



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA BAHIA - UNEB
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO/CAMPUS VII SENHOR DO BONFIM
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JANDAÍRA SANTOS GARCEZ

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE) COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA
DE CHAGAS
(REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)**

**Senhor do Bonfim - Bahia
2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA BAHIA - UNEB
DEPARTAMENTO DE EDUCAÇÃO/CAMPUS VII SENHOR DO BONFIM
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JANDAIRA SANTOS GARCEZ

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)
COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA DE CHAGAS**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título em Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: MSc Marcos Lázaro da Silva Guerreiro

Co-orientadora: MSc Juliana Côrtes Freitas

**Senhor do Bonfim - Bahia
2011**

JANDAIRA SANTOS GARCEZ

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DA PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)
COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA DE CHAGAS
(REVISÃO BIBLIOGRÁFICA)**

BANCA EXAMINADORA:

Dr. ANDREA CRISTINA MARIANO (UNEB)
Examinadora

Dr. GERVÁSIO PAULO DA SILVA (UNEB)
Examinador

MSc. JULIANA CÔRTEZ FREITAS (UNEB)
Presidente da Banca

DATA DA DEFESA ___/___/___

SENHOR DO BONFIM - 2011

*A Deus, minha força maior, **Ao meu Pai** a razão
de minha existência, **E a minha querida mãe** (In
memória) que de onde estiver esta sempre me
protegendo.
Amo vocês...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha força maior, força essa nunca deixou que eu desistisse dos meus sonhos e não desistisse também de acreditar que poderia ir muito mais além;

Aos meus heróis que sempre acreditaram e me deram força e coragem para que eu prosseguisse com os meus objetivos, e nunca me abandonaram, PAI, MÃE (In memórian), obrigada;

A uma pessoa que por muitos anos esteve ao meu lado, me dando força, me incentivando, cuidando de mim e não me deixou desistir de meus sonhos. Manoel Bonfim. E também a minha segunda família França de Jesus que tanto amo. Obrigada mesmo;

Como esquecer de agradecer a minha “boadrasta”, Paula, uma segunda mãe pra mim, me acolheu na sua vida tomou e toma conta de mim e da minha família e sempre acredita nos meus sonhos;

Venho também agradecer as pessoas que foram de fundamental importância para a construção deste trabalho: o meu orientador Marcos Lázaro, que sempre teve a sabedoria para mostrar-me o caminho a seguir, e com sua paciência e compreensão nunca me disse não e a minha co-orientadora Juliana Côrtes.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado, Gilmar D’ Oliveira (ririnho), Anderson Duarte (andinho), Luzicléia Araújo (luzion), Natália Dantas (nathys), Fernanda Paz (nanda), Marlove Rios (Love), Fernanda Oliveria, Fábio Dias (binho), Jonilson Silva (Jô), Priscila Pereira (piri), Manuela Mendes (manu) e todos os amigos da turma 2006.1 que aprendi amar e respeitar por todos esses anos de batalha.

A meus amigos e família de Salvador que mesmo com a distância sempre torceram pela minha ascendência como ser humano.

A Universidade Estadual da Bahia (UNEB), que me proporcionou o ensino de qualidade e adequada para a minha formação acadêmica e intelectual.

A galera inesquecível da República da UNEB, a galerinha da turma 2005.1, os meus amigos conquistados com a minha estadia em Senhor do Bonfim, Landia e família e aos meus compadres e afilhado que tanto adoro e admiro.

A todos os colegas aqui não citados, que mesmo usando todas as folhas pra agradecer não seria o suficiente.

Agradeço a todos os funcionários do Campus VII, ao professores, o pessoal da administração, as pessoas que trabalham na organização, limpeza e segurança.

Por fim agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a minha formação de uma forma direta ou indireta.

"Uma vida sem desafios não vale a pena ser vivida".

"Sócrates".

