

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

FLÁVIA MARTINS NASCENTE

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PARASITEMIA POR HEMOCULTURA  
SERIADA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS CRONICAMENTE PELO *Trypanosoma*  
*cruzi*



**Orientadora:**  
Profª Drª Ana Maria de Castro

Dissertação de Mestrado

Goiânia, 2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**FLÁVIA MARTINS NASCENTE**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PARASITEMIA POR HEMOCULTURA  
SERIADA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS CRONICAMENTE PELO  
*Trypanosoma cruzi***

**Orientadora:**

Profª Drª Ana Maria de Castro

**Colaboradores:**

Prof. Alejandro Luquetti

Ostermayer

Drª Dayse Elisabeth Campos

**Dissertação submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre, na área de concentração de Parasitologia.**

**Goiânia, 2010**

Dedico esta dissertação a Deus, aos  
pacientes,  
a querida Orientadora Ana Maria,  
ao Professor Luquetti,  
meus pais e esposo

## AGRADECIMENTOS

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há o momento debaixo dos céus... tempo de plantar, e tempo de colher o que foi plantado...”

(Eclesiastes 3:1-3)

Foram dois anos de muito trabalho e dedicação neste maravilhoso projeto. Primeiro, a dúvida se iria dar certo ou não, mas tudo foi acontecendo de uma maneira tranqüila e gratificante. Esta etapa, com certeza, me proporcionou muito conhecimento e me ajudou a conquistar outras vitórias que tanto almejei. Com imensa alegria faço meus sinceros agradecimentos primeiramente à Deus, que me deu o dom da vida, para agora poder colher os bons frutos que plantei durante esta jornada. Mas não trabalhei sozinha, esta vitória também dedico a todos que estiveram ao meu lado me dando força, conselhos e auxílio nas horas que tanto precisei:

Aos meus pais que me trouxeram a este mundo e me ensinaram O VALOR DA VIDA! Em especial à minha mãe que foi e continua sendo a grande incentivadora de meus estudos e o grande exemplo de MÃE e MULHER! Muito obrigada por tudo;

À prezada e querida Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria de Castro, pela competente e eficiente orientação e amizade. Obrigada pelo apoio e confiança depositada em mim;

Ao prezado professor Dr. Alejandro Luquetti, por me proporcionar o primeiro contato com o Laboratório de Pesquisa da doença de Chagas onde comecei a exercer minha profissão. Obrigada pelo suporte para realização deste projeto e pelas sugestões valiosas;

À Dra. Dayse, que muito facilitou minha aproximação com os pacientes, pois estes sentem muita segurança e carinho pelo trabalho por ela realizado no ambulatório;

Aos queridos pacientes, por aceitarem a participação neste estudo não impondo quaisquer obstáculos. Sem vocês eu não conseguiria atingir meu objetivo. MUITO OBRIGADA !!!

Aos primos Sérgio Henrique Nascente Costa e esposa, sempre me apoiando e incentivando profissionalmente e sendo exemplos de pessoas e profissionais biomédicos. Muito obrigada pela confiança!

Ao meu querido esposo e companheiro Carlos Ferraz, pelo apoio e pela paciência em vários momentos de ausência. Você é um grande presente que recebi de DEUS!

Ao meu irmão Rafael, mesmo distante por motivos profissionais, me passou força;

À minha amiga Liliane Siriano, quem me ensinou a realizar as primeiras hemoculturas. Obrigada pelo incentivo e pela amizade sincera;

Às amigas Juliana Boaventura e Aline Barbaresco, que muito me ajudaram no início onde quase tudo era novidade. Não sei como agradecer-las por tanto auxílio que me ofereceram quando necessitei, pelo convívio agradável e pela grande amizade que construímos. Vocês são demais!! Obrigada!!!!

À equipe do Ambulatório: Dr. Cicílio, Dra. Maria da Glória e Alice, fico agradecida pela força!

Às amigas do Laboratório de Pesquisa da doença Chagas: Rô e Suelene, que me alfabetizaram na bancada para que eu pudesse realizar assim os exames diagnósticos com segurança e qualidade;

À Denise e Nair que por muitos momentos gentilmente me auxiliaram em algumas tarefas;

À Miriam, Carolina Aguiar, Carolina Fraga, Tatiane e Ana Cláudia: durante estes dois anos muitos momentos alegres e difíceis passamos juntas. Adoro vocês!

Ao meu sogro e sogra, Sr. Juvenal Vieira da Costa e Sra. Maria Tereza, que sempre estiveram comigo me apoiando e passando muita fé e exemplo;

Aos tios José e Isa, nunca esquecerei a forma que me acolheram, como filha, quando decidi vir para Goiânia;

Aos tios Oscar e Eleuza, por ceder um lugar tão aconchegante em Goiânia onde passei momentos inesquecíveis e fiz belas amizades;

À minha madrinha Marly e tio Joaquim, pelo incentivo e amizade;

Aos meus primos que passaram momentos importantes na minha vida em Goiânia: Lucélia, Lidiane, Zacarias, Ana Paula, Cristiane, Larissa, Murillo, Danilo, Mariana;

Aos meus queridos avós, pelo grande exemplo como pessoas;

À D.Benedita, pelas palavras doces, preocupação e carinho;

Aos meus sobrinhos, pelos sorrisos e doces palavras nas horas de estresse;

Aos amigos pelo incentivo: Marcos, Alice, Pedro, aos papais Adilson e Amarílis, Eduardo e Tatiana, Fabiano e Mônica, Neiva, Leandro, Flávia Ikeda. “Amigo é coisa pra se guardar debaixo de sete chaves”!!!!

À Funepu (Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba), que proporcionou minha presença por quase cinco anos no Laboratório de Pesquisa da doença Chagas;

À ex-secretária Suelane do Ambulatório de Doença de Chagas, que no início do projeto muito me auxiliou;

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós- Graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, que por mais de dois anos tornou-se minha segunda casa. Neste ambiente conheci pessoas maravilhosas e tive a honra de poder adquirir uma bagagem de conhecimentos com ilustres professores. Muito obrigada!!!

Muito obrigada a todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho!

**SUMÁRIO****vii**

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1- O parasito e insetos vetores	3
2.2- Ciclo evolutivo	7
2.3- Mecanismos de transmissão	9
2.4- A doença	11
2.5- Diagnóstico laboratorial	14
2.5.1- Diagnóstico parasitológico	14
2.5.2- Diagnóstico imunológico	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
3.1- Objetivo geral	21
3.2- Objetivos específicos	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
4.1-Delineamento experimental	22
4.2-Pacientes	23
4.3-Classificação clínica	23
4.4- Material biológico	25
4.5- Diagnóstico sorológico	25
4.5.1- Imunofluorescência indireta - IFI	25
4.5.2- Teste imunoenzimático - ELISA	25
4.5.3-. Hemaglutinação indireta - HAI	26

4.6- Diagnóstico parasitológico	26
4.6.1 - Hemocultura	26
4.6.2- Avaliação do perfil de parasitemia pelo número de hemoculturas positivas e pelo número de tubos positivos por hemocultura	28
4.7- Criopreservação	29
4.8- Análises estatísticas	29
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
5.1- Dados epidemiológicos	30
5.2- Dados clínicos	32
5.3- Hemocultura	32
5.3.1- Avaliação do perfil de parasitemia por hemocultura seriada	32
5.3.2- Avaliação do perfil de parasitemia dos indivíduos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> por número de hemoculturas positivas	35
5.3.3- Avaliação do perfil de parasitemia dos indivíduos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> por número de tubos positivos por hemocultura	36
5.3.4- Comparação do perfil de parasitemia por número de hemoculturas positivas <i>versus</i> número de tubos positivos por hemocultura	36
5.3.5- Positividade da hemocultura em relação ao período de exame	37
5.3.6- Perfil de parasitemia por forma clínica-Cardiopatia e Forma Digestiva	38
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Formas tripomastigotas sanguíneas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
<b>Figura 2:</b> Formas epimastigotas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
<b>Figura 3:</b> Formas amastigotas intracelulares em meio de cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
<b>Figura 4:</b> Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> (simplificado)	8
<b>Figura 5:</b> Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a doença de Chagas na fase crônica	19
<b>Figura 6:</b> Delineamento experimental	22
<b>Figura 7:</b> Esquema da hemocultura, segundo Chiari et al. (1989) e Luz et al. (1994)	27
<b>Figura 8:</b> Fluxograma para avaliação do perfil de parasitemia pelo número hemoculturas e pelo número de tubos	28
<b>Figura 9:</b> Distribuição por gênero dos 50 indivíduos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
<b>Figura 10:</b> Distribuição por faixa etária dos indivíduos com sorologia convencional positiva para <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
<b>Figura 11:</b> Origem dos 50 indivíduos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
<b>Figura 12:</b> Positividade da hemocultura em três coletas independentes de sangue de 50 indivíduos infectados pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
<b>Figura 13:</b> Distribuição por gênero dos 29 indivíduos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> com hemoculturas positivas	34
<b>Tabela 1:</b> Classificação clínica dos indivíduos com sorologia convencional positiva para doença de Chagas	24

**Tabela 2:** Classificação radiológica dos grupos de megaesôfago de acordo com Rezende et al. 1960. 24

**Tabela 3:** Sensibilidade individual e cumulativa da hemocultura em três amostras de sangue coletadas de 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* 34

**Tabela 4:** Estratificação da positividade das hemoculturas com a faixa etária dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* 35

**Tabela 5:** Perfil de parasitemia dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por número hemoculturas positivas 35

**Tabela 6:** Parasitemia de 29 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em relação ao número de tubos positivos por hemocultura 36

**Tabela 7:** Comparação do perfil de parasitemia por número de hemocultura e de tubos positivos dos 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* 37

**Tabela 8:** Positividade de 49 hemoculturas em 150 amostras de 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em relação ao período de exame 37

**Tabela 9:** Relação do perfil de parasitemia por forma clínica (cardiopatia) dos 48 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* 38

**Tabela 10:** Relação do perfil de parasitemia por forma digestiva de 11 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* 39

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Cardiopatía
°C	Grau Celsius
CDC	Centro para Controle de Doenças
BA	Bahia
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
DTUs	<i>Discret Taxonômíc Units</i>
ECG	Eletrocardiograma
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FEM	Feminino
g/L	Gramas por litro
GO	Goiás
h	horas
HAI	Reação de Hemaglutinação Indireta
HC	Hospital das Clínicas
HEMO	Hemocultura
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Água oxigenada
IFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Molar
MAS	Masculino
ME	Megaesôfago
MC	Megacólon

MS	Ministério da Saúde
MG	Minas Gerais
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOL	Moles
Neg	Negativo
N <sub>2</sub>	Nitrogênio líquido
OPD	Orto-fenileno-diamina
pb	pares de base
PBS	Phosphate Buffers Saline
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
Pos	Positivo
QBC	Quantitative Buffy Coat
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação por minuto
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SBF	Soro Bovino Fetal
SC	Sorologia Convencional
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
X	Média
Xeno	Xenodiagnóstico
UFG	Universidade Federal de Goiás
µg	Microgramas
µL	Microlitros
%	Porcentagem

## RESUMO

A hemocultura tem demonstrado ser um importante método parasitológico, tanto de isolamento de *Trypanosoma cruzi*, quanto nos diagnósticos duvidosos e validação da eficácia terapêutica específica. Sua realização repetidas vezes é outro fator que aumenta sua sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de parasitemia por hemoculturas seriadas em indivíduos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, sem tratamento específico prévio. Participaram 50 indivíduos de ambos os sexos (60% sexo masculino), que realizaram três coletas de sangue venoso, com intervalo mínimo de um mês. A técnica foi de Chiari et al. & Luz et al. com meio LIT, semeando sete tubos por exame. Com uma hemocultura realizada a sensibilidade foi de 32% na primeira amostra, 32% na segunda e 34% na terceira. Com os resultados cumulativos das três amostras a positividade aumentou significativamente para 58% ( $p=0,016$ ). Analisando o perfil de parasitemia por hemoculturas positivas, 42% dos pacientes foram de baixa parasitemia (nenhuma das três hemoculturas positivas), 30% média parasitemia (uma hemocultura positiva das três realizadas), e 28% elevada parasitemia (duas ou as três hemoculturas positivas). Quando relacionado nível de parasitemia por hemocultura *versus* número de tubos positivos por hemocultura, encontramos relação direta entre parasitemia e número de tubos positivos. Pacientes que apresentaram uma única hemocultura positiva (média parasitemia) tinham um ou dois tubos positivos; com duas ou três hemoculturas positivas (elevada parasitemia) de três a seis tubos positivos por hemocultura. Analisar o número de tubos positivos por hemocultura demonstra ser suficiente para definir o perfil de parasitemia dos indivíduos com média e elevada parasitemia, sem necessidade de proceder à hemocultura seriada. Com isto pode ser agilizada a liberação do resultado quando o clínico pretende fazer tratamento específico.

## ABSTRACT

Over a hundred years have passed since the discovery of Chagas disease and it is still a serious challenge to public health. Hemoculture has shown to be an important parasitological method aiming the isolation of *Trypanosoma cruzi* as well as in doubtful diagnosis and in the validation of the specific therapeutic efficacy. Its repetitive performance is another factor that increases its sensitivity. The aim of this study was to evaluate the parasitaemia profile through serial hemocultures from chronically *T. cruzi* infected individuals without previous treatment. 50 individuals from both genders (60% males) which had venous blood collected three fold with one month of minimum interval between the collections participated of this study. The technique used was of Chiari et al. & Luz et al. with LIT medium resulting in seven tubes per examination. Resulting in one performed hemoculture the sensitivity was of 32% in the first, 32% in the second sample and 34% in the third. When adding up the cumulative results of three samples the positivity increased to 58% ( $p=0,016$ ). When we analyzed the parasitaemia profile of the positive hemocultures, 42% were of low parasitaemia (none of the three hemocultures were positive), 30% presented median parasitaemia (one hemoculture positive from the three performed), and 28% presented high parasitaemia (two or more positive hemocultures). When we related the parasitaemia level by hemoculture versus the number of positive tubes by hemocultures we found a direct relation between the parasitaemia and the number of positive tubes. Analyze the number of tubes positive blood culture proves to be sufficient to define the profile of individuals with parasitemia middle and high parasitemia, without the need for serial blood cultures. This can be expedited with the release of results when the clinician intends to make specific treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1909, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença humana, a Trypanosomiase Americana. Carlos Chagas não apenas identificou o agente etiológico da infecção, como também seu vetor e seus reservatórios, descrevendo ainda os efeitos da infecção no organismo humano (Chagas 1911). Cem anos se passaram da sua descoberta, mas esta ainda constitui um problema de saúde pública, concreto e impactante na América Latina (Dias 2007). Segundo estimativas da Organização Pan Americana da Saúde, a doença de Chagas é endêmica na América Central e do Sul, com cerca de 8 milhões de pacientes infectados e outros 100 a 120 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (PAHO 2007). No Brasil, a estimativa é de 2 a 3 milhões de pessoas infectadas, com incidência anual de uma centena de novos casos por transmissão via oral (Dias & Coura 1997, WHO 2002).

A partir da década de 70 em decorrência dos movimentos migratórios rural/urbano na América Latina, o padrão epidemiológico da infecção humana alterou-se resultando na urbanização da doença de Chagas (WHO 1997). Conseqüentemente aumentaram de início os riscos de transmissão por meio de transfusão de sangue, o que obrigou a rigorosa seleção de doadores nas regiões endêmicas. Face ao processo de globalização, indivíduos infectados em busca de melhores condições de vida se dispersaram para áreas não endêmicas da América do Norte e outros continentes, levando a riscos de transmissão por transfusão de sangue, transplantes de órgãos e a forma congênita. Em 2006, o Centro para Controle de Doenças (CDC - Estados Unidos) anunciou cinco casos de doença de Chagas adquirida por transplantes de órgãos de doadores Latino Americanos (Schmunis 2007).

Por outro lado, com a abertura constante de novas frentes agropecuárias, a partir de populações migradas de tradicionais áreas endêmicas e de todas as mudanças ambientais e comportamentais das sociedades, gerou-se um risco de dispersão da doença para novas áreas como a Amazônia brasileira, atualmente considerada endêmica para a doença de Chagas (Dias 2007; Castro et al. 2009). A região nunca foi livre da presença de *Trypanosoma cruzi*, o qual participa de um ciclo enzoótico muito bem estabelecido entre os vetores e reservatórios silvestres. Portanto as ocorrências de casos humanos da infecção nesta região têm seu risco aumentado proporcionalmente à aproximação, cada vez maior entre vetores, reservatórios de tripanossomas e o homem (Pinto et al. 2008).

