiais biológicos, com alta sensibilidade, considerada por alguns autores, superior as do xenodiagnóstico e hemocultura⁵². Este método é indicado, acoplado à hibridização com sondas moleculares, como teste confirmatório, por ter apresentado resultados promissores. E, além disso, quando houver forte suspeita de fase aguda e os parasitológicos diretos forem negativos existe a indicação da associação do diagnóstico molecular às técnicas sorológicas (dosagem de anticorpos IgM). Na fase crônica também deve ser empregado quando os testes sorológicos forem duvidosos e ainda para controle de cura após tratamentos e em regiões onde existe infecção por *T. rangeli*. Porém, existe a preocupação quanto à especificidade, quando realizado em serviços de rotina. Acrescendo-se o fato de não estar disponível comercialmente. Portanto, os resultados obtidos, para terem valor diagnóstico, devem ser oriundos de instituições que compõem a rede nacional de referência para diagnóstico da infecção e controle de qualidade^{8,45,53}.

Conclusão

Os métodos parasitológicos apresentam uma sensibilidade pouco desejável. Um exame negativo não afasta a possibilidade da infecção, no entanto, um resultado positivo tem valor diagnóstico absoluto e confirma de forma indiscutível a infecção por *T. cruzi* excetuando-se a infecção por *T. rangeli*.

Todos os exames indiretos são considerados laboriosos, de custo elevado, não estando disponíveis em laboratórios comuns de análises e não sendo indicados como primeira escolha no dia a dia para o diagnóstico da fase crônica; mas a repetição seriada destas provas permite o aumento da positividade, otimizando os resultados.

A escolha do método diagnóstico para as duas fases da doença de Chagas depende das facilidades existentes em cada laboratório ou institutos de pesquisa, e o ideal seria a utilização dos vários métodos disponíveis simultaneamente.

Pode-se, então, concluir que na época comemorativa do centenário da descoberta da doença de Chagas, e considerando-se os conhecimentos atuais, os exames parasitológicos, alguns deles também desenvolvidos há 100 anos, continuam a colaborar para elucidar situações clínicas e epidemiológicas sugestivas da transmissão desta tão importante tripanossomíase.

Referências

1. Chiari E, Galvão LMC. Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. In: Dias JCP, Coura JR. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1997: 85-97.
2. Ferreira AW, Ávila SLM. Doença de Chagas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico das principais doenças infecciosas e auto imunes. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 1996. 144-49.
3. Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2000. 2: 344-78.
4. Chagas C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp. agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909; 1:159-218.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Doença de Chagas. [acesso 06 julho 2009]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=130>.
6. Castro CN. Influência da parasitemia no quadro clínico da doença de Chagas. Rev Pat Trop. 1980; 9:73-136.
7. Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. Rev Inst Med Trop S Paulo. 8: 134-38.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 3-29.
9. Gurgel-Gonçalves R, Ramalho ED, Duarte MA, Palma ART, Abad-Franch F et al. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. Rev Inst trop S. Paulo. 2004; 46 (6): 323-30.
10. Ramirez LE, Machado MI, Maywald PG, Matos A, Chiari E, Silva EL. Primeira evidência de *Trypanosoma rangeli* no sudeste do Brasil, região endêmica para doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31(1): 99-102.
11. Amato-Neto V, Matsubara L, Lanura PN. Avaliação do sistema quantitativo buffy coat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo em modelo experimental murino. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29: 59-61.
12. Ferreira CS, Bezerra RC, Pinheiro AA. Technical report methylene blue staining for *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. Rev Inst Med trop S Paulo. 2006; 48 (6): 347-49.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN). Doença de Chagas Aguda. Manual prático de subsídio à notificação obrigatória no SINAN. [acesso em: 06 julho 2009]. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_chagas.pdf.
14. Azogue E, Darras C. Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas em recién nacidos com infección placentária por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24: 105-9.
15. Shikanai YMA, Brisola Marcondes C, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1991; 33:351-357.
16. Fragata Filho A A, Correia E B, Borges Filho R, Vasconcelos MO, Janczuk D, Martins C SS. Sequência de transmissões não habituais da infecção chagásica em uma mesma família: transfusional para a mãe e congênita para o filho, de cepa de *Trypanosoma cruzi* resistente ao tratamento. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41 (1) : 248-49.
17. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E. Oral transmission of chagas' disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis. 2009; 15 (4): 653-55.
18. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM. Chagas' disease as a foodborn illness. J Food Prot. 2009; 72 (2): 441-46.
19. Luquetti AO, Gonçalves AV, Carneiro LB, Santos JF, Medeiros et al. Tentativa de correlação do xenodiagnóstico com o nível de parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1994; 27 (2): 93.
20. Brumpt E. Le xénodagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. Bull Soc Pat Exot. 1914; 7: 706-10.
21. Cerisola JA, Rohwedder R, Segura EL, Del Prado CE, Alvarez M, Martini GJW. El xenodiagnóstico. Buenos Aires. Imp Inst Nac Invest Cardiovasc. 1974; p.157.