RESUMO

A Doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, descoberta por Carlos Chagas em 1909, tem agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário parasita flagelado. É uma zoonose que afeta aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoas na América Latina, onde mais de 100 milhões ainda estão expostos ao risco da infecção. Seu ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hemípteros, hematófagos, conhecido como barbeiros. A transmissão dá-se no momento, ou logo após a picada, quando os insetos iniciam a defecação das formas, sendo essas como os tripomastigotas metacíclicas presentes nas suas fezes ou urina, penetram facilmente através de mucosas e é provocada pelo próprio indivíduo após a ruptura da pele que se dar pelo ato de coçar. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a amplificação de seqüências específicas do ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA), é uma técnica que vem sendo muito utilizada no campo da ciência devido a sua especificidade e sensibilidade. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de quantidade diminutas de material. A proposta desse estudo foi fazer um levantamento bibliográfico para confirmar a capacidade e confiabilidade da PCR no diagnóstico da DC. A PCR mostrou nos estudos presentes ser uma ferramenta vantajosa tanto no diagnóstico quanto na avaliação do tratamento da DC.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Ciclo peridomiciliar do *Trypanosoma cruzi*: em seus hospedeiros silvestres A, e em homem B. Fonte: Teixeira, (2007). 17
- Figura 2 Representação no *Trypanosoma cruzi* de um flagelo, cinetoplasto e núcleo. Fonte: <http://www.tpub.com/content/armymedical/2004/07im.jpg>. (modificado, 2011). 18
- Figura 3 Observa-se na figura (A) a representação microscópica de sangue em lâmina: presença de *Trypanosoma cruzi* com presença de flagelo (fase de desenvolvimento tripomastigota). Fonte: plterra.blogspot.com/2007/02/reino-protocista.html. Na figura B, observa-se fotomicrografia microscópica de tecido muscular contendo no seu interior ninho parasitário com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Tese de Mestrado: Influência de reinfecções seqüenciais com clones da cepa colombiana do *Trypanosoma cruzi* com diferentes graus de virulência, sobre a miocardite crônica no modelo murino. Marcos Lázaro da S Guerreiro, UFBA 2009. 18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral.....	14
2.2 Específicos	14
3. METODOLOGIA.....	15
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
4.1 Histórico, Aspectos Biológicos e Taxonômicos da doença de Chagas.....	16
4.2 Aspectos epidemiológicos	190
4.3 Resposta imune a <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
4.4 Patologias da Doença de Chagas.....	22
4.5 A PCR e suas múltiplas aplicações	24
4.6 Uso da PCR como meio de diagnóstico da doença de Chagas.	25
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) é uma doença endêmica da América Latina, onde cerca de 90 milhões de pessoas vivem ou estão expostas a áreas de risco de transmissão. Em levantamento epidemiológico no Brasil, foi demonstrado que a doença acomete cerca de três milhões de pessoas (DIAS, 2001), e distribui-se em vários estados, sua ocorrência depende basicamente da distribuição dos vetores domiciliados (SILVEIRA *et al*, 1984; MARTINS *et al*, 1987).

A endemia pode ser colocada no mesmo patamar de enfermidades mundiais como a tuberculose, desnutrição e parasitoses transmitidas pela água, especialmente pelo fato de esta ser restrita a países em desenvolvimento, que são precários na disponibilidade de recursos (DIAS & DIAS, 1979).

No Brasil, a área correspondente à distribuição de triatomíneos se refere principalmente aos domínios paisagísticos correspondentes aos ambientes abertos tais como cerrado e caatinga (FORATTINI, 1980; DIAS, 1999).

De acordo com Hayes e Schofield, na década de 90 as estimativas apontavam a existência de 18 a 25 milhões de portadores da DC e, 90 a 100 milhões viviam sobre risco imediato de infecção, com registros de 810.000 novos casos da doença a cada ano.

A DC é caracterizada por uma grande variabilidade de sintomas clínicos (cardiopatia, megacólon ou megaesôfago), ou pode mostrar-se assintomática (GILBER, 2007).

No que tange a susceptibilidade à infecção pode ser influenciada por fatores diversos dentre eles: a resposta imune do hospedeiro, virulência, tamanho do inóculo e o tipo de cepa do parasito (ANDRADE, 1979; ANDRADE. *et al*, 1985; MAGALHÃES, ANDRADE, 1991).

Para diagnóstico efetivo na fase aguda da DC são utilizados amplamente diversos exames parasitológicos diretos dentre os quais podemos citar: xenodiagnóstico, hemocultura e esfregaço do sangue periférico. No entanto, estas técnicas estão sujeitas a resultados não tão satisfatórios, pois, dependem de diversos fatores.