A infecção humana pode ser muito grave, com mortalidade de até 5% em crianças, com menos de 5 anos, na fase aguda. Na fase crônica cerca de 30 a 40% das infecções podem evoluir para formas sintomáticas com graus variáveis de comprometimento cardíaco e/ou digestivo (Dias & Macêdo 2005), podendo produzir perdas sociais importantes, em termos de mortalidade, absenteísmo e incapacidade laboral (Dias & Coura 1997, Wilson et al. 2005). Do ponto de vista médico-trabalhista, a idade em que aparecem as manifestações cardíacas é predominantemente dos 30 aos 50 anos. Tomando-se em conta que esses casos demandam algum tipo de assistência médica, frequentemente especializada e cirúrgica, podem-se inferir os custos resultantes (Silveira 2002). A doença de Chagas ainda representa um sério desafio por não dispor de medidas profiláticas e esquemas terapêuticos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo e pela falta de um entendimento mais completo da fisiopatologia da evolução da doença crônica. Assim esta doença continua ocupando um importante lugar entre as endemias rurais, e por inutilizar muitas vidas em plena idade produtiva (Castro & Soeiro 2010)

Exames parasitológicos (xenodiagnóstico, hemocultura e PCR) e sorológicos confirmam a infecção pelo *T. cruzi*, mas também devem ser apoiados pela epidemiologia e pela clínica (Luquetti & Rassi 2000). A hemocultura tem demonstrado ser um importante método parasitológico para isolamento de cepas do *T. cruzi* (Chiari 1992), comprovação etiológica da infecção, além de ser utilizada também em casos de diagnósticos indeterminados e avaliação de eficácia terapêutica específica. Durante muitos anos este exame não foi utilizado devido aos resultados negativos, ou de muito baixa positividade, 6 a 16% (Chiari 1992). Modificações técnicas introduzidas como, a remoção do plasma, coleta de maior volume (30 mL) de sangue, processamento a 4°C e a realização deste teste repetidas vezes foram responsáveis pelo aumento da sua sensibilidade (Chiari et al. 1989, Luz et al. 1994). Como existem milhões de indivíduos infectados e candidatos a tratamento específico, estudos que evidenciam níveis de parasitemia são relevantes. A realização de hemocultura seriada poderá ser um forte aliado ao clínico, pois colabora na seleção e monitoramento de indivíduos candidatos a tratamento.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de parasitemia em indivíduos infectados cronicamente pelo *T. cruzi*, que nunca receberam tratamento prévio, por meio de hemocultura seriada.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma zoonose que emerge de um contexto bio-ecológico intimamente relacionado à forma de viver e à história natural de seu agente etiológico, o *T. cruzi* e de seus reservatórios superiores- mamíferos - e hospedeiros invertebrados-insetos vetores (Dias 2007).

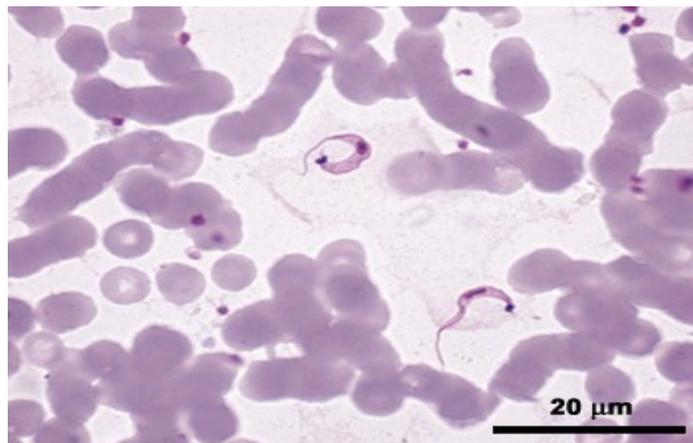
### 2.1- O parasito e insetos vetores

*T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Parasita mamíferos e tem como insetos vetores espécies de hemípteros hematófagos(triatomíneos) da família *Reduviidae* (Rey 2001).

Os *Trypanosomatidae* são caracterizados por uma alta flexibilidade de seu metabolismo energético no inseto vetor. Obtêm sua energia preferencialmente dos aminoácidos L-prolina, L-aspártico e L-glutâmico/glutamina, constituintes de hemolinfa e fluidos dos tecidos do vetor. Nos hospedeiros vertebrados, utilizam a glicose como fonte de energia na forma de ATP (Opperdoes 1995). São dez enzimas da glicólise responsáveis pela quebra da glicose em piruvato, com a concomitante produção de ATP. A via glicolítica é percebida como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas anti-tripanosomatídeos (Verlinde et al. 2001). *T. cruzi* é capaz de sintetizar alguns aminoácidos e bases como aspartato, alanina, glutamato e pirimidina, mas não consegue realizar a síntese de purina e de esteróis, que busca em seus hospedeiros. Mais de 40% de seu peso corresponde a proteínas e aminoácidos (principalmente alanina), estando demonstrada atividade de proteinases, envolvidas em seu crescimento, reprodução, diferenciação, adesão e penetração (González-Capa & Durante 1994).

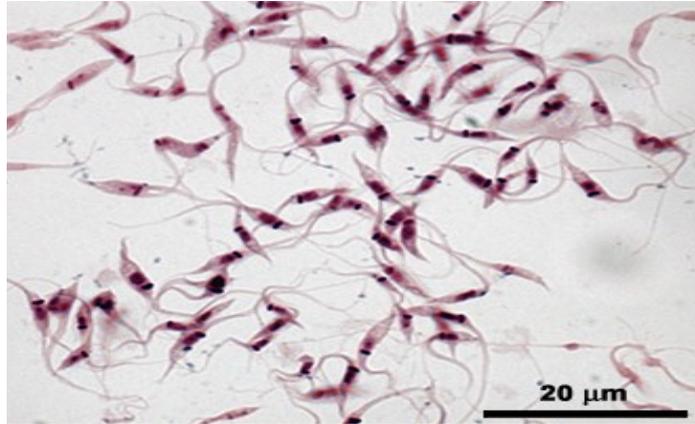
O parasito apresenta diferentes formas evolutivas no seu ciclo: epimastigota e tripomastigota metacíclico no inseto vetor, amastigota intracelular e tripomastigota sangüíneo, no hospedeiro vertebrado. Tais formas são identificadas morfologicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e a emergência do flagelo (Rey 2001).

Na forma tripomastigota (Figura: 1) o cinetoplasto, grande e redondo, situa-se na parte posterior do parasito, próximo a origem do flagelo. O flagelo percorre externamente toda a extensão do corpo celular aderido por sua longa membrana ondulante tornando-se livre na região anterior e apresenta nítido polimorfismo: formas delgadas e largas. As formas delgadas podem ser encontradas na porção posterior do intestino do inseto vetor, sangue e espaço intercelular dos hospedeiros vertebrados; culturas de células infectadas; cultivo axênico (Rey 2001). Sabe-se que as formas tripomastigotas delgadas predominam em cepas de elevada virulência para animais experimentais. As formas apresentam macrofagotropismo, desenvolvem parasitemia precoce e são mais sensíveis à ação de anticorpos circulantes, enquanto as formas largas são mais freqüentes em cepas miotrópicas e de baixa virulência em animais infectados experimentalmente (Brenner & Chiari 1963, Brenner 1965, Andrade 1974).



**Figura 1:** Formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*.  
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>)

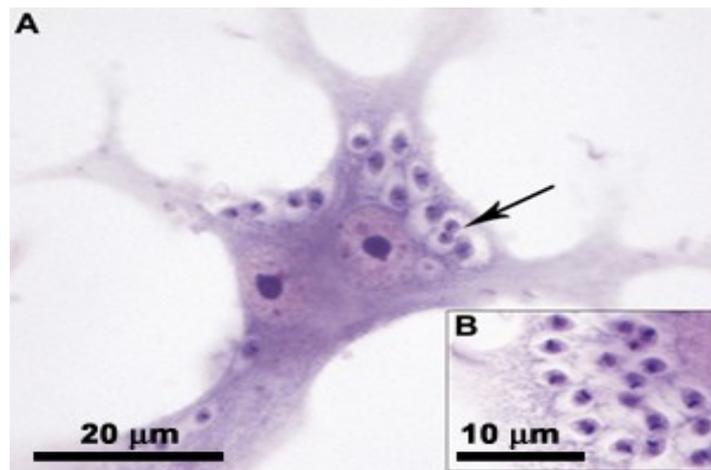
Na epimastigota (Figura: 2) o cinetoplasto em forma de barra ou bastão está localizado anteriormente ao núcleo. Pode ser encontrado no tubo digestivo do inseto vetor; cultivo axênico (Rey 2001).



**Figura 2:** Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*  
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>)

Por fim, as formas amastigotas (Figura 3) são arredondadas, com cinetoplasto visível, porém o flagelo, reduzido ao segmento intracelular, não é visível ao microscópio óptico. Esta forma pode ser encontrada no interior das células de hospedeiros infectados, bem como em cultivo celular (Rey 2001).

#### *Ninhos de amastigota*



**Figura 3:** Formas amastigotas intracelulares em cultivo celular do *Trypanosoma cruzi*  
(<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13>)

*T. cruzi* é representado por um conjunto de populações que circulam na natureza, entre o homem, vetores, reservatórios domésticos e silvestres (Andrade 1974). Em reunião de consenso realizada em Búzios-RJ em 2009, Zingales et al. propuseram a subdivisão do *T. cruzi* em seis linhagens ou DTUs (*Discret Taxonômica Units*), *T. cruzi* I, II, III, IV, V e VI. Tais cepas apresentam diferentes graus de virulência, comportamento, tropismo e variações na sensibilidade a drogas para animais experimentais e humanos (Macedo 2010).

Uma das questões atuais mais intrigantes na doença de Chagas se relaciona ao possível papel da diversidade genética de populações do *T. cruzi* na determinação das diferentes formas clínicas desta parasitose. Embora com 100 anos desde sua descoberta, pouco se conhece sobre os fatores determinantes das manifestações clínicas da doença, e mesmo a existência de um papel relevante do parasito neste processo já foi questionado. O mecanismo pelo qual as diferentes formas clínicas da doença se estabelecem, permanece obscuro. Certamente, fatores associados ao paciente estão envolvidos, mas está cada vez mais evidente a existência de um papel fundamental associado a aspectos genéticos do parasito. Uma possível explicação para esta aparente ausência de correlação é que, várias cepas de *T. cruzi* são constituídas por diferentes subpopulações ou clones que podem apresentar tropismo para diferentes tecidos (Macedo 2010).

São mais de 130 espécies de triatomíneos potencialmente vetoras da doença de Chagas. Apresentam mais ou menos competência na veiculação de *T. cruzi*, o que se relaciona a comportamento alimentar, padrão genético, comunicação química, dinâmica populacional e infectividade. No Brasil, 52 espécies de triatomíneos têm sido descritas, mas cinco têm especial importância na transmissão da doença ao homem. Por ordem de importância: *Triatoma infestans*, *T. brasiliensis*, *Panstrongylus megistus*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida* (Dias & Coura 2009) e outros como *T. rubrovaria*, no Rio Grande do Sul, e *Rhodnius neglectus*, em Goiás (MS 2005).

O Brasil recebeu no dia 9 de junho de 2006, a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da doença de Chagas pelo *T. infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (MS 2006). O número de municípios com *T. infestans* caiu de 721, em 1983, para apenas 33 em 2002 (MS 2009). Além do Brasil, a transmissão por esse vetor foi efetivamente eliminada no Uruguai (1997), Chile (1999) e em áreas significativas da Argentina, Bolívia, Paraguai e partes da América Central (Schofield et al. 2006). Apesar de todo o esforço realizado pelos órgãos de saúde, sempre há a possibilidade de reinfestação, inclusive com a substituição da espécie eliminada por outras, sendo fundamental manter

atenta a vigilância entomológica. Estudos demonstram que algumas espécies de triatomíneos são altamente antropofílicas, tendo grande capacidade de colonização e adaptação a novos habitats, o que dificulta o controle da doença. As áreas de infestação se concentram hoje, principalmente, na região do semi-árido brasileiro, onde duas espécies são ainda capturadas com muita frequência: *T. brasiliensis*, principal vetor da doença, e *T. pseudomaculata* (Argolo et al. 2008).

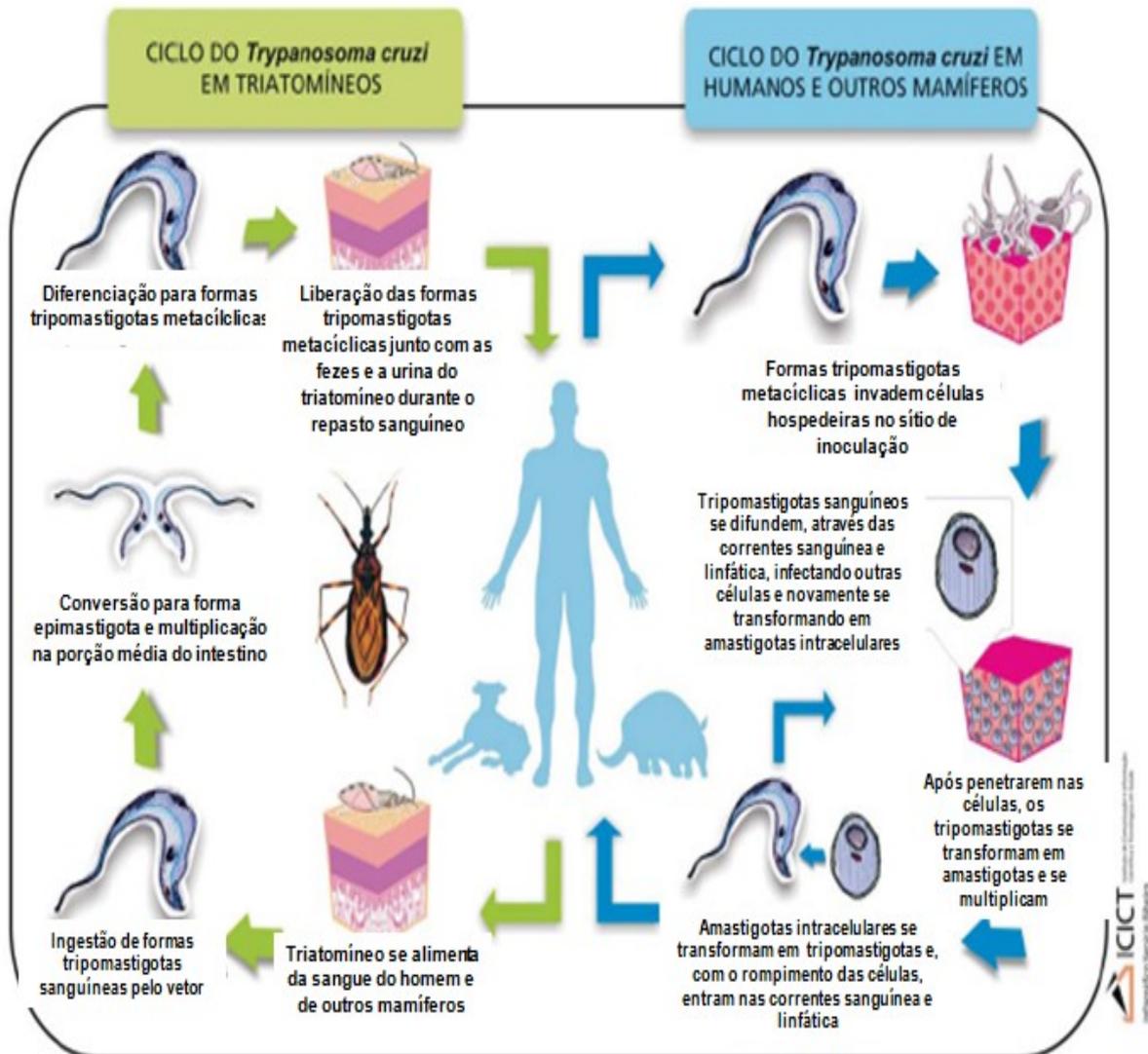
## 2.2- Ciclo evolutivo

Quando os triatomíneos sugam o hospedeiro infectado, os tripomastigotas sanguíneos ingeridos se desenvolvem ao longo do tubo digestivo, onde se diferenciam em epimastigotas (Figura 4). No intestino médio estes se multiplicam por divisão binária, transformando-se em tripomastigotas metacíclicos no reto, sendo eliminados com as fezes e urina (Brenner 1992). *T. cruzi* pode permanecer vivo e infectante em triatomíneos mortos e fezes do inseto deixadas no ambiente, por algumas horas ou mesmo dias, conforme as condições de temperatura, umidade e dessecação. Em alimentos, o parasito mostrou-se viável em experimentos com leite, carne crua e caldo de cana por algumas horas à temperatura ambiente, prolongando-se por dias ou semanas, em baixas temperaturas. Evidências experimentais sugerem que a transmissão oral pode ocorrer a partir de formas tripomastigotas, provavelmente, de amastigotas e massas celulares, originárias de mamíferos ou vetores contaminados, assim como, acidentalmente, de cultivos artificiais do parasito (Dias 2006).