23. Tolezano JE. Possibilidade de padronização de xenodiagnóstico. In: Ferreira AW, Tolezano JE, Wendel S, Okay TS. Controvérsias em Doença de Chagas. Instituto de Medicina Tropical. Centro de Estudos Samuel Pessoa São Paulo: Editora Segmento Farma, 2004. p 17-20.
24. Nunes EV, Campos R, Guilherme CS, Tolezano JE, Moreira AAB et al. O xenodiagnóstico da doença de Chagas: influência do sexo dos triatomíneos. Rev Soc Bras Med Trop. 1991; 24: 245-50.
25. Bronfen E, Alvarenga NJ. O xenodiagnóstico e os critérios para avaliar o nível de parasitemia do paciente chagásico crônico. Rev Bras Med Trop. 1991; 24: 37-42.
26. Borges-Pereira J, Junqueira AC, Santos LC, de-Castro JA, de-Araújo IB, Coura JR. Xenodiagnosis in chronic Chagas disease. I. The sensitivity of *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29: 341-77.
27. Moreira CJC, Perlowagora-Szumlewicz A. Attempts to improve xenodiagnosis: comparative test of sensibility using *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma vitticeps* and *Triatoma infestans* in endemic areas of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1997; 92: 91-6.
28. Borges-Pereira J, Willcox HPF, Marcondes CD, Coura JR. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. Rev Soc Bras Med Trop. 1989; 22:39-44.
29. Santos AH, Silva IG, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial em chagásicos crônicos. Rev Soc Bras Med Trop. 1995; 28: 367-73.
30. Castro CN, Alves TM, Macedo VO. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1983; 16:98-103.
31. Tolezano JE, Araújo MFL, Ribeiro SS, Ishida MMI. Efeitos do jejum e da temperatura em laboratório na infectividade de triatomíneos por *T cruzi*. Rev Inst Adolfo Lutz. 1983; 43 (1/2): 25-32.
32. Tolezano JE, Chieffi PP, Araújo MFL, Valentim AM, Ribeiro SS. Variáveis relacionadas ao desenvolvimento de *Triatoma infestans* Klug, 1834 em condições de laboratório. I Relação entre repastos sangüíneos e o desenvolvimento. Rev Inst Adolfo Lutz. 1984; 44 (1): 73-9.
33. Schenone H, Mercado AR, Castilho D. Estudio comparativo de la sensibilidad y mortalidade de las ninfas III y IV de *Triatoma infestans* usadas en el xenodiagnóstico de pacientes crónicos. Bol chil parasitol. 2000; 55: 1-2.
34. Costa CHM, Costa MT, Weber JN, Gilks GF, Castro C, Marsden PD. Skin reactions to bug bites as a result of xenodiagnosis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1981; 75: 405-8.
35. Dias JCP. Manifestações cutâneas na prática do xenodiagnóstico. Rev Bras Malariol Doenças Trop. 1968; 20: 247-57.
36. Pineda JP, Luquetti A, Castro C. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e o artificial na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31: 473-80.
37. Castro C, Santos MCA., Silveira CA. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico artificial realizado imediatamente e quatro horas após a coleta de sangue. Rev Soc Bras Med Trop. [cited 2009 July 28]; 37(2):128-130. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822004000200002&lng=en.
38. Campos R, Amato Neto V, Matsubara L, Moreira AAB, Pinto PLS. Estudos sobre xenodiagnóstico "in vitro": I. Escolha de anticoagulante e de membrana. Rev Hosp Clin Fac Med Univ S Paulo. 1988; 43: 101-3.
39. Isac E. Influência da heparina e do citrato de sódio no xenodiagnóstico artificial. Rev Pat Trop. 1994; 23: 121-43.
40. Silva IGS, Azevedo YB, Rassi A, Galvão ACR, Silva APR. Correlação existente entre a quantidade de sangue usada no xenodiagnóstico artificial e sua positividade. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31(1): 240-1.
41. Tolezano JE, Taniguchi HH, Araújo MFL, Westphalen EVN, Barbosa JAR et al. Dinâmica da circulação de *Leishmania* e *Trypanosoma* no ambiente florestado natural na ilha de São Sebastião (Ilhabela), São Paulo, Brasil. Bol Inst Adolfo Lutz. 2004; 1/2: 22-3.
42. Silva IGS, Luquetti AO, Silva HHG. Importância do método de obtenção das dejeções dos triatomíneos na avaliação da susceptibilidade triatomínica para *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 1993; 26: 19-24.
43. Cerisola JA, Del Prado CE, Rohwedder R, Bozzini JP. *Blatocritidia triatominae* n.sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. J Protozol. 1971; 18: 503-6.