A hemocultura e o xenodiagnóstico são exames diretos. A hemocultura diagnóstica requer repicagens frequentes e um controle regido do ambiente e dos meios de cultura para se evitar contaminação por fungos e bactérias o que pode acabar levando a resultados falsos - negativos. O xenodiagnóstico é um diagnóstico que requer a criação no laboratório de ninfas de triatomíneos e, é necessário saber escolher qual a espécie de triatomíneo para que o exame tenha bom êxito (CHIARI *et al.*, 1989, GILBER, 2007).

A Técnica de Machado e Guerreiro é uma reação de fixação de complemento, descrita em 1913. Essa técnica tem sérias limitações, pois, tem como base a realização de uma reação muito complexa, que apresentava problemas de sensibilidade como descritos por Camargo e Takeda em 1979, e Dias e Schofield 1998.

Fife e Muschel (1959) foram os primeiros a padronizarem a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para DC. Esses utilizaram formas de cultura do parasita para realização da reação em tubos. Posteriormente Camargo (1966), padronizou a mesma reação em lâminas e, em 1974 descreveu vantagens de se utilizar essa técnica em laboratórios clínicos. Porém essa reação é passível de reações cruzadas com *Leishmania*, e outros tripanosomatídeos, não sendo esse método 100% específico, mas com sensibilidade em torno de 95% (CAMARGO, 1979).

Outro método indicado pelo Ministério da Saúde é o Imunoenzimático ou reação de ELISA. Esse ensaio foi padronizado na década de 70. Essa técnica chega próximo ao teste de imunofluorescência indireta (IFI), porém sofre a mesma limitação, pois, a sua reação apresenta cruzamento com *Leishmania*, não sendo 100% específico, assim como, o método anterior (CERISOLA *et al.* 1962; CAMARGO, 1966; FERREIRA, *et al.*, 1995, VOLLER *et al.* 1975).

Os métodos indiretos (sorológicos) são alicerces no diagnóstico da doença de Chagas crônica devido a sua boa sensibilidade. Devidos os níveis de anticorpos circulantes que são detectáveis com precisão mesmo décadas após a infecção (VATTUONE *et al.*, 1976; KIRCHOFF *et al.*, 1993).

O exame direto com a utilização da técnica da PCR foi introduzido para detectar especificamente o DNA do *T. cruzi* e, tem sido requisitado como um exame complementar para o diagnóstico da doença de Chagas tanto na fase aguda como na fase crônica.

Esse teste é capaz de detectar o equivalente a uma célula do parasita em quantidade diminuta de sangue, sendo capaz de diagnosticar o insucesso precoce do tratamento com drogas antitripanosomicida, como forma de acompanhar o paciente e estabelecer um critério para cura (BRITTO, 2009).

Muitos estudos demonstram a especificidades para detecção do *T. cruzi*, pelo PCR, dentre as diversas outras técnicas utilizadas para diagnosticar a DC com ausência de reações cruzadas e com especificidade/sensibilidade alta (MIYAMOTO *et al.* 2006).

Este trabalho de revisão bibliográfica justifica-se por reunir diversos estudos sobre a técnica de PCR como uma ferramenta complementar de alta sensibilidade no diagnóstico da doença Chagas.

Os achados da presente trabalho poderão corroborar a nível de graduação para melhoramento e interpretações dos estudos experimentais, assim como, dos casos clínicos que podem ser facilmente observados em pacientes de áreas incidentes que são expostos a várias infecções parasitárias, observando que a DC é considerada uma doença negligenciada causada por ações antrópicas e de alto impacto para o Sistema Único de Saúde (SUS).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo analisar, através de revisão bibliográfica, a eficácia da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como ferramenta de diagnóstico para infecção da doença Chagas.

2.2 Específicos

- Sistematizar informações bibliográficas a respeito da eficácia da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no uso do diagnóstico da doença Chagas;
- Avaliar a especificidade da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como diagnóstico da doença Chagas;
- Comparar a eficácia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para avaliação diagnóstica (monitoramento) de cura durante o tratamento da doença Chagas.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa bibliográfica documental que consiste em expor estudos e análises de vários autores acerca do tema proposto e onde resultará na apresentação de um panorama do tema (KÖCHE, 1997).