No hospedeiro vertebrado estes tripomastigotas metacíclicos penetram através de solução de continuidade da pele e pelas mucosas íntegras. Invadem uma grande variedade de células nas quais se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária diferenciando-se em tripomastigotas. As células infectadas rompem-se e os tripomastigotas, apesar de não se replicarem, disseminam a infecção por todo organismo. Nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, *T. cruzi* pode induzir, em qualquer tecido ou órgão, três processos patológicos fundamentais: a resposta inflamatória, lesões celulares e fibrose. Os processos podem ser seqüenciais ou o que é mais habitual, serem simultâneos ou inter-relacionados (Lopes & Chapadeiro 1997).

Sendo assim, a interação parasito-hospedeiro é bastante dinâmica, envolvendo múltiplos fatores que atuam na patogênese da doença de Chagas. Alguns desses fatores são inerentes ao parasito, tais como polimorfismo das formas sanguíneas, tropismo tecidual,

constituintes antigênicos, carga parasitária, além daqueles relacionadas ao hospedeiro, como constituição genética, estado nutricional, idade e sexo (Brener & Gazzinelli 1997).



**Figura 4:** Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz, 2008 (Argolo et al. 2008).

### 2.3- Mecanismos de transmissão

A transmissão vetorial foi predominante nas áreas rurais por muitos anos devido às baixas condições sócio econômicas. É certo que, em alguns países do Cone Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), foi grandemente reduzida e que há tecnologia bastante para sustentar os níveis de controle alcançados. Em particular, o Brasil, Uruguai e Chile estão comemorando a eliminação do *T. infestans* em vastas regiões, o que representou significativa redução na incidência e de impacto da doença humana (Dias & Coura 1997, Schofield & Dias 1999).

Por muitos anos, o aparecimento de novos casos humanos da doença teve como principal mecanismo de transmissão a transfusão de sangue (Dias 1992; Schofield & Dias 1999). Com a vigência da legislação que obriga o controle de sangue de todo doador, por uma triagem sorológica com técnicas sempre mais sensíveis, houve redução do número de casos nesse mecanismo de transmissão.

Há de se destacar também a transmissão congênita cuja taxa nos países do Cone Sul varia consideravelmente, de acordo com a região e a metodologia usada no estudo, de 1% no Brasil até 4 – 12% na Argentina, Bolívia, Chile e Paraguai (Schmuñis & Torrico 2003, Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005). Segundo Rassi et al. 2004, em Goiás a taxa de transmissão congênita é de 0,7%. A infecção congênita pode ocorrer em 71% dos recém-nascidos de mães com infecção aguda durante a gravidez e em 1,6% na fase crônica da doença (Freilij et al. 1994). Ainda são pouco conhecidos os fatores relacionados com a transmissão congênita, mas sabe-se que a mãe pode transmitir o parasito em uma gestação e não transmitir na gestação seguinte. O grau de parasitemia e as características da população do parasito nas mães infectadas, fatores placentários, obstétricos, imunitários e de nutrição materna podem estar relacionados com esse mecanismo de transmissão (Gontijo et al. 2009).

Outros mecanismos de transmissão ocorrem eventualmente e apresentam pequena importância epidemiológica (Brener 1984), como transplante de órgãos (Dias 1987), ingestão de leite materno em mulheres que cursam a fase aguda da infecção (Medina-Lopes 1988) ou quando ocorre sangramento dos mamilos (Sarasúa 1993).

Acidentes laboratoriais também são possíveis mecanismos de transmissão chagásica. Nesses casos, a infecção pode ser devido a contato com culturas de *T. cruzi*, exposição às fezes infectadas de triatomíneos ou a sangue, de paciente ou animal, contendo a forma tripomastigota. Apesar da forma epimastigota ser a predominante em culturas axênicas,

tripomastigotas podem estar presentes e causar infecção em casos de contato com mucosas ou micro-lesões de pele. Experimentalmente, já se comprovou a possibilidade de infecção através de mucosa oral e conjuntival (Gontijo & Santos 2010).

Episódios recentes de transmissão oral foram observados em regiões brasileiras (Pará, Paraíba, Amazônia e Santa Catarina) através de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí) com o parasito, principalmente a partir de triatomíneos ou de suas dejeções. Também, pode ocorrer através da ingestão de carne crua de caça ou mal cozida, ou de alimentos contaminados por urina ou secreção de marsupiais infectados (Dias 2006). Em 2008 foram registrados 124 casos de doença de Chagas aguda no Brasil, sendo 92 no estado do Pará, dos quais 63% (58/92) estavam envolvidos em transmissão oral; 20 casos no estado do Amapá, todos por provável transmissão oral; cinco no estado do Tocantins, sendo quatro por transmissão oral e um vetorial; cinco no Maranhão; um no Ceará e um no Piauí, esses últimos por transmissão vetorial. Atualmente a concentração de casos nos estados do Pará e Amapá (MS 2009).

Os principais elementos para se controlar a doença de Chagas são: educação das populações que vivem em áreas afetadas ou sob risco (Argolo et al. 2008), ações de controle químico sistemático dos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue. A ocorrência de transmissão oral por meio de alimentos é fato comprovado em diferentes modelos experimentais e em observações de seres humanos, assim medidas práticas também devem ser adotadas quanto à prevenção, como o incentivo à higienização dos alimentos antes da preparação e consumo (Dias 2006). Não há ainda uma forma de prevenir a transmissão do parasito por via congênita, sendo a melhor estratégia a detecção precoce do caso e seu pronto tratamento (Dias 2007). Admite-se que, no ciclo silvestre, a transmissão oral seguirá sendo uma forma habitual e freqüente de circulação do parasito, independentemente das ações de controle do vetor domiciliado e da seleção de doadores infectados nos bancos de sangue (Dias 2006).

Com a globalização da doença de Chagas, muitos casos de infecção têm sido frequentemente documentados em áreas não endêmicas como América do Norte, Europa, Ásia e Oceania. Indivíduos infectados, em busca de melhores condições de vida, se dispersaram para respectivas áreas, levando a riscos de transmissão por transfusão de sangue, transplante de órgãos e a forma congênita (Castro et al. 2009). Recentemente, Estados Unidos, Espanha e França implementaram medidas para controlar o risco transfusional através da seleção dos doadores de sangue e estratégias de exclusão. No entanto, a maioria dos países europeus ainda correm o risco de serem portadores de doadores

infectados (Castro 2009). Jackson et al. (2010) estudando uma comunidade de imigrantes latino-americanos que viviam em Genebra-Suíça, observaram alta prevalência (12,8%) da doença de Chagas entre 1012 imigrantes, principalmente de bolivianos. A presença desses imigrantes também gera problemas como a dificuldade no diagnóstico e no manuseio terapêutico da doença, pelo desconhecimento da comunidade médica dos aspectos peculiares da doença (Xavier et al. 2006). A doença de Chagas é agora reconhecida como um problema de saúde pública global, não mais se restringindo somente a América Latina. Consequentemente aumentou-se o interesse das instituições de saúde pública e de indústrias farmacêuticas, de todo continente, por medidas e pesquisas que visam melhorar a qualidade de vida dos portadores desta infecção (Castro et al. 2009)

#### 2.4-A doença

A infecção chagásica caracteriza-se por uma fase aguda de intensidade e duração variáveis, ocorrendo exacerbada multiplicação parasitária, que pode ou não desencadear sintomatologia, seguida de uma fase crônica com escassos parasitos, por toda a vida do paciente (Teixeira et al. 2006).

Nos indivíduos na **fase aguda** ocorre febre e mal estar, com ou sem outras manifestações clínicas, que incluem sinais de porta de entrada (*chagoma de inoculação*-lesão nodular da pele, conseqüência de uma reação inflamatória local ou *senal de Romaña*-manifestação típica da infecção via ocular com edema bipalpebral, unilateral e enfartamento ganglionar), febre, linfadenopatia generalizada e alterações eletrocardiográficas (Cançado 1980, Brener 1992, Macêdo 2000). Porém, na maior parte dos infectados, esta fase passa despercebida (Macêdo 2000). Uma duração média de 8 semanas é o que se observa no quadro agudo clássico, em geral clinicamente mais acentuado entre crianças de baixa idade. Anatômica e imunologicamente, a história da doença de Chagas aguda se define, portanto, por uma grande invasão tecidual e hemática do parasito, provocando reações inflamatórias, destruição celular (inclusive neuronal). Também é possível detectar anticorpos IgM que coincidem com a queda da parasitemia circulante, e aumento gradual de anticorpos IgG entre a 4ª e 6ª semana de infecção (MS 2007).

A infecção materna pelo *T. cruzi* pode afetar o crescimento e a maturidade dos fetos infectados, predispondo ao abortamento, prematuridade, crescimento intra-uterino restrito e malformações (Carlier & Torrico 2003, Rassi et al. 2004). As crianças acometidas de forma congênita podem ser classificadas em assintomáticas (50 a 90% dos casos) e sintomáticas

(Carlier & Torrico 2003). Os recém-nascidos sintomáticos têm baixo peso, febre, hepatomegalia e, muitas vezes, edema, petéquias e hemorragias. A meningoencefalite manifesta-se com convulsões e tremores da face e dos membros. A icterícia pode estar presente, mas desaparece na terceira semana (Macêdo 2000).

A **fase crônica** da doença de Chagas pode ser assintomática ou apresentar manifestações cardíacas, digestivas ou neurológicas, dependendo da localização e intensidade das lesões. A forma indeterminada, também denominada latente, sub-clínica ou inaparente representa 60 – 70% dos pacientes, que permanecem sem qualquer manifestação clínica e apresentam eletrocardiograma, raios-X do tórax, cólon e esôfago sem alterações. Aproximadamente 20 – 25% dos indivíduos infectados evoluem para cardiopatia chagásica crônica, sendo a maioria dos indivíduos assintomáticos (Cunha-Neto et al. 1995). Os possíveis fatores de risco associados à progressão da cardiopatia são: o tempo de duração da doença, sexo masculino, idade, atividade física intensa, a cepa do parasito, exposição à re-infecções, fatores genéticos, etnia, severidade da infecção aguda, status nutricional, alcoolismo e outras doenças concomitantes (Prata 2001).

A cardiopatia chagásica crônica é a maior causa de morbidade por doença de Chagas manifestando-se em cerca de 30 a 40% dos indivíduos na faixa etária entre 20 e 50 anos. Estes podem apresentar prognóstico e evolução variáveis, oscilando desde pequenas alterações eletrocardiográficas até a insuficiência cardíaca ou progressão para uma eventual morte súbita (Coura et al. 1983, Dias 1992). Entre 5 e 10% dos indivíduos, são acometidos de síndromes digestivas, destacando-se a esofagopatia e a colopatia, que levam à formação dos “megas” (Cunha-Neto et al. 1995). Podem ser encontrados portadores da doença com variadas associações, ou seja, cardiopatia e esofagopatia, cardiopatia e colopatia, esofagopatia e colopatia e, por último, os três órgãos acometidos no mesmo paciente (Andreollo 2000).

Geralmente, esta infecção persiste por toda vida do hospedeiro. A possibilidade de cura espontânea em seres humanos tem sido considerada no Brasil, mas é raro (Zeledón 1988).

A resposta imune na fase crônica é caracterizada, principalmente, por uma sólida resposta humoral protetora que mantém a parasitemia subpatente e impede reagudizações espontâneas (Brenner & Chiari 1971). Existem raros parasitos circulantes e presença constante de anticorpos IgG. Há o risco de reativações de infecções subpatentes pelo uso dos imunossupressores, em casos de transplantes de órgãos, com agudização e intensificação

significativa da miocardite. O mesmo ocorre na Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), determinando quadros graves de comprometimento do sistema nervoso central (Andrade 2000).

As manifestações clínicas da infecção pelo *T. cruzi* são variáveis, dependendo de fatores extrínsecos e intrínsecos ao parasito. Em alguns países como Panamá e Venezuela, a infecção chagásica se manifesta exclusivamente na forma cardíaca. No Brasil, Argentina e Chile, as manifestações são bastante variadas. Na Bahia predomina a forma cardíaca; em Goiás a forma digestiva; em Minas Gerais observa-se uma elevada frequência de formas mistas (cardio-digestiva); no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro a maioria dos indivíduos apresenta-se na forma indeterminada (Coura et al. 1983). As razões para essa heterogeneidade geográfica e o motivo pelo qual diferentes indivíduos apresentam formas clínicas variáveis permanecem desconhecidos. Mas, muito provavelmente, são determinados pela variação genética do *T. cruzi* e aspectos relacionados ao hospedeiro. A crença de que a doença teria caráter “benigno” em determinadas áreas pode decorrer do desconhecimento ou da falta de melhor investigação (Silveira 2000).

O tratamento é uma questão ainda não completamente elucidada. Tem como objetivo a erradicação do parasito e a prevenção do aparecimento de lesões em órgãos ou do agravamento das lesões presentes (Coura et al. 1997). Embora haja divergências quanto às percentagens de cura no tratamento etiológico desta infecção, há consenso sobre a sua utilidade, a depender de circunstâncias, como: fase da doença, idade do paciente e condições associadas. O tratamento específico é considerado obrigatório em todos os casos de transmissão congênita, pela alta eficiência e segurança. Como o tratamento das gestantes infectadas não é recomendado, em virtude da toxicidade da droga disponível, a estratégia para controle da doença de Chagas congênita se apóia no diagnóstico precoce das crianças infectadas e no controle sistemático e eficiente das vias de transmissão da infecção (principalmente vetorial e transfusional) em áreas endêmicas, com o objetivo de reduzir a prevalência de mulheres infectadas (Gontijo et al. 2009). A comprovação de cura, especialmente na fase crônica, depende de fatores como o tempo de seguimento e os exames utilizados. O benzonidazol é a única droga disponível para o tratamento específico da doença de Chagas. O nifurtimox pode ser utilizado como alternativa em casos de intolerância ao benzonidazol, embora seja um medicamento de difícil obtenção e maior toxicidade, pois somente alguns países da América Latina, como a Argentina, continuam produzindo-o (Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005). O tratamento específico é

eficaz na maioria dos casos agudos (>60%) e congênitos (>95%), apresentando ainda boa eficácia em 50% a 60% de casos crônicos recentes (geralmente até 15 anos de idade). Em crônicos de longa evolução, sua eficácia não ultrapassa os 20%, conforme indica a experiência acumulada (MS 2007). Reações adversas ocorrem em cerca de 30% a 60% dos pacientes tratados na fase crônica com gravidade variável (Cançado 2002).

Atualmente, buscam-se novas drogas com alta atividade antiparasitária e melhor perfil de segurança no tratamento dos infectados. O grande desafio, além do desenvolvimento de drogas mais eficazes e com menos efeitos colaterais, é o de capacitar profissionais de saúde para o diagnóstico e tratamento da doença (Oliveira et al. 2008)

## **2.5- Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia e pela clínica e confirmado, quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial. Este oferece importantes subsídios, desde que realizado com técnicas aprimoradas, reagentes adequados e seguindo boas práticas de laboratório (Luquetti & Rassi 2000).

Os exames laboratoriais indicados para o diagnóstico da doença de Chagas vão depender da fase da doença em que o paciente se encontra: fase aguda ou crônica. (Luquetti & Castro 1997).

### **2.5.1- Diagnóstico parasitológico**

Em relação aos métodos utilizados no diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi*, os parasitológicos são de elevada especificidade (100%). Quando positivo, é de certeza, pois o agente causal é direta ou indiretamente demonstrado (Luquetti & Rassi 2000).

#### **Fase aguda**

Na fase aguda, por qualquer mecanismo de contaminação, o parasito encontra-se facilmente demonstrável em sangue periférico, poucos dias após a entrada no organismo, persistindo por um a dois meses. Neste período, a procura do parasito a fresco, entre lâmina e lamínula, torna o teste mais fácil, econômico e eficaz (Luquetti 2000) e apresenta sensibilidade em torno de 50% (Chiari 1992).

A pesquisa direta do *T. cruzi* na fase aguda pode ser feita concentrando-se os parasitos pelo método de *Strout* (Strout 1962, Flores et al. 1966) ou QBC-Quantitative Buffy

Coat (Levine et al. 1989, Amato-Neto et al. 1996), no creme leucocitário do sangue colhido em tubo capilar e microhematócrito (Fuente et al. 1985), podendo apresentar 80 a 90% de sensibilidade. Este último método é mais usado para diagnóstico da doença de Chagas congênita (Bittencourt 2000), coletando-se o sangue do pezinho da criança 10-20 dias após o nascimento ou do cordão umbilical do recém-nascido (Carlier & Torrico 2003). A coleta é de fácil execução e evita traumatismos físicos e psicológicos para a criança e a mãe. Nesta fase da infecção, apesar da elevada parasitemia, os métodos indiretos, como xenodiagnóstico e hemocultura, não são métodos de escolha para o diagnóstico, pois os resultados dependem da multiplicação dos parasitos e são obtidos entre 30 a 90 dias, retardando o diagnóstico e o tratamento precoce (Chiari et al. 2005).

Nesta fase testes sorológicos também são utilizados para pesquisa de IgM, mas atualmente há dificuldades para diagnósticos devido a escassez de kits comerciais registrados na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e carência de controles positivos. Em laboratórios de referência, recomenda-se a utilização de metodologias como IFI-IgM (Imunofluorescência Indireta com pesquisa de IgM), Western Blot e ELISA-IgM (Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005).