44. Rocha e Silva OE, Germano PDB, Corrêa RR, Andrade JCR. Observações sobre o encontro de tripanossomatídeos do gênero *Blastocrithidia*, infetando naturalmente triatomíneos em insetário e no campo. Rev Saúde Pública. 1977. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89101977000100008&lng=en.
45. Chiari E. Parasitological diagnosis. In: S Wendel, Z Brener, ME Camargo, A Rassi editors. Chagas' disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. Editora Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São Paulo. 153-64.
46. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev Saúde Pública. 2003; 37 (1): 105-15.
47. Galvão LMC, Cañado JR, Rezende DF, Krettli A. Hemocultures from chronic chagasic patients using EDTA or heparin as anticoagulants. Braz J Med Biol Res. 1989; 22: 841-3.
48. Bronfen E, Rocha FSA, Machado GBN, Perillo MM, Romanha AJ, Chiari E. Isolamento de amostras de *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989; 84: 237-240.
49. Minter-Goeldbloed E. The primary isolation by haemoculture of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* from animals and man. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72: 22-30.
50. Bisugo MC, Nunes EV, Araújo MFL, Cunha EA, Oliveira Junior OC, Guilherme CS et al. Isolamento de *Trypanosoma cruzi*, por xenocultura, após aplicação de xenodiagnóstico in vivo e/ou in vitro em pacientes na fase crônica da doença de Chagas e na co-infecção pelo HIV. Rev Inst Inst Adolfo Lutz. 1998; 57: 89-96.
51. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in rural endemic areas. Am J Trop Med Hyg. 1994; 51: 771-77.
52. Russomando G, Rojas-de-Arias A, Almiron M, Figueredo A, Fwerreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. Exp Parasitol. 1996; 83: 62-6.
53. Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for diagnosis of Chagas' disease patients in a north-eastern endemic region of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1996; 90:129-132.
54. Okay TS. Posição atual da reação da polimerase em cadeia (PCR) quanto ao diagnóstico e ao controle do tratamento etiológico da doença de Chagas. In: AW Ferreira, JE Tolezano, S Wendel, TS Okay. Controvérsias em Doença de Chagas. Instituto de Medicina Tropical. Centro de Estudos Samuel Pessoa São Paulo: Editora Segmento Farma, 2004. 15-16.