Para o desenvolvimento deste trabalho monográfico foi efetuado um levantamento documental de artigos científicos específicos em revistas científicas eletrônicas e sites de busca. Nestes sites foram realizadas pesquisas recorrentes e processuais referentes ao tema, a capitulação dos artigos foi realizada utilizando o nome do pesquisador e palavras-chave como "T. cruzi and PCR. Após essa atividade os artigos foram selecionados para uma posterior leitura. Ainda via internet foram utilizados sites especializados em artigos científicos como Portal da CAPES¹, Scielo² e PubMed.com³. Nestes sites, foram realizadas pesquisas mais específicas o que torna o trabalho atualizado e menos cansativo.

Alguns artigos também foram pesquisados e cedidos gentilmente pela biblioteca da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/Gonçalo Muniz, onde alguns sites já citados anteriormente como Portal da Periódicos eram pagos, os artigos foram viabilizados através do sistema de acesso da própria biblioteca.

Tendo então os materiais a serem estudados em mãos, um trabalho de leitura e triagem foi feito em busca de informações de extrema relevância para o presente trabalho. Estes dados foram avaliados e selecionados de forma a manter apenas os dados confiáveis e de importância para o desenvolvimento do mesmo.

¹ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

² *A Scientific Electronic Library Online.*

³ Publicações Médicas.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Histórico, Aspectos Biológicos e Taxonômicos da doença de Chagas

A doença Chagas ou tripanosomíase americana, atualmente é considerada uma zoonose e um problema de Saúde Pública em toda a América Latina (AL), sendo seu agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, descoberto por Carlos Chagas em Lassance, Minas Gerais, em 1909.

A doença de Chagas afeta cerca de 16 a 18 milhões de pessoas na AL, onde se acredita que ainda existem mais de 100 milhões de expostos ou em risco de infecção, sendo a quarta doença transmissível de maior impacto na AL (COURA, 2007; DIAS, MARCEDO, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A prevalência da DC no Brasil não é uniforme em sua distribuição Geográfica, sendo 4,2% no meio rural e 2,7% na população em geral, elevando-se para 3,2% com a inclusão do estado de São Paulo, segundo o inquérito nacional realizado entre os anos de 1975-1980 (FURUCHO, 2006).

Nos anos 70, o Estado de São Paulo iniciou o combate ativo contra o *Triatoma infestans*, o principal vetor domiciliado da doença no Brasil, com o programa de borrifação de inseticidas em residências e locais onde se encontrava o inseto, visando sua completa erradicação, pois, esse triatomíneo foi o que melhor se adaptou ao domicílio humano (SCHUMUNIS, 1997). Esta espécie foi erradicada nos anos 80, o que propiciou a diminuição radical da transmissão da DC por via vetorial. Outros Estados brasileiros foram aderindo à campanha de erradicação do *T. infestans* aumentando a eficácia do programa (SCHUMUNIS, 1997).

Os dados mostram que casos de infecção pelo *Triatoma infestans*, foi controlado em todo o Brasil, com exceção dos Estados de Tocantins e Bahia (SILVEIRA *et al.*, 2000). Com esse controle da doença houve uma mudança de perfil epidemiológico da doença Chagas graças à grande migração do campo para as grandes cidades, assumindo importância outras vias de contaminação tais como: a

transfusional, congênita, transplante de órgãos e por acidentes laboratoriais (DIAS *et al.*, 2000).

O *Trypanosoma cruzi* agente etiológico da doença Chagas, possui um ciclo de desenvolvimento heteróximo que passa por mudanças morfológicas complexas em seu ciclo de vida no hospedeiro vertebrado da classe Mamalia e no inseto hematófago da Ordem Hemiptera Família Reduviidae (Figura 01).

É caracterizado pela presença de um flagelo e uma única mitocôndria o cinetoplasto (Figura 02). Em hospedeiros vertebrados da Classe Mamalia, ocorrem às formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares (forma de reprodução do parasita) (Figura 03). Em hospedeiros invertebrados e em meios de cultura predominam as formas epimastigotas (REY,1991; SCHAUB, 1989).

Em relação à taxonomia esse parasita, pertence à Subfamília Stercoraria compreendendo os subgêneros: Herpetosoma, Megatrypanum e Schizotrypanum (SMYTH, 1994). Onde estão incluídos os tripanosomas que tem ciclo de desenvolvimento completado na porção retal do vetor com liberação das formas infectivas pelas fezes ou urina, pertencente a essa seção o *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma lewisi* (WHO, 1978).