Caso haja forte suspeita de fase aguda da doença e os exames parasitológicos diretos resultem negativos, o diagnóstico molecular (PCR) tem apresentado resultados satisfatórios e pode ser associado a técnicas sorológicas - pesquisa de IgM (Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005).

### **Fase Crônica**

A fase crônica da infecção é caracterizada por parasitemia subpatente no sangue periférico e altos títulos de anticorpos específicos da classe IgG, sendo a sorologia indicada para diagnóstico confirmatório (Luquetti 2000).

Os métodos convencionais indiretos para identificação do *T. cruzi* (xenodiagnóstico e hemocultura) são altamente específicos e apresentam uma sensibilidade em torno de 50%, principalmente na fase crônica. Um exame negativo não afasta a possibilidade da infecção, mas um exame positivo tem valor diagnóstico absoluto. No acompanhamento de tratamento específico, a realização de testes sorológicos e parasitológicos é primordial. Se em qualquer momento da evolução do paciente houver a positividade dos exames parasitológicos, há indício de fracasso terapêutico (Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005).

O xenodiagnóstico foi descrito por Brumpt (1914) e, nos últimos anos passou por algumas modificações em geral favoráveis ao bem estar do paciente o que sem dúvida tem diminuído a resistência para esse exame (Castro et al. 2004). Vários trabalhos foram realizados substituindo o xeno natural pelo xeno artificial (Freitas et al. 1955, Santos et al. 1995, Pineda et al. 1998), desde então tem sido bastante utilizado, especialmente em ensaios clínicos, na seleção e acompanhamento de pacientes e verificação da eficácia de fármacos tripanosomicidas. Existem várias vantagens no uso da xeno artificial em relação ao natural: tempo reduzido de ocupação do paciente com coleta de sangue, cerca de quatro minutos *versus* 30 minutos na aplicação do natural; possibilidade de uso de maior número de espécies e de espécimes de triatomíneos; possibilidade de realização à distância; ausência de risco inerente ao transporte de triatomíneos; ausência de incômodo das picadas e de reações alérgicas; possibilidade de utilização em qualquer idade, sendo mais adequado para crianças, mais inquietas e menos tolerantes a procedimentos demorados; adequação para pacientes imunodeprimidos ou transplantados; não exposição do paciente à curiosidade de circunstâncias. Finalmente, quando é oferecida ao paciente a opção de escolha entre os métodos, essa recai, unanimemente, sobre o artificial (Franco et al. 2002). Outro fator importante, que pode aumentar a positividade do xenodiagnóstico, é sua repetição. Castro et al. (1983), empregando o teste de forma seriada, observaram que segundo o grau de parasitemia, a positividade em pacientes com baixa parasitemia elevou-se de 22,8% para 41,1%, no segundo exame, e para 54%, no terceiro exame. Coura et al. (1991) observaram 46,3% de positividade no primeiro exame, aumentando para 53,2% no segundo e para 57,7% no terceiro.

A hemocultura começou a ser utilizada na década de 50, com resultados inicialmente inferiores aos obtidos pelo xenodiagnóstico (Chiari & Galvão 1997). A hemocultura tem demonstrado ser um importante método de isolamento de cepas do *T. cruzi* (Chiari 1992), já que esse parasito é facilmente cultivável em meios de cultura acelulares contendo componentes como sais, proteínas e derivados de hemina. A sua positividade parece depender tanto da natureza do meio de cultura como da técnica empregada e modificações na metodologia têm aumentado a sua positividade, melhorando os resultados (Chiari et al. 1989, Luz et al. 1994).

Chiari et al. (1989) obtiveram uma taxa de hemocultura positiva de 55,08% com a aplicação de modificações como a lavagem das células com meio LIT ou PBS e remoção imediata por centrifugação, incubação das culturas a 28°C e exames no 15°, 30°, 45° e 60°

dias de cultivo. Quando não era possível o imediato processamento, o plasma era removido, ao sedimento era acrescentado meio LIT, e o material preservado a 4°C até processamento de toda técnica.

Luz et al. (1994), utilizando a metodologia proposta por Chiari et al. (1989), demonstraram a importância do processamento rápido, no máximo em 4 horas e à baixa temperatura, do material coletado de 52 indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, na fase crônica, obtendo 79% de positividade quando realizaram uma única hemocultura e 94% com três amostras consecutivas. Em relação ao tempo de exame deste método, um estudo comprovou que 82% das hemoculturas foram positivas entre 30-60 dias, sendo que 9,8; 6,1 e 1,2% positivaram aos 90, 120 e 150 dias, respectivamente (Castro et al. 2002).

Nas últimas décadas, várias linhas de pesquisa na área da biologia molecular tiveram grandes avanços, assim a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tem sido utilizada como alternativa no diagnóstico e caracterização do *T. cruzi* (Moser et al. 1989, Diaz et al. 1992, Ávila et al. 1993, Gomes et al. 1998), sendo recomendado como técnica parasitológica complementar devido a sua superioridade em relação aos métodos convencionais do xenodiagnóstico e hemocultura (Britto et al. 2001). Na técnica de PCR a estratégia mais empregada para a detecção do DNA do *T. cruzi* foi a amplificação do fragmento de 330 pares de base (pb) do minicírculo de kDNA (95% do DNA total do cinetoplasto), na presença de um único parasito em 20mL de sangue (Ávila et al. 1991).

Na fase crônica da doença, o teste de PCR seguido de hibridização tem se mostrado uma alternativa para a comprovação do parasito, devido à sua capacidade de detectar quantidades mínimas de DNA, em função da baixa parasitemia. Gomes et al. (1998), analisando sangue de pacientes com doença crônica, encontraram 50% de positividade na PCR, com iniciadores de 330 pb com aumento para 83,5% ao se empregar a hibridização. Ávila et al. (1993) e Carriazo et al. (1998), em outro estudo encontraram uma sensibilidade de 96,5% a 100% na PCR associada à hibridização. Porém, no Piauí, comparando a PCR com outras duas técnicas parasitológicas clássicas, em pacientes infectados, verificou-se positividade de 34% ao xenodiagnóstico, 25,7% à hemocultura e 59,5% à PCR (Coura et al. 1996). A positividade da PCR apresenta resultados variáveis, para detecção do *T. cruzi*, os quais parecem depender dos iniciadores utilizados, do volume de sangue coletado, origem geográfica da população estudada, faixa etária, parasitemia e mesmo das características genéticas das cepas do parasito (Lages-Silva 2001). A positividade desta técnica também é influenciada pelo número de amostras coletadas por paciente, Castro et al. (2002) pela PCR

seriada, amplificaram o kDNA do *T.cruzi* de 86,7%(52/60) dos indivíduos portadores da doença de Chagas.

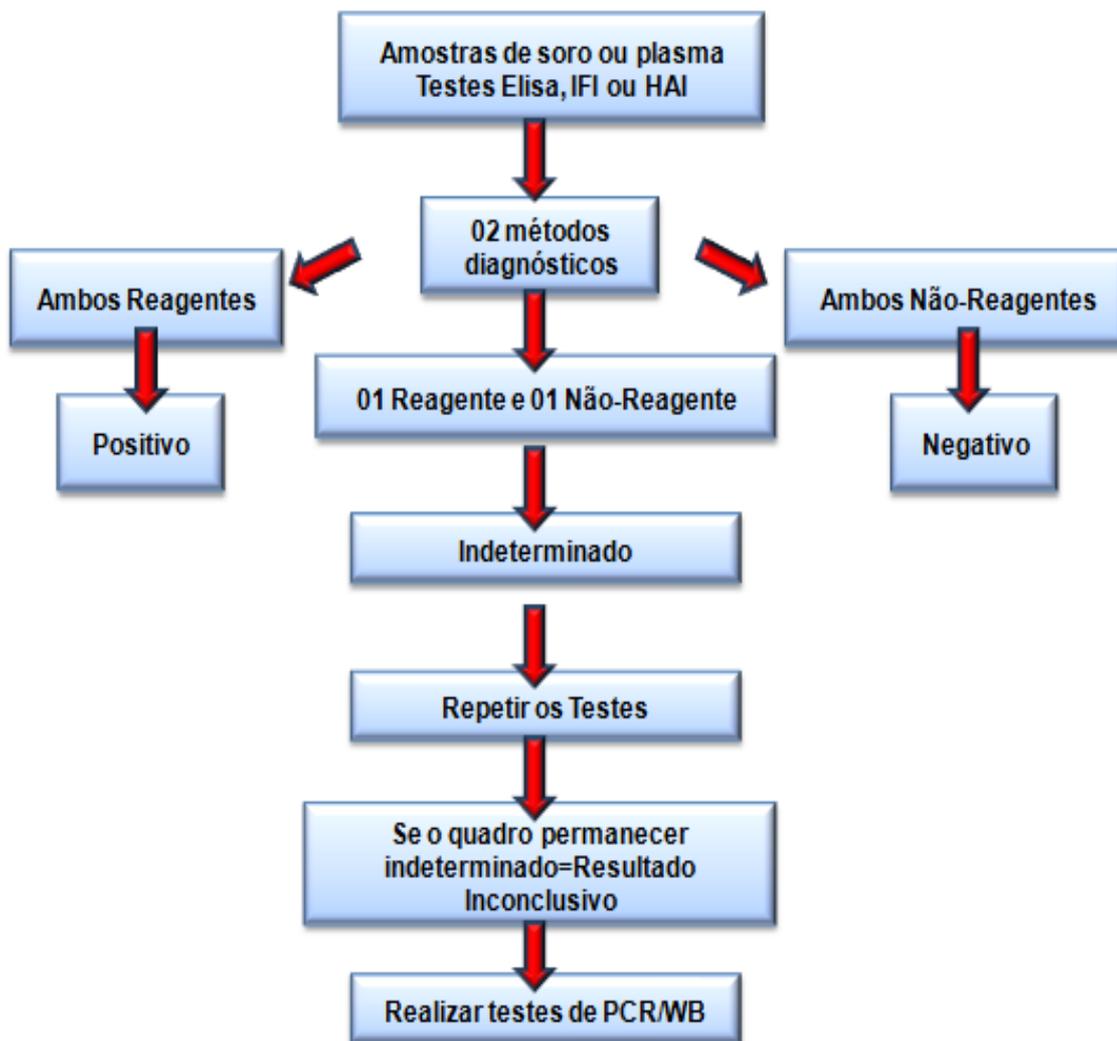
A PCR é um método também empregado em estudos comparativos com outras técnicas sorológicas ou parasitológicas e de extrema importância na avaliação da eficácia do tratamento específico da doença de Chagas (Britto et al. 2001). É de importância na definição do diagnóstico de indivíduos com resultados discrepantes nos exames sorológicos, levando a uma redução de falsos positivos e negativos encontrados (Salles et al. 1996). Por este motivo podendo ser utilizada em bancos de sangue quando os resultados sorológicos são inconclusivos (Carvalho et al. 1993). A técnica deve ser realizada usando a mesma metodologia com protocolos definidos, devendo ser desenvolvidos procedimentos operacionais padronizados (Bittencourt 2000, Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005).

### **2.5.2- Diagnóstico imunológico**

O grau de excelência do diagnóstico da doença de Chagas tem sido alcançado basicamente por três testes sorológicos: a imunofluorescência indireta (IFI) que apresenta elevada sensibilidade, sendo ideal para estudos epidemiológicos, assim como para diagnóstico, embora apresente reações cruzadas, em particular com leishmanioses; a hemaglutinação indireta (HAI) e a ELISA (Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay). Elas são indicadas principalmente na fase crônica, em decorrência do desempenho pouco satisfatório das técnicas de diagnóstico parasitológico (Bulhões et al. 2004).

O diagnóstico imunológico se apóia em evidências indiretas da presença do parasito, deduzindo-se que o mesmo existe por detectarmos anticorpos anti-*T. cruzi*, o mesmo não está isento de erros ou de problemas de interpretação, falsos positivos e falsos negativos (Luquetti & Castro 1997).

De acordo com o Consenso Brasileiro em doença de Chagas (2005), o diagnóstico na fase crônica, deve ser realizado com dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito ou a IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*), conforme descrito no fluxograma apresentado abaixo (Figura 05).



**Figura 05:** Fluxograma para a realização de testes laboratoriais para a doença de Chagas na fase crônica. PCR (Polymerase Chain Reaction); WB (Western Blot).

Fonte: Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005/Ministério da Saúde 2005.

Tais testes são preferidos na prática atual e vêm sendo utilizados há mais de 20 anos, em todos os países da América Latina, com resultados satisfatórios, pois permitem o diagnóstico em mais de 95% dos infectados (Luquetti & Rassi 2000). Essas técnicas, pelo elevado grau de confiança, têm sido aplicadas na avaliação do comportamento da infecção, na avaliação do impacto das medidas de controle vetorial em áreas endêmicas, no controle da transmissão transfusional, por excluir chagásicos candidatos à doação, e na avaliação da eficácia do tratamento específico da infecção chagásica.

Testes sorológicos, não convencionais (que utilizam antígenos purificados ou recombinantes ou peptídios), podem também ser empregados, desde que acompanhados de um dos três convencionais. Outros empregam novas tecnologias, como a quimioluminescência, a precipitação em gel, o emprego de fitas de nitrocelulose contendo antígenos, e o Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS-scan). Estes testes apresentam maior rapidez nos resultados e especificidade aumentada, porém a maioria apresenta, em maior ou menor grau, sensibilidade menor, além de aumento dos custos (Luquetti 2000).

Em regiões onde existem simultaneamente leishmaniose (tegumentar ou visceral) e doença de Chagas, podemos encontrar indivíduos com soros apresentando títulos relativamente baixos de anticorpos anti-*T. cruzi*, fenômeno chamado de reação cruzada. Por vezes torna-se difícil a distinção entre portador de *T. cruzi* e leishmaniose. Nesses casos pode ser indicada a realização de técnicas especiais (Luquetti & Castro 1997).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

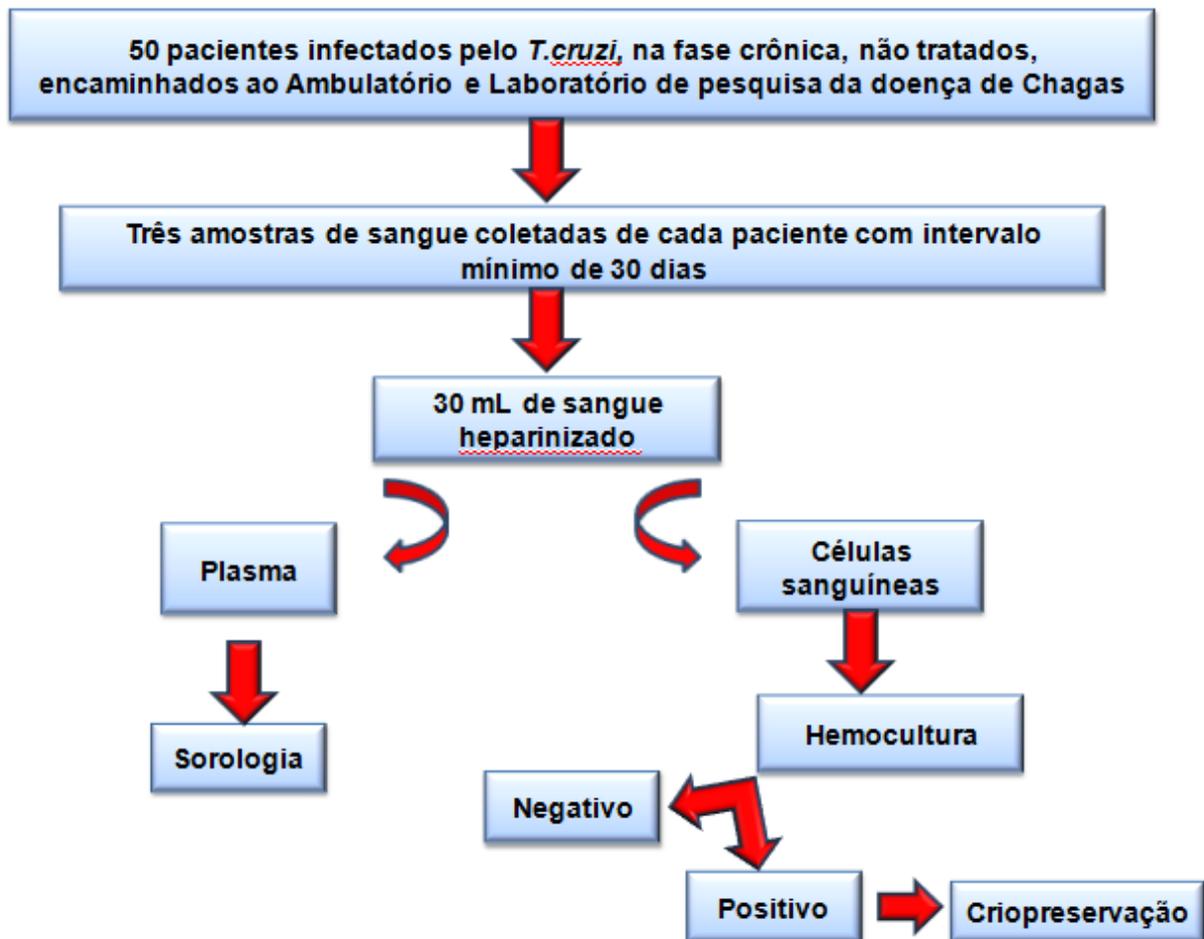
Avaliação do perfil de parasitemia, por hemoculturas seriadas, num grupo de 50 indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, na fase crônica, não submetidos a tratamento específico prévio, encaminhados ao Ambulatório e Laboratório de Pesquisa da doença de Chagas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- ✓ Avaliar a sensibilidade da hemocultura individual e cumulativa utilizando três amostras de sangue colhidas em diferentes períodos para cada paciente;
- ✓ Relacionar o perfil de parasitemia dos indivíduos com doença de Chagas por hemocultura seriada e o número de tubos positivos por hemocultura;
- ✓ Analisar a relação entre parasitemia, idade, sexo e naturalidade;
- ✓ Relacionar o perfil de parasitemia e forma clínica dos indivíduos;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- Delineamento experimental (Figura 6)



#### **4.2- Pacientes**

Aceitaram participar do projeto, 54 indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, sendo que quatro não voltaram para segunda e terceira coleta. A hemocultura seriada foi realizada com sangue de 50 indivíduos na fase crônica, não tratados, de ambos os sexos, atendidos e acompanhados no Ambulatório e Laboratório de Doença de Chagas do Hospital das Clínicas da UFG, Goiânia/GO, com sorologia convencional positiva confirmada pelo laboratório acima referido.

Os indivíduos envolvidos neste projeto foram esclarecidos quanto aos objetivos do mesmo, e dele participaram somente aqueles que concordaram e assinaram o termo de consentimento para a coleta de três amostras de sangue venoso, colhidas com intervalo mínimo de 30 dias e utilização do seu sangue e produtos. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo CEPMHA/HC/UFG N° 058/2008) do Hospital das Clínicas da UFG, Goiânia-GO (Anexos: 9.1 e 9.2).

Os médicos do ambulatório: Dr<sup>a</sup> Dayse Elisabeth Campos, Dr Cicílio Alves Moraes e Dr<sup>a</sup> Maria da Glória Merheb Vaz, responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes, orientaram sobre a doença e fizeram a avaliação clínica adequada e, quando necessário farão a instituição do tratamento específico. Tudo isso visando melhorar a qualidade de vida do portador da doença de Chagas.

#### **4.3- Classificação clínica**

Dos 50 indivíduos com sorologia convencional positiva, 48 foram classificados, de acordo com Rassi Jr & Rassi (1998), considerando o eletrocardiograma (ECG) em: sem cardiopatia; cardiopatia grau 1; cardiopatia grau 2 e cardiopatia grau 3 (Tabela: 1). Dois pacientes ainda não foram classificados quanto à forma clínica, pois ainda não realizaram o eletrocardiograma

**Tabela 1:** Classificação clínica dos indivíduos com sorologia convencional positiva para doença de Chagas de acordo com Rassi Jr & Rassi (1998).

<b>Formas clínicas</b>	<b>Alterações radiológicas e eletrocardiográficas</b>
Sem cardiopatia	RX-tórax normal e/ou ECO normal ECG-normal
Cardiopatia grau 1	Cardiopatia de grau leve
Cardiopatia grau 2	Cardiopatia de grau moderado
Cardiopatia grau 3	Cardiopatia de grau avançado (insuficiência cardíaca congestiva, ICC)

Os indivíduos incluídos na forma digestiva foram distribuídos de acordo os exames radiológicos (RX do esôfago e/ou enema) e sintomas clínicos apresentados em: portadores de megaesôfago (ME); megacólon (MC); megaesôfago e megacólon (ME+MC); megaesôfago e alterações cardíacas (ME+C); megaesôfago, megacólon e alterações cardíacas (ME+MC+C). Os pacientes com megaesôfago foram classificados em grupos (I a IV) considerando o diâmetro e o tônus do esôfago determinados pelo estudo radiológico e operados (Rezende et al. 1960);(Tabela 2).

**Tabela 2:** Classificação radiológica dos grupos de megaesôfago de acordo com Rezende et al. 1960.

<b>Grupos</b>	<b>Características</b>
I	Esôfago tem diâmetro aparentemente normal ao exame radiológico, trânsito lento com pequena estase do contraste
II	Esôfago com aumento moderado de calibre correspondendo a duas vezes a dilatação (3-6 cm) da luz do esôfago normal (2,5cm), com apresentável retenção do contraste. Presença de ondas terciárias associadas ou não à hipertonia do esôfago.
III	Esôfago com grande aumento de calibre (6-10 cm), hipotonia da porção inferior, atividade motora reduzida ou inaparente, grande retenção do contraste
IV	Esôfago com grande capacidade de retenção de contraste, atônico, alongado, dobrando-se sobre a cúpula do diafragma ou casos gigantes nos quais ocorre uma dilatação superior a 10 cm

#### **4.4- Material biológico**

Foram coletadas três amostras do sangue periférico de cada paciente, por punção venosa, em tubos de *vacutainer*, num total de 30mL cada, destinados a hemocultura e sorologia, com intervalo de 30 dias.

#### **4.5- Diagnóstico sorológico**

Todas as amostras dos soros coletados foram submetidas aos testes sorológicos convencionais: Imunofluorescência Indireta- IFI (Camargo 1966), Hemaglutinação Indireta- HAI (Camargo et al. 1973) e o ensaio Imunoenzimático-*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*-ELISA (Voller et al. 1975).

##### **4.5.1-Imunofluorescência indireta (IFI)**

Este ensaio consistiu na reação de soros diluídos numa diluição inicial de 1:10, com antígeno de epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y) de cultivo, fixados em lâminas de microscopia convenientemente demarcadas, confeccionadas no próprio laboratório. As lâminas foram incubadas durante 30 min, a 37° C. Após três lavagens sucessivas em recipientes próprios com PBS, procedeu-se a incubação com conjugado (FITC-Biomerieux®, França), nas mesmas condições anteriores, seguidas de novas lavagens. Essas lâminas, que secaram a temperatura ambiente, foram montadas com glicerina tamponada e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência, cuja luz ultravioleta ativa o isotiocianato de fluoresceína, presente apenas nos parasitos que apresentam anticorpos ligados à sua superfície. Os epimastigotas apresentam coloração verde- maçã. Na ausência de anticorpos, os parasitos permanecem com coloração vermelho- tijolo, tênue. Foram considerados positivos os soros que apresentaram fluorescência superior a 1:40.

##### **4.5.2- Teste imunoenzimático (ELISA)**

Formas epimastigotas do *T. cruzi* (cepa Y), obtidos a partir de cultura “*in vitro*”, foram adsorvidos nas cavidades de microplacas. Após a incubação com soro de 2h e lavagem, adicionou-se o conjugado previamente testado e titulado, composto por anticorpos anti-IgG humana conjugada com a enzima peroxidase (Sigma Chemical® Co, USA). Após 2h de incubação a 37° C e novamente lavadas, adicionou-se substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o cromógeno (orto-fenileno-diamina- OPD), substância incolor que adquire coloração sob ação do

substrato. A reação foi interrompida após 30min com adição de ácido sulfúrico 2,5M. A seguir, procedeu-se a leitura da intensidade da cor obtida em cada poço da microplaca com auxílio de espectrofotômetro (Tekam-Espectra Classic®, USA) que, indicou a reatividade de cada cavidade em densidade óptica (DO). Foram consideradas positivas todas as amostras que possuíram DO uma vez maior que o ponto de corte. O valor do ponto de corte (*Cut off*) foi determinado por placa. Este valor foi calculado a partir da média dos controles negativos duas vezes o desvio padrão destes, sendo que o índice de referência foi calculado pela divisão da DO pelo *cut off*.

#### **4.5.3- Hemaglutinação indireta (HAI)**

Consistiu na diluição progressiva dos soros, inicialmente de 1:40 seguida de diluição seriada por quatro poços em microplacas de poliestireno com 96 poços, de fundo em “U”, com capacidade de 0,25mL por poço. A seguir adicionou-se o antígeno, constituído pelas hemácias sensibilizadas (kit-Wiener®). Após 1 a 2h em repouso a temperatura ambiente, realizou-se a leitura da imagem obtida em cada poço. Reações negativas foram visualizadas como imagens puntiformes de hemácias sedimentadas no fundo do poço, de cor vermelha intensa. Na existência de anticorpos, estes provocaram a sedimentação das hemácias em “tapetes” que cobriram todo o fundo do poço, de cor vermelha tênue. Os soros foram considerados reagentes quando apresentaram título maior ou igual a 1:40.

Os anticorpos interferentes, que podem causar aglutinação inespecífica, foram eliminados com adição da solução protéica que possui inibidores destes anticorpos.

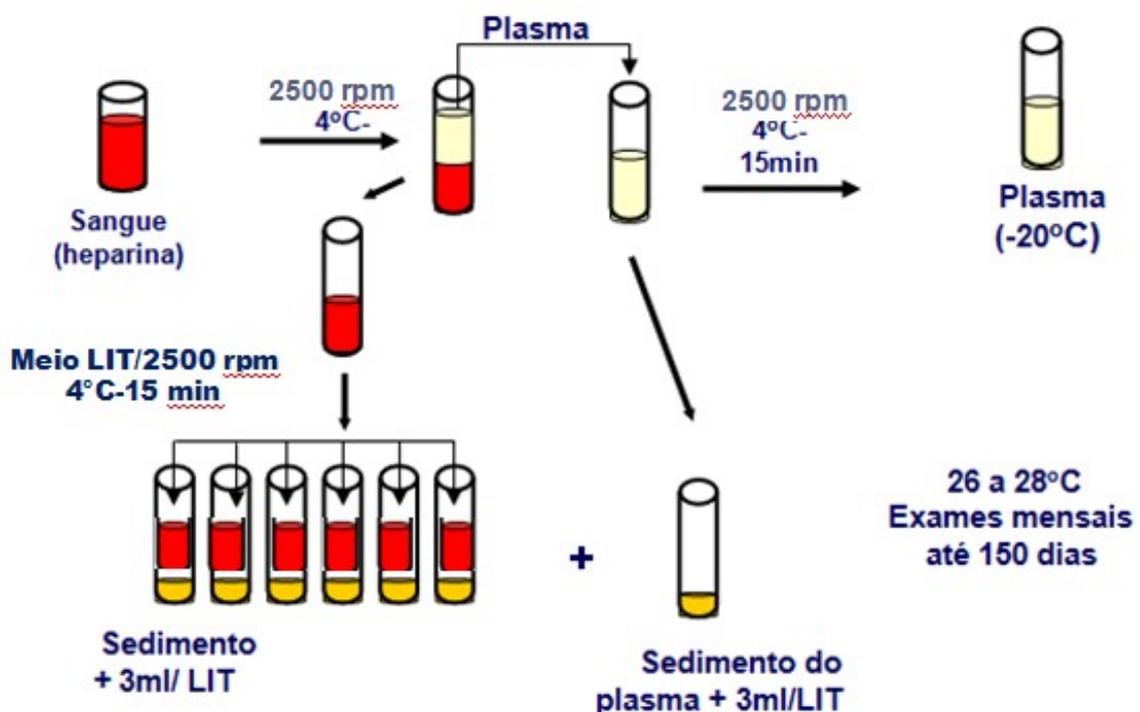
#### **4.6- Diagnóstico parasitológico**

##### **4.6.1.- Hemocultura**

Foram realizadas três hemoculturas por paciente, com intervalo mínimo de um mês, resultando num total de 150 testes. Para cada hemocultura em meio LIT, foram colhidos 30mL de sangue por indivíduo, conforme idealizado por Yaeger e descrito por Fernandes & Castellani (1964) e Camargo (1964). O protocolo utilizado foi o de Chiari et al. (1989) com algumas modificações sugeridas por Luz et al. (1994). O sangue venoso foi colhido utilizando-se tubos *vacutainer* contendo heparina sódica e processado no máximo em 4h (Figura 7).

O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm durante 10 min a 4°C em centrífuga (Janetzki-K24). O plasma foi removido para tubo plástico estéril de 15mL (Falcon, USA ) e centrifugado a parte. Ao sedimento do plasma foram adicionados 3mL de LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Ao sedimento de hemácias foram adicionados igual volume de meio de cultura LIT (Camargo 1964) e centrifugado a 2.500 rpm durante 10 min a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de hemácias resuspendido em meio LIT, homogeneizado e alíquotas de 2-3mL distribuídas em seis tubos plásticos estéreis de 15mL (Falcon, USA ) contendo 3mL de meio LIT, contabilizando um total de sete tubos.

Os tubos foram mantidos em estufa BOD (General Electric- FANEM-LTDA) a 28°C e homogeneizados duas vezes por semana para aeração. Alíquotas de 10µL da suspensão de cada tubo foram examinadas entre lâmina e lamínula ao microscópio com aumento de 400X aos 30, 60, 90, 120 e 150 dias após o repique. Para cada hemocultura foram realizados 35 exames microscópicos, que multiplicado por 150 hemoculturas totalizaram 5.250 exames microscópicos. A partir das hemoculturas positivas foram realizados cultivos em meio LIT e os isolados criopreservados em N<sub>2</sub> líquido a -196°C (Figura 7).

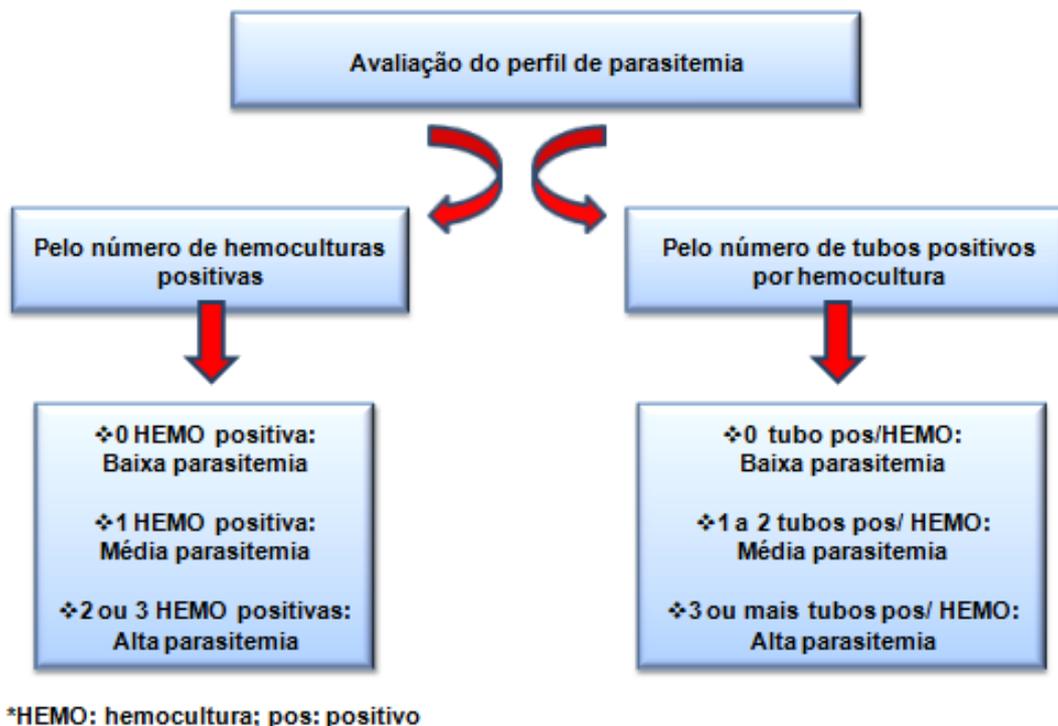


**Figura 7:** Esquema da hemocultura, segundo Chiari et al. (1989) e Luz et al. (1994).

#### 4.6.2- Avaliação do perfil de parasitemia pelo número de hemoculturas positivas e pelo número de tubos positivos por hemocultura

O nível de parasitemia do indivíduo pode ser classificado pelo número de hemoculturas positivas (Figura 8), quando é possível realizar mais de um teste. Foram considerados como indivíduos de baixa parasitemia, aqueles que não apresentaram nenhuma das três hemoculturas positivas, média parasitemia com uma hemocultura positiva em três realizadas e elevada com duas ou mais hemoculturas positivas (Luquetti & Rassi, 2000, Castro et al. 2002).

A parasitemia também pode ser analisada individualmente pelo número de tubos que positivam durante os 150 dias de análise (Figura: 8). O indivíduo é classificado como de baixa parasitemia se, nenhum tubo se positivou neste período; média parasitemia, se um ou dois tubos forem positivos e alta, se três ou mais tubos forem positivos (Luquetti & Rassi, 2000, Castro et al. 2002).



**Figura 08:** Fluxograma para avaliação do perfil de parasitemia pelo número de hemoculturas positivas e pelo número de tubos positivos por hemocultura.

#### **4.7- Criopreservação**

Para todas as hemoculturas positivas a partir de sangue de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, não contaminadas por bactérias ou fungos, os parasitos foram criopreservados para futuros estudos. Resumidamente, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e ao sedimento contendo os parasitos, adicionou-se 1mL de LIT. À essa suspensão acrescentou-se 10% de glicerina seguido de homogeneização manual. Em seguida foram feitas alíquotas de 1mL distribuídas em criotubos de polietileno, os quais foram estocados a -70°C por 24 a 48h e a seguir em nitrogênio líquido a -196°C.

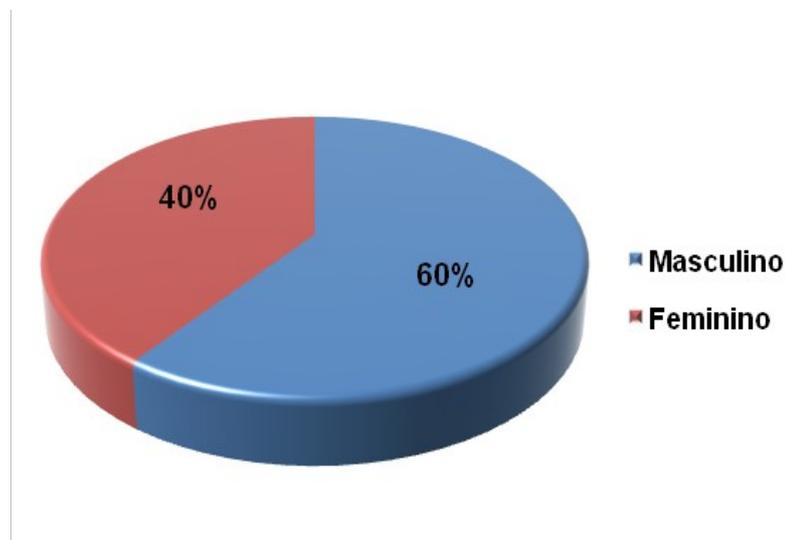
#### **4.8- Análises estatísticas**

Para os cálculos estatísticos foi utilizado o teste Teste  $X^2$  (qui- quadrado), programa EpiInfo version 6 (Dean et al. 1994).

## 5. RESULTADOS

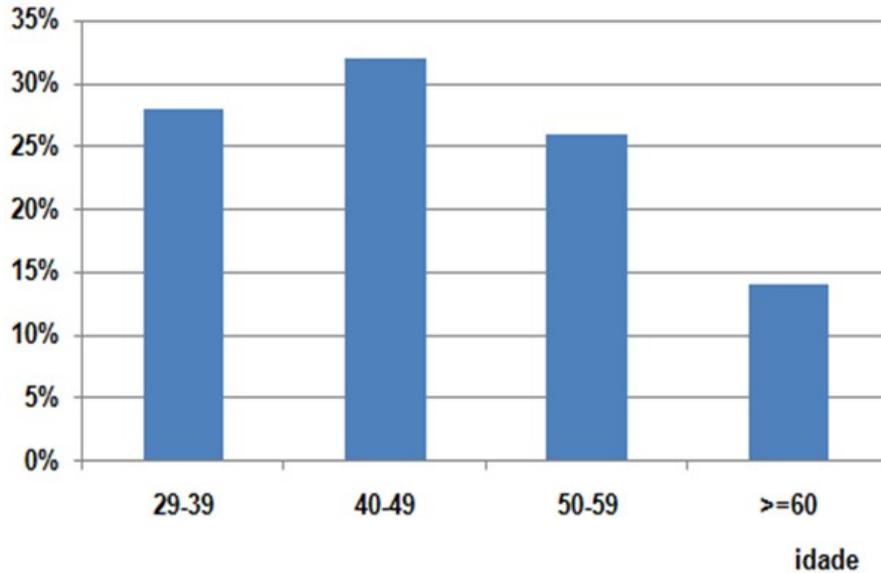
### 5.1- Dados epidemiológicos

Neste trabalho foram acompanhados 54 indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Destes, quatro foram excluídos, pois só participaram da primeira coleta de sangue. Dos 50 pacientes 46% foram triados por Bancos de Sangue, 42% pelo serviço ambulatorial e 12% por serviços externos ao Hospital das Clínicas/UFG. Todos foram submetidos à coleta de sangue e tiveram a sorologia convencional (SC) confirmada no Laboratório de Pesquisa da doença de Chagas do Hospital das Clínicas da UFG-Goiânia/GO. Em relação ao sexo, 40% (20/50) são do sexo feminino e 60% (30/50) do sexo masculino (Figura 9).



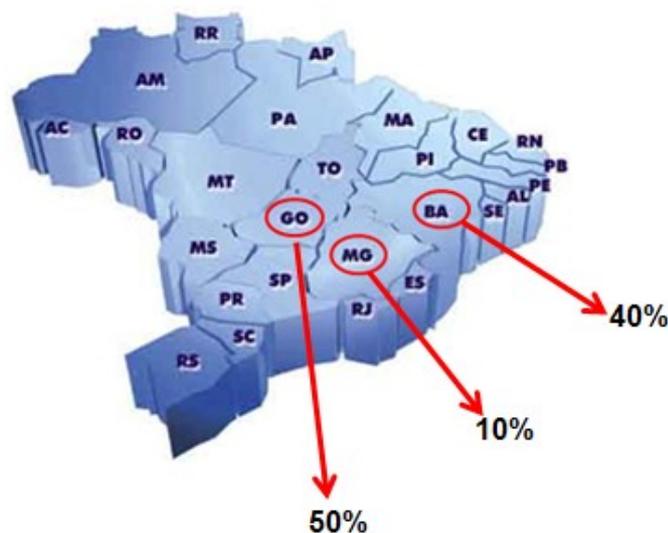
**Figura 9:** Distribuição por gênero dos 50 indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* - Goiânia (GO), Brasil 2010.

A faixa etária variou entre 29 e 77 anos ( $\bar{X}$  = 46,7 anos  $\pm$  11,2 anos), assim distribuída: 28% (14/50) com idade entre 29-39 anos, 32% (16/50) entre 40-49 anos, 26% (13/50) entre 50-59 e 14% (7/50) igual ou superior a 60 anos (Figura 10).



**Figura 10:** Distribuição por faixa etária dos indivíduos com sorologia convencional positiva para *Trypanosoma cruzi*-Goiânia (GO), Brasil 2010.

Analisando a procedência foi possível detectar que, neste grupo todos os indivíduos nasceram em regiões endêmicas, sendo 50% (25/50) em Goiás, 40% (20/50) na Bahia e 10% (5/50) em Minas Gerais (Figura 11)



**Figura 11:** Origem dos 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* - Goiânia (GO), Brasil 2010. GO-Goiás / MG - Minas Gerais / BA-Bahia.

## 5.2- Dados clínicos

A classificação clínica para cardiopatia, dos 48 indivíduos com sorologia positiva foi realizada de acordo com a avaliação do eletrocardiograma (ECG). Para as formas digestivas a avaliação foi de acordo com exames clínicos e radiológicos.

Dos 48 indivíduos que realizaram ECG, 50% (24/48) foram classificados sem cardiopatia, 23% (11/48) com cardiopatia grau 1, 25% (12/48) com cardiopatia grau 2 e 2% (1/48) com cardiopatia grau 3.

Quanto à forma digestiva dos 48 pacientes, 23% (11/48) apresentaram alterações. Destes:

27,3% (3/11) são portadores de megaesôfago (ME);

9,1% (1/11) de megaesôfago e megacólon (ME+MC);

45,4% (5/11) de megaesôfago e alterações cardíacas (ME+C);

9,1% (1/11) de megacólon e alterações cardíacas (MC+C) e

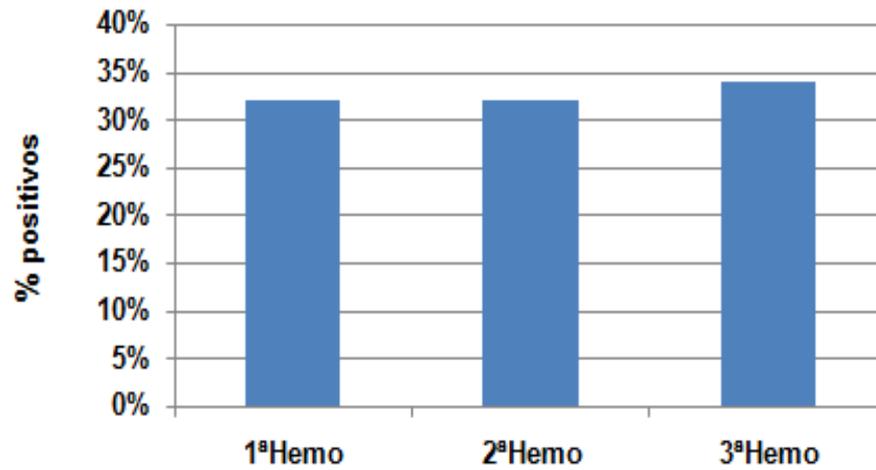
9,1% (1/11) de megaesôfago, megacólon e alterações cardíacas (ME+MC+C).

Dos 10 pacientes com megaesôfago, 50% (5/10) foram classificados em megaesôfago grupo I, 40% (4/10) em grupo 2 e 10% (1/10) em megaesôfago operado.

## 5.3- Hemocultura

### 5.3.1- Avaliação do perfil de parasitemia por hemocultura seriada

Três hemoculturas de cada indivíduo foram realizadas com intervalos mínimos de 30 dias. Dos 50 indivíduos infectados por *T. cruzi*, 58% (29/50) apresentaram hemoculturas positivas sendo que 32% (16/50) foram positivos na primeira, 32% (16/50) na segunda e 34% (17/50) na terceira amostra, independentes (Figura 12).



**Figura 12:** Positividade da hemocultura em três coletas independentes de sangue de 50 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* - Goiânia (GO), Brasil 2010.

Os resultados cumulativos demonstraram que, com duas amostras foi possível detectar o *T. cruzi* em 46% (23/50) dos indivíduos, e com os dados da terceira amostra a positividade foi de 58% (29/50), mostrando uma diferença significativa ( $X^2=5,88$ ;  $p=0,05$ ).

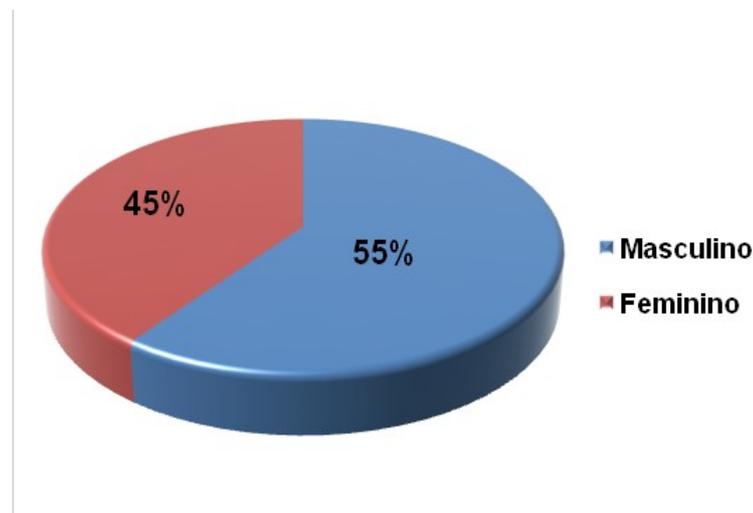
A hemocultura foi persistentemente negativa em 42% (21/50) das amostras estudadas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Sensibilidade individual e cumulativa da hemocultura em três amostras de sangue coletadas de 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*- Goiânia (GO), Brasil 2010.

Hemo	% Individual			% Cumulativa	
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> +2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup> +2 <sup>a</sup> +3 <sup>a</sup>
Pos	32 (16/50)	32 (16/50)	34 (17/50)	46* (23/50)	58* (29/50)
Neg	68 (34/50)	68 (34/50)	66 (33/50)	54 (27/50)	42 (21/50)

Pos-positiva;Neg-negativa;Hemo- hemocultura; %percentagem; \*p=0,05

Dos 58% (29/50) de indivíduos que apresentaram hemocultura positiva, 55% (16/29) são de sexo masculino e 45% (13/29) do feminino (Figura 13), não apresentando diferença significativa entre os gêneros ( $X^2=0,29$ ;  $p=0,592$ )



**Figura 13:** Distribuição por gênero dos 29 indivíduos infectados por *Trypanosoma cruzi* com hemoculturas positivas - Goiânia (GO), Brasil 2010.

Quando a positividade da hemocultura foi analisada por idade, não foi possível observar diferença significativa em relação à faixa etária ( $X^2=6,03$ ;  $p=0,110$ ). Tabela 4

**Tabela 4:** Estratificação da positividade das hemoculturas com a faixa etária dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*- Goiânia (GO), Brasil 2010.

Idade	Faixa Etária (%)	Positividade Hemocultura (%)
29-39	28	50
40-49	32	50
50-59	26	85
$\geq 60$	14	43

Dos 25 indivíduos procedentes de Goiás 64% (16/25) apresentaram hemocultura positiva, dos 20 nascidos na Bahia 55% (11/20) e de 5 procedentes de Minas Gerais 40% (2/5), não apresentando diferença significativa de parasitemia em relação à região de origem ( $X^2=1,46$ ;  $p=0,481$ ).

### 5.3.2- Avaliação do perfil de parasitemia dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* por número de hemoculturas positivas

Neste estudo foi possível detectar que 42% (21/50) dos indivíduos são de baixa parasitemia, pois não apresentaram nenhuma das três hemoculturas positivas. Dos 58% (29/50) que positivaram 52% (15/29) são de média parasitemia (uma hemocultura positiva entre as três realizadas) e os outros 48% de elevada parasitemia, sendo oito indivíduos com duas hemoculturas e seis com as três hemoculturas positivas (Tabela 5).

**Tabela 5:** Perfil de parasitemia dos indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* por número de hemoculturas positivas-Goiânia (GO), Brasil 2010.

Baixa Parasitemia (0 Hemo pos)	Média Parasitemia (1 Hemo pos)	Alta Parasitemia (2 a 3 Hemo pos)
42% (21/50)	52% (15/29)	48% (14/29)

\*Hemo: hemocultura, Pos: positiva

### 5.3.3- Avaliação do perfil de parasitemia dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* por número de tubos positivos por hemocultura

Na tabela 6 são estratificados os dados referentes aos 29 indivíduos que de forma acumulativa apresentaram 49 hemoculturas positivas. Quando analisadas em relação ao número de tubos positivos, 25 foram de média parasitemia (um ou dois tubos positivos) e 24 foram de alta parasitemia (apresentaram três ou mais tubos positivos).

**Tabela 6-** Parasitemia de 29 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em relação ao número de tubos positivos por hemocultura - Goiânia (GO), Brasil 2010.

Nº de tubos positivos/ Total de 7 tubos semeados	Hemoculturas positivas	
	Nº	%
1	13	26,6
2	12	24,5
3	6	12,2
4	5	10,2
5	6	12,2
6	7	14,3
7	0	0

%-percentagem, Nº- número

### 5.3.4- Comparação do perfil de parasitemia por número de hemoculturas positivas versus número de tubos positivos por hemocultura

Analisando a Tabela 7, os indivíduos que foram classificados como baixa parasitemia (21/50), não apresentaram parasitos detectados em nenhuma das três hemoculturas realizadas, conseqüentemente independe do número de tubos positivos por hemocultura.

Dos 29 indivíduos que apresentaram hemoculturas positivas, quinze foram classificados como média parasitemia, ou seja, uma hemocultura positiva em três realizadas. Destes, dez apresentaram somente um tubo positivo por hemocultura, um (dois tubos positivos/hemo); três (3 a 4 tubos positivos/hemo) e um (cinco tubos positivos/hemo).

Dos outros quatorze com alta parasitemia (duas ou as três hemoculturas positivas), todos apresentaram no mínimo três tubos positivos por hemocultura, sendo que 50% (7/14) apresentaram seis tubos positivos.

**Tabela 7-** Comparação do perfil de parasitemia por número de hemoculturas e de tubos positivos dos 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*- Goiânia (GO), Brasil 2010.

Nível de parasitemia	Nº de hemoculturas positivas	Nº de tubos positivos/hemocultura
Baixa (21/50)	Nenhuma Hemo positiva	Nenhum tubo pos/Hemo
Média (15/29)	1 Hemo positiva	10 (1 tubo pos/Hemo) 1 (2 tubos pos/Hemo) 3 (3 a 4 tubos pos/Hemo) 1 (5 tubos pos/Hemo)
Alta (14/29)	2 ou 3 Hemo positivas	Todas hemoculturas apresentaram no mínimo 3 tubos pos/Hemo

\*Hemo- hemocultura; pos- positivo; nº-número

### 5.3.5- Positividade da hemocultura em relação ao período do exame

As hemoculturas foram examinadas mensalmente até 150 dias após a coleta. A maioria das hemoculturas positivas 51% (25/49) foram confirmadas com 30 dias, 20,4% (10/49) aos 60 e 90 dias; 4,1% (2/49) aos 120 e 150 dias (Tabela 8).

**Tabela 8:** Positividade de 49 hemoculturas em 150 amostras de 50 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* em relação ao período de exame - Goiânia (GO), Brasil 2010.

Período de exame (dias)	Hemoculturas positivas	
	Nº	%
30	25	51
60	10	20,4
90	10	20,4
120	2	4,1
150	2	4,1

\*N °- número; %-percentagem

### 5.3.6- Perfil de parasitemia por forma clínica – Cardiopatia e Forma digestiva

Os 48 indivíduos estudados foram classificados de acordo com as formas clínicas em sem cardiopatia e com cardiopatia em diferentes graus, segundo o ECG. Analisando o nível de parasitemia *versus* forma clínica-cardiopatia (Tabela 9), indivíduos com perfil de baixa parasitemia, 37% (7/48) não apresentaram cardiopatia, 26% (5/48) cardiopatia grau 1, 32% (6/48) grau 2 e 5% (1/48) grau 3. Indivíduos com média parasitemia 73% (11/48) sem cardiopatia, 7% (1/48) cardiopatia grau 1 e 20% (3/48) grau 2. Indivíduos com alta parasitemia 43% (6/48) sem cardiopatia, 36% (5/48) cardiopatia grau 1 e 21% (3/48) grau 2. Dado interessante foi observado nos indivíduos com baixa parasitemia, que apresentaram mais casos de cardiopatias (26% grau 1; 32% grau 2 e 5% grau 3) quando comparado com indivíduos de alta parasitemia (36% grau 1; 21% grau 2).

Para classificação das formas digestivas exames radiológicos e clínicos foram utilizados, sendo que dos 48 indivíduos estudados 11 apresentaram alterações digestivas. Analisando o nível de parasitemia *versus* forma digestiva (Tabela 10), indivíduos com perfil de baixa parasitemia, 67% (2/11) apresentaram ME e 33% (1/11) ME+MC+C. Indivíduos com média parasitemia 20% (1/11) apresentaram ME+MC, 60% (3/11) ME+C e 20% (1/11) MC+C. Indivíduos com alta parasitemia 33% (1/11) ME e 67% (2/11) ME+C.

**Tabela 9-** Relação do perfil de parasitemia por forma clínica (cardiopatia) dos 48 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*- Goiânia (GO), Brasil 2010.

	Baixa Parasitemia (19/48)	Média Parasitemia (15/48)	Alta Parasitemia (14/48)
Sem cardiopatia	37%	73%	43%
Cardiopatia grau 1	26%	7%	36%
Cardiopatia grau 2	32%	20%	21%
Cardiopatia grau 3	5%	0%	0%

**Tabela 10- Relação do perfil de parasitemia por forma digestiva de 11 indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* - Goiânia (GO), Brasil 2010.**

	Baixa parasitemia (3/11)	Média parasitemia (5/11)	Alta parasitemia (3/11)
ME	67%	0%	33%
ME+MC	0%	20%	0%
ME+C	0%	60%	67%
ME+MC+C	33%	0%	0%
MC+C	0%	20%	0%

\*ME: megaesôfago; MC: megacólon; C: alterações cardíacas

## 6. DISCUSSÃO

Apesar de muitos avanços científicos aplicados a doença de Chagas, muitas dúvidas ainda prevalecem sobre os fatores que estão envolvidos na sua patogênese e suas manifestações clínicas. Apesar da baixa sensibilidade, a hemocultura na fase crônica da doença de Chagas continua relevante, pois além de recuperar o parasito do sangue, comprovar etiologicamente a infecção, ser utilizada em diagnósticos inconclusivo, é de grande importância na avaliação do perfil de parasitemia para possível tratamento e validação da eficácia terapêutica específica (Pifano 1954, Chiari & Brener 1966, Chiari & Dias 1975, Minter-Goedbloed et al. 1978; Castro et al. 2006). A realização deste método de forma seriada contribui para aumentar a sensibilidade. (Luz et al. 1994; Castro et al. 2002).

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram uma sensibilidade individual de 32% na primeira e segunda hemocultura e, 34% na terceira. A sensibilidade da hemocultura na fase crônica de doença de Chagas é muito variável, citado na literatura de 0% a 94% de positividade (Chiari & Brener 1966, Chiari et al. 1989, Luz et al. 1994). Silva et al. (1996) demonstraram que isoladamente a hemocultura foi positiva em 59,6% (31/52) dos pacientes. Siriano (2007), analisando um grupo de mulheres com apenas uma hemocultura, obteve 32% de positividade nas mulheres não gestantes, dados corroborados pelos resultados apresentados neste trabalho.

Quando os resultados foram analisados em relação às hemoculturas seriadas (três hemoculturas), o *T. cruzi* foi detectado em 58% (29/50) dos indivíduos. Vários estudos demonstraram que o número de hemoculturas realizadas é proporcional a sua sensibilidade (positividade). Esta sensibilidade está relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos do parasito (polimorfismo das formas sanguíneas, tropismo tecidual, virulência e carga parasitária) e fatores relacionados ao paciente (origem, sexo, idade e tempo de infecção). Existem evidências de que a variabilidade nas taxas de positividade também esteja ligada à qualidade dos meios de cultura e/ou das técnicas empregadas (Mourão & Chiari 1975, Neal & Miles 1977, Chiari et al. 1989, Luz et al. 1994). Dados semelhantes foram obtidos por Castro et al. (2002), que obtiveram uma média de 40% de positividade em três hemoculturas realizadas. Luz et al. (1994) demonstraram 94% de positividade quando realizaram três hemoculturas. Índices de positividade variando entre 86,6-97,4% tem sido relatado por outros vários autores (Albuquerque et al. 1972, Mourão & Chiari 1975).

Neste trabalho não foram observadas diferenças significativas na positividade da hemocultura em relação ao sexo, faixa etária e naturalidade. Não foi possível estabelecer nenhuma correlação direta de perfil de parasitemia com forma clínica. Outros autores também indicaram independência entre progressão dos sintomas clínicos e parasitemia como demonstrado por Pereira et al. (1992) em Minas Gerais e Castro et al. (1980) em Goiás. O motivo pelo qual diferentes pacientes apresentam formas clínicas variáveis permanece desconhecido, mas, muito provavelmente, são determinados pela variação genética do *T. cruzi*; todavia, não podemos descartar aspectos relacionados ao hospedeiro.

Em relação aos 23 indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, encaminhados de bancos de sangue para o Laboratório de Pesquisa da doença de Chagas do Hospital das Clínicas da UFG-/GO, 52% (12/23) tiveram hemoculturas positivas. Esta elevada prevalência entre doadores difere da estimativa prévia de que apenas 25% das doações de infectados com *T. cruzi* poderiam transmitir a infecção (Cerisola et al.1974). Este dado reforça a importância de uma rigorosa seleção de doadores pelos bancos de sangue com triagens sorológicas sensíveis. A utilização de kits, com custo reduzido e sensibilidade não confiável, pode aumentar os riscos de propagação transfusional, já que os doadores e o grupo estudado apresentaram elevada positividade nas hemoculturas. O processo de globalização influenciou muitos latino americanos de áreas endêmicas a buscarem melhores condições de vida em outros países e propiciou também a propagação do *T. cruzi* para áreas não endêmicas principalmente da América do Norte, Europa e Ásia (Castro et al. 2009).

Em relação à positividade das hemoculturas, 42% (21/50) permaneceram negativas nas três amostras e 58% (29/50) foram positivas. Destas, 52% (15/29) tiveram apenas uma hemocultura positiva, 27,6% (8/29) duas e 20,4% (6/29) as três positivas. Estes achados reforçam a utilização deste parâmetro na classificação do nível de parasitemia dos indivíduos chagásicos crônicos. De acordo com este critério foi possível observar que 42% dos indivíduos tinham baixa parasitemia (nenhuma hemocultura positiva), 30% média (uma hemocultura positiva) e 28% alta parasitemia (duas a três hemoculturas positivas). Assim 58% apresentaram um nível de parasitemia médio e alto sendo um dado importante para o clínico no acompanhamento e avaliação da evolução clínica desses indivíduos e para monitorização de parasitemia antes e após terapêutica específica. Alguns estudos usando xenodiagnóstico e hemocultura demonstraram que a maioria dos indivíduos chagásicos apresentam baixa parasitemia (67,5% e 59%) e apenas 9,2 e 25% deles elevada parasitemia (Castro et al. 1983, Luz et al.1994).

A maioria das hemoculturas foram positivas aos 30-90 dias, sendo que esse período supera os obtidos por outros autores que encontraram uma positividade de 9% e 18% após os 60 dias (Mora 1996, Luz et al. 1994). Siriano (2007) encontrou uma positividade maior entre 60 e 90 dias, com 22,3% e 11,6%. Mesmo sendo poucos os exames que positivaram depois de 90 dias (4,1% com 120 dias e 4,1% com 150 dias) salientamos a importância de acompanhar as hemoculturas por no mínimo cinco meses, principalmente pela baixa sensibilidade da técnica e também visando o isolamento de cepas, pois a demora na detecção do parasito pode estar relacionada com o baixíssimo parasitismo sanguíneo e/ou com a diferente capacidade de adaptação e crescimento do parasito em meios artificiais (Minter-Goedbloed et al. 1978).

Quando relacionado o nível de parasitemia por hemocultura *versus* número de tubos positivos por hemocultura, encontramos uma relação direta entre parasitemia e número de tubos positivos. Aqueles pacientes que apresentaram uma única hemocultura positiva (média parasitemia) em três realizadas tinham um ou dois tubos positivos; os que apresentaram duas ou três hemoculturas positivas (elevada parasitemia) apresentaram de dois a seis tubos positivos por hemocultura. Estes achados reforçam a hipótese de que a parasitemia durante a fase crônica é, em geral, uma constante para cada indivíduo, desde aqueles com raros parasitos circulantes que ocasionalmente se obtém um exame positivo, até aqueles com elevada parasitemia onde o parasito é detectado em todos os exames realizados (Schenone et al. 1977, Luquetti & Rassi 2000, Prata 2001, Castro et al. 2002).

Desse modo, sugerimos que mesmo quando se realiza apenas uma hemocultura o número de tubos positivos nessa amostra pode ser um forte indicador da parasitemia do indivíduo como demonstrado por Luz et al. (1994). Como a hemocultura seriada é um exame demorado e laborioso, analisar o número de tubos positivos por hemocultura seria suficiente para definir o perfil de parasitemia dos pacientes com média e alta parasitemia, sem necessidade de proceder à hemocultura seriada. Com isto pode ser agilizada a liberação do resultado quando o clínico pretende fazer tratamento específico. Já para indivíduos com baixa parasitemia é fundamental a realização das três hemoculturas para aumentar a possibilidade de detecção do parasito.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A positividade esperada da hemocultura individual em infectados na fase crônica provenientes da região do Brasil Central é constante, em torno de 33%.
- ✓ A realização de hemocultura seriada aumenta a positividade (sensibilidade) do teste.
- ✓ A positividade cumulativa da hemocultura foi significativa com a adição da terceira amostra.
- ✓ Nas amostras estudadas o sexo e a idade dos indivíduos não interferiram na positividade da hemocultura.
- ✓ A naturalidade dos indivíduos não demonstrou ser fator de aumento de parasitemia.
- ✓ Não foi possível estabelecer uma relação direta de parasitemia com forma clínica.
- ✓ O *T. cruzi* foi detectado em 51% (25/49) das hemoculturas até 30 dias após a coleta.
- ✓ A análise com 120 e 150 dias aumenta a detecção do parasito, principalmente nos casos de indivíduos que apresentam baixa parasitemia.
- ✓ Existe uma relação direta entre parasitemia e número de tubos positivos.
- ✓ Analisar o número de tubos positivos por hemocultura, seria suficiente para definir os pacientes, com média e alta parasitemia, sem necessidade de proceder à hemocultura seriada. Com isso, maior será a agilidade em liberar resultado caso o clínico almejar tratamento específico.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque RDR, Fernandes LAR, Funayama GK, Filho FF, Siqueira AF 1972. Hemoculturas seriadas com o meio de Warren em indivíduos com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 14(1): 1-5.

Amato Neto V, Matsubara L, Lanura PNB 1996. 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* 29: 59-61.

Andrade SG 1974. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano: contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio. *Rev Pat Trop* 3 :65-121.

Andrade SG 2000. Tratamento Específico Experimental da Doença de Chagas. *Rev Pat Trop* 29: 179- 189.

Andreollo NA 2000. Diagnóstico Clínico da Doença de Chagas. *Rev Pat Trop* 29: 173- 178.

Argolo AM, Félix M, Pacheco R, Costa J 2008. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz, Programa Integrado de Doença de Chagas e Instituto Oswaldo Cruz. Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de Chagas. Rio de Janeiro.

Ávila HA, Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L 1990. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by Analysis of PCR amplified minicircle variable region sequences. *Mol Biochem Parasitol* 42:175-188.

Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 48: 211-222.

Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, de Paiva E, di Grave W, Morel CM, Simpon L. 1993. 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* 31: 2421-6.

Bittencourt A.L 2000. Transmissão Vertical da Doença de Chagas. *Rev Pat Trop* 29: 101-113.

Brener Z & Chiari E 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 05: 220-224.

Brener Z 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 59: 19-26.

Brener Z & Chiari E 1971. The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65: 629-636.

Brener Z 1984. Laboratory – acquired Chagas' disease: an endemic disease among parasitologists? In: Genes and antigens of parasites. A laboratory manual (MOREL, C.M.,ed), UNDP/ World Bank /WHO. Editora Fundação Oswaldo Cruz, 2<sup>nd</sup> edition, Rio de Janeiro, pp. 3-9.

Brener Z 1992. Immune response and immunopathology in *T. cruzi* infection. In: Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine (Wendel S; Brener Z; Camargo ME & Rassi A. eds.), ISBT Brazil' 92, 1992, p. 31-47.

Brener Z, Gazzinelli RT 1997. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and Pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch Allergy Immunol.* V 114, p. 103-110, 1997.

Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, Fernandes O 2001. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, n. 6: 823-826.

Brumpt E 1914. O xenodiagnóstico. Aplicação ao xenodiagnóstico de algumas infecções parasitárias e em Particular à Trypanossomose de Chagas. *An Pau. Med Cirug* 3:97-102.

Bulhões TP, Zauza PL, Silva ED, Sampaio MX, Borges-Pereira J 2004. *Trypanosoma cruzi*: Avaliação do desempenho de biodemas no diagnóstico sorológico da doença de Chagas crônica. *Rev Pat Trop* 33, n. 2: 227-241.

Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Tropical* 6: 93-100.

Camargo ME 1966. Fluorescent antibody test for serodiagnosis. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in slide test. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 8: 227-234.

Camargo ME, Hoshino S, Siqueira GRV 1973. Hemagglutination with preserved, sensitized cells, a practical test for routine diagnosis of American trypanosomiasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 15: 81-85.

Cançado JR 1980. Forma aguda da doença de Chagas no Brasil. *Rev Assoc Med Bras* 26: 285-288.

Cançado JR 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44: 1-20.

Carlier Y, Torrico F 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 767-771.

Carriazo CS, Sembaj A, Aguerri AM, Requena JM, Alonso C, Bua J et al. 1998. Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples chronic chagasic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30: 183-6.

Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW et al. 1993. Chagas disease diagnosis: evolution of several test in blood bank screening. *Transfusion* 33:830-4.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88:894-900.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Chiari E, Galvão LMC 2006. Detection of parasitemia profiles by culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research, Dusseldorf -Germany* 436:172-175.

Castro AM, Vinaud MC, Teixeira A 2009. Chagas disease: a global health problem. In: *Emerging Chagas Disease* (Teixeira A. Ed). Bentham eBook p18-23.

Castro CN 1980. Influência da parasitemia no quadro clínico da doença de Chagas. *Rev Pat Tropical* 29: 73-136.

Castro CN, Alves MT, Macêdo VO 1983. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 37(2): 128-130.

Castro C, Santos MCA, Silveira CA 2004. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico artificial realizado imediatamente e quatro horas após a coleta de sangue. *Rev Soc Bras Med Trop* 37: 98-103

Castro E 2009. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *TransfusMed* 19: 16–23.

Castro SL, Soeiro MN 2010. A pesquisa de novas drogas para o tratamento da doença de Chagas. Site: [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br). Acessado: 27/01/2010

Cerisola JA; Rohweder RW; Segura EL; Del Prado CE; Alvarez M; Martini GJW 1974. El Xenodiagnóstico. Monografía Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas “Dr. Mario Fatala Chaben”. *Buenos Aires. Argentina*, p.1-111.

Chagas C 1911. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 3(2):219-275.

Chiari E 1992. Diagnostic test for Chagas' disease. In: Chagas' disease (American Trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. (Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A. eds) ISBT Brazil'92, p. 153-164.

Chiari E, Brener Z 1966. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop de São Paulo* 8: 134-138.

Chiari E, Dias JCP 1975. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na Doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Soc Med Trop de São Paulo* 9: 1133-1136.

Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA 1989. Hemocultures for the parasitological diagnostic of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19-23.

Chiari E, Galvão LMC 1997. Diagnóstico parasitológico da doença de Chagas. In:

Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. *Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. JCP Dias, JR Coura (Eds). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 85-98.

Chiari E, Galvão LMC, Lages-Silva E. Dias 2005. Doença de Chagas. In: Coura JR, organizador. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; p.603-93620.

Consenso Brasileiro em doença de Chagas 2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (supl 3): 7-29.

Coura JR, Anunziato N, Willcox HPF 1983. Morbidade da doença de Chagas. Estudo dos casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 78: 363-372.

Coura JR, Abreu LL, Willcox HPF 1991. 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* 86: 395-398.

Coura JR, Borges-Pereira J, Alves Filho FI, Castro JÁ de, Cunha RV da, Costa W, Junqueira AC 1996. Morbidade da doença de Chagas em áreas do sertão da Paraíba e da caatinga do Piauí. *Rev Soc Bras Med Trop* 29:197-205.

Coura JC, Abreu LL, Willcox HPF, Petana W, 1997. Estudo comparative controlado com emprego de benzonidazole nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em

área de campo com transmissão interrompida. Avaliação preliminar. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 139-144.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, Messias L, Stolf, Belloti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J 1995. Autoimmunity in Chagas' disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin – specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , v. 92, p. 1-5.

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, Dicker RC, Sullivan K, Fagan RF, Arner, TG 1994. EpiInfo, version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.

Dias JCP 1987. Control of Chagas' disease in Brazil. *Parasitology Today*, v.3, p.336-341.

Dias JCP 1992. Chagas Disease and blood transfusion in endemic areas. In: Chagas Disease(American Trypanosomiasis: Its Impact on transfusion and Clinical Medicine (Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A.,eds) ISBT Brasil'92:135-142.

Dias JCP 2006. Notas sobre *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. *Rev da Soc Bras de Med Trop* 39(4): 370-375.

Dias JCP 2007. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23 Sup1: S13-S22.

Dias JCP, Coura JR 1997. Epidemiologia. In: Dias JCP, Coura JR, organizadores. Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. *Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1997. p. 33-66.

Dias JCP, Coura JR 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(supl. I): 31-40.

Dias JCP, Macêdo VO 2005. Doença de Chagas. In: Coura JR, organizador. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005.p.557-93.

Diaz C, Nussenzweig V, Gonzales A 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 46:616-623

Fernandes JF, Castellani 1964. Perspectiva de vacinação de Chagas. XVI Reunião Anual SBPC, Ribeirão Preto, São Paulo.

Flores MA, Trejos A, Paredes AR, Ramos AY 1966. El método de concentración de Strout en diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 21: 38-39.

Franco YBA, Silva IG, Rassi A, Rocha ACRG, Silva HHG, Rassi GG 2002. Correlação entre a positividade do xenodiagnóstico artificial e a quantidade de sangue e triatomíneos utilizados no exame, em pacientes chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 35(1):29-33.

Freilij H, Altchek J, Storino R, 1994. Chagas congênito. In Storino R. Freilij H. Enfermedad de Chagas, Doyma Argentina, p.67-278.

Freitas JLP, Nussenzweig V, Amato Neto V, Sontag R 1955. Estudo comparativo entre o xenodiagnostico praticado *in vivo* e *in vitro* em formas crônicas da molestia de Chagas. *O Hospital* 47:181-187.

Fuente C, Urjel R, Darras C & Saucedo 1985. Uso de tubos de microhematócrito para el diagnostico rápido de la enfermedad de Chagas y malaria. *Ann Soc Belge Méd Trop* 65 (suppl.I): 95-99.

Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Galvão LMC, Chiari E 1998. *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88:28-33.

Gontijo ED, Andrade GMQ, Santos SE, Galvão LMC, Moreira EF, Pinto FS, Dias JCP, Januário JN 2009. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. *Epidemiol Serv Saúde*, Brasília, 18(3): 243-254.

Gontijo ED, Santos SE 2010. Mecanismos principais e atípicos de transmissão da doença de Chagas. Site: [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br). Acessado em 18/01/2010.

González-Capa S, Durante EI 1994. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*. In: Storino R, Milei J (orgs) *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires, Doyma Argentina, p. 31-40.

Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, Sztajzel J, Besse V, Loutan L, Gaspoz JM, Jannin J, Vinas PA, Luquetti A, Chappuis F 2010. Prevalence, Clinical Staging and Risk for Blood-Borne Transmission of Chagas Disease among Latin American Migrants in Geneva, Switzerland. *Neglected Tropical Diseases* vol.4, Issue 2, e592.

Lages-Silva E 2001. Caracterização do *Trypanosoma cruzi* nas diferentes formas clínicas da doença de Chagas, com ênfase no megaesôfago e na reativação. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Levine RA, Wardlaw SC, Patton CL 1989. Detection of hematoparasites using quantitative buffy coat analysis tubes. *Parasitology Today* 5: 132-134.

Linhares AX 2000. Vetores do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Pat Tropical* 29: 83-89.

Lopes ER, Chapadeiro E 1997. Anatomia Patológica da Doença de Chagas, In: *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Eds. JCP. Dias, JR Coura. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro, p. 67-84.

Luquetti AO & Castro AM 1997. Capítulo 6. Diagnóstico sorológico da doença de Chagas. Pag. 99-113. In: *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Ed JCP Dias & JR Coura. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

Luquetti AO & Rassi A 2000. Capítulo 17. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Pag. 344 – 378. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Eds. Brener Z, Andrade Z & Barral- Neto. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Luquetti AO 2000. Diagnóstico Etiológico da Doença de Chagas. *Rev Pat Trop 29(Supl.):* 145-149.

Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU 1994. Hemocultura: Técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop 27:* 143-148.

Macedo A 2010. Estrutura populacional. Site: [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br). Acessado em 18/01/2010.

Macêdo VO 2000 Diagnóstico Clínico da Doença de Chagas. *Rev Pat Trop 29(Supl.):* 141-144.

Medina-Lopes MD 1988. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. *Rev Soc Bras Med Trop 21(3):* 151-153.

Ministério da Saúde- (MS) 2005. Guia de Vigilância Epidemiológica/6ª edição. Notícias: <http://www.portal.saude.gov.br>. Acessado em 08 Set 2009.

Ministério da Saúde- (M.S) 2006. Notícias. <http://www.saude.gov.br>. Acessado em 08 Set 2009.

Ministério da Saúde (MS) 2007. Doença de Chagas aguda. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Guia de consulta rápida para profissionais da saúde. *Rev Pat Trop 36:n.3, set-dez.*

Ministério da Saúde (MS) 2009. Boletim eletrônico Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde, junho 2009. Notícias: [portal.saude.gov.br](http://portal.saude.gov.br). Acessado: 10 Set 2009.

Minter-Goedbloed, E Minter, DM. Marshall TFC 1978. Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in the detection of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 72:217-225.

Mora MXG 1996. Avaliação de uma técnica modificada de hemocultura para *T. cruzi*, na forma crônica da doença de Chagas em uma área endêmica. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 515-516.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:1477-1482.

Mourão OG, Chiari E 1975. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio LIT. *Rev Soc Bras Med Trop* 9: 215-219.

Neal RA, Miles A 1977. The sensitivity of culture methods to detect experimental infections of *Trypanosoma cruzi* and comparison with xenodiagnosis. *Rev do Inst de Med Trop de São Paulo* 19: 170-176.

Oliveira MF, Nagao-Dias AT, Pontes VMO, Souza Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB, 2008. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Rev Pat Trop* 37: 209-228.

Opperdoes FR 1995. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Pag.19-32. In: Carbohydrate and Energy Metabolism in Aerobic Protozoa. Eds. Marr JJ, Müller M. Academic Press Ltd, London.

Pan American Health Organization (PAHO) 2007. Meeting: Conclusions and Recommendations from the Joint IPA-AMCHA Annual Meeting (Quito, Ecuador, Technical Guidelines for Prevention and Control of Chagas Disease, PAHO/MSF Regional Consultation on the Organization and Structure of Health Care (IEC) on Congenital Chagas disease (CLAP, Montevideo, 17-18 May 2007).

Pereira JB, Willcox HPF, Coura JR 1992. Evolução da cardiopatia chagásica crônica. Influência da parasitemia. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 101-108.

Pifano CF 1954. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas crônica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch Venez Patol Parasit Med* 21: 20-55.

Pineda JP, Luquetti A, Castro C 1998. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 473-480.

Pinto AYN, Valente AS, Valente VC, Ferreira Júnior AG, Coura JR 2008. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. *Rev Soc Bras Med Trop* 41(6): 602-614.

Prata A 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infect Dis.* 1:92-100.

Rassi A, Lustosa ES, Carvalho MESD, Nascimento MD, Ferrioli Filho, Luquetti AO 1991. Sensibilidade do xenodiagnóstico em pacientes na fase crônica da doença de Chagas. Resultados preliminares. *Rev Soc Bras Med Trop.* 24(Supl 1): 36-37.

Rassi A, Neto VA, Rassi GG, Amato VS, Luquetti AO, Rassi SG 2004. Busca retrospectiva da transmissão maternal da infecção chagásica em pacientes na fase crônica. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37(6): 485-489.

Rassi Jr A; Rassi A 1998. Doenças do Coração, Prevenção e Tratamento. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.798-807.

Rey L 2001. Parasitologia 3ª ed Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Rezende JM, Lauer KM, Oliveira AR 1960. Aspectos clínicos e radiológicos da aperistalsis do esôfago. *Rev Bras Gastroenterol* 12: 247-262.

Salles NA, Sabino EC, Cliquet MG, Eluf-Neto J, Mayer A, Almeida-Neto C, Mendonça MC, Dorliach-Llacer P, Chamone DF, Saéz-Alquézar A 1996. Risk of exposure to Chagas disease among seroreactive *Brazilian blood donors*. *Transfusion* 36: 969-973.

Santos AH, Silva IG, Rassi A 1995. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 28: 367-373.

Sarasúa WM 1993. Detection de la transmission congenital de la enfermedad de Chagas em Artigas-Uruguay. *Rev Soc Bras Med Trop* 26:28.

Schenone H, Rojo M, Rojas A, Concha L 1977. Positividad diurna y nocturna del xenodiagnóstico em un paciente com infección chagásica crónica de parasitemia permanente. *Bol Chil Parasitol* 32: 63-66.

Schenone H, Contreras M, Rojas A 1991. Rendimiento Del xenodiagnóstico, según el número de cajas utilizadas em 1.181 personas con infección chagásica crónica diagnosticada mediante la reaccion de hemaglutinación indirecta. *Bol Chil Parasitol* 46: 58-61.

Schofield CJ, Dias JCP 1999. The Southern Cone Initiative Against Chagas' disease. In: *Ad Parasitol*, ISBN, 42:227.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R 2006. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588.

Schmuñis GA & Torrico F 2003. Aspectos epidemiológicos y clínicos de lá infección congénita con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. INFORME TÉCNICO, 36 (6): 767-771, nov-dez.

Schmuñis GA 2007. Epidemiology of Chagas disease im non-endemic countries: the role of international migration . *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(I): 75-85.

Silva, E.L.; Pedrosa, A.L.; Crema, E.; Penhalver, F.R.; Ramirez, L.E 1996. Avaliação do xenodiagnóstico e da hemocultura realizados simultaneamente em pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*, 29 (supl), 128.

Silveira AC 2000. Situação do controle da transmissão da doença de Chagas nas Américas. *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro* 16 (Sup2):35-42.

Silveira AC 2002. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. In: O Controle da Doença de Chagas nos Países do Cone Sul da América. Pag. 16-43. Ed. OPAS.

Siriano LR 2007. Influência da gestação na parasitemia por hemocultura em grávidas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* na fase crônica. [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia-GO.

Strout RG 1962. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* 48: 100.

Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR 2006. Evolution and pathology in Chagas disease- A review. *Mem Inst Osw Cruz* 101: 463-491.

Verlinde CLMJ, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Périé JJ, Fothergill-Gilmore LA, Opperdoes FR, Gelb MH, Hol WGJ, Michels PAM 2001. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Update(2001)* 4: 50-65.

Voller A, Draper CC, Bidwell DF, Barlett A 1975. A microplate enzyme linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet* 1: 426-427.

Xavier SS, Hasslocher Moreno A, Sousa AS, Albajar Viñas P 2006. Abordaje diagnóstico y terapéutico de La cardiopatía chagásica crónica. *Enfermedades Emergentes*. *Enfermedades Emergentes* 8(supl 1) 28-36.

Wilson LS, Strorsberg AM, Barrio K 2005. Cost-effectiveness of Chagas disease interventions in Latin America and the Caribbean: Markov models. *Am. J Trop Med Hyg* 73: 901-910.

World Health Organization (WHO) 1997 Weekly epidemiological record.72(1):1-8.

World Health Organization (WHO) 2002. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2002 (Technical Report Series.905).

Zeledón R, Dias JCP, Brilla-Salazar A, Rezende JM, Vargas LG, Urbina A 1988. Does a spontaneous cure for Chagas disease exist? *Rev Soc Bras Med Trop* 21(1): 15-20.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Shijman AG 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Osw Cruz* 10(7): 1051-1054.



## 9- ANEXOS

9.1- Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa médica, humana e animal- Hospital das Clínicas-UFG.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO ESPORTO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N.º 058/2008

Goiânia, 26/06/2008

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Prof. Dra. Ana Maria de Castro

TÍTULO: "Avaliação da parasitemia por hemoculturas seriadas em pacientes chagásicos crônicos do laboratório de pesquisa da doença de chagas do Hospital das Clínicas-UFG"

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas - Parasitologia

Local de Realização: HC/UFG - Laboratório de Doenças de Chagas e IPTSP - Laboratório de Biologia, Imunologia e Fisiologia de Protozoários de Interesse Humano - Setor de Parasitologia.

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, após análise e atendimento à adequação solicitada, **aprovou**, o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

- Informamos que **não há** necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.
- O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).
- O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa - Item 13*)

  
Farm. José Mário Coelho Moraes  
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

## **9.2-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa.

Meu nome é **Flávia Martins Nascente**, sou a biomédica responsável sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. **Dra. Ana Maria de Castro**, de desenvolver esta pesquisa, sendo a área de atuação a Biomedicina. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com, os pesquisadores responsáveis, **Flávia Martins Nascente**, nos telefones: (62)3269-8271, 3251-3144 ou 9616-7339. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participantes nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás-UFG, nos telefones: (62) 3269-8338 ou 3269-8426.

### **INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA**

O título da pesquisa é “Avaliação da parasitemia por hemoculturas seriadas em indivíduos chagásicos crônicos do Laboratório de pesquisa da doença de Chagas do Hospital das Clínicas-UFG”. Este trabalho será desenvolvido pela Mestranda Flávia Martins Nascente, biomédica; e o material (sangue) será coletado pela mesma no Laboratório de pesquisa da doença de Chagas do Hospital das Clínicas, centro de referência para doença de Chagas e processado no IPTSP/UFG.

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a quantidade de parasitos presentes no seu sangue utilizando a técnica da hemocultura seriada. Para tal serão coletadas 3 amostras de sangue venoso heparinizado ( 40 ml cada amostra) com intervalo mínimo de 30 dias. Durante o processamento do sangue coletado, o soro será separado para técnicas imunológicas.

Os prováveis riscos podem ocorrer pela compressão inadequada do local da punção venosa após a retirada da agulha pelo (a) participante com posterior formação de inchaço, pela saída de sangue podendo ou não surgir um pequeno hematoma no local ou ainda lipotímia (queda de pressão), fatos conseqüentes da coleta sanguínea.

A opção de participação é totalmente voluntária, caso não queira, não sofrerá nenhuma restrição aos exames que foram solicitados. Não haverá nenhum tipo de

pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Todos os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros. Existirá o direito de pleitear indenização em casos de danos comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa.

Sua participação será importante, pois poderá contribuir para o conhecimento da influência do parasito, *Trypanosoma cruzi* no desenvolvimento patológico da doença de Chagas, assim como possibilitar ao clínico uma melhor avaliação clínica.

## CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA NESTA PESQUISA

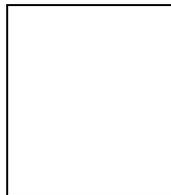
Eu, \_\_\_\_\_,  
 RG \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo  
**“Avaliação da parasitemia por hemoculturas seriadas em indivíduos chagásicos crônicos do Laboratório de pesquisa da doença de Chagas”**, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela Biomédica Flávia Martins Nascente sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Serão garantidos o sigilo e privacidade de meus dados pessoais.

Goiânia,...../ ..... / 200..... .

---

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável:

Assinatura Dactiloscópica:




---

Nome e Assinatura do Pesquisador Responsável:

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Observações complementares

Os responsáveis por deste projeto se comprometem a não divulgação e/ou identificação de dados pessoais dos indivíduos participantes.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)