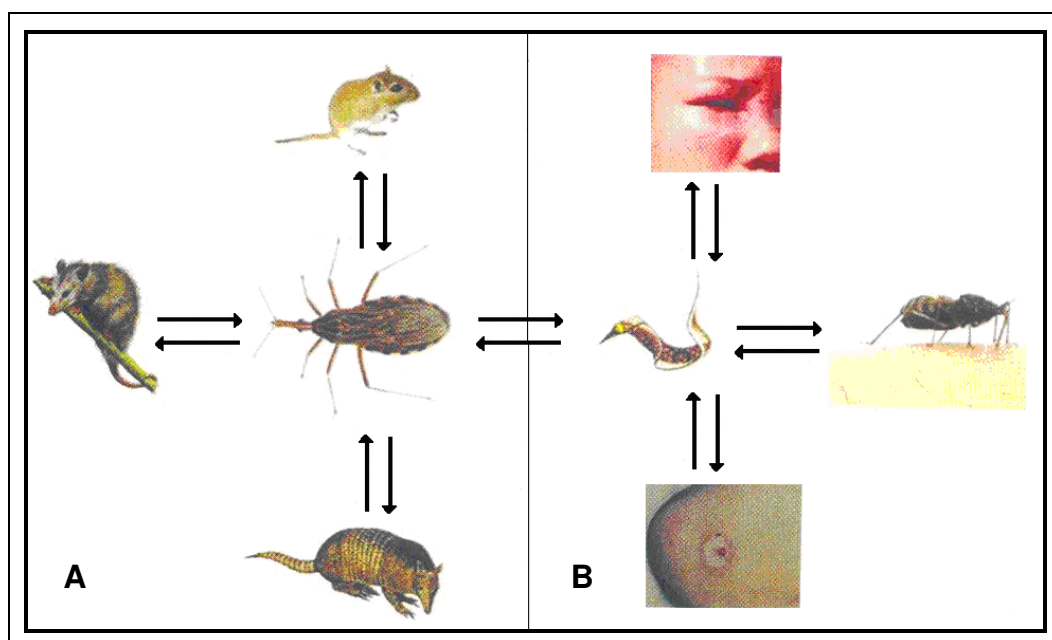


Figura 1 Ciclo peridomiciliar do *Trypanosoma cruzi*: em seus hospedeiros silvestres A, e em homem B. Fonte: Teixeira, (2007).

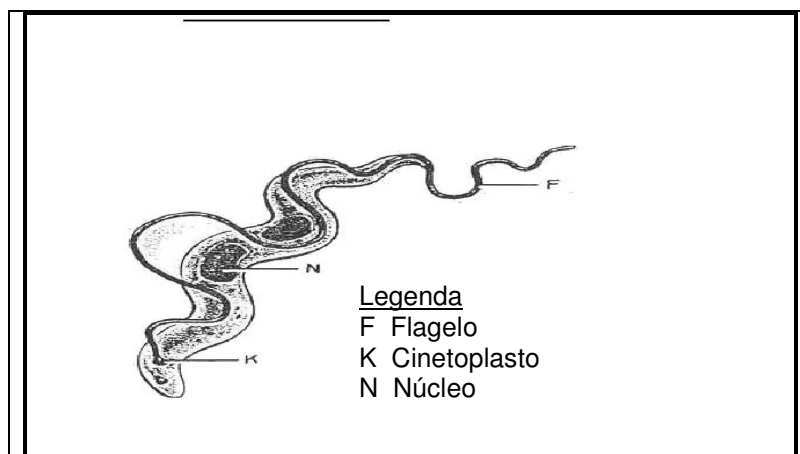


Figura 2 Representação no *Trypanosoma cruzi* de um flagelo, cinetoplasto e núcleo. Fonte: <http://www.tpub.com/content/armymedical/2004/07im.jpg>. (modificado, 2011).

Nos últimos dez anos, uma série de iniciativas e programas multinacionais adotados por múltiplos países em especial o Brasil, levou a reduções significativas nos índices de infecção por vetor que significou melhora da qualidade de vida em milhares de habitantes tanto no Brasil como nas Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

No início da década de 1990, a DC foi classificada tanto pela Organização Mundial quanto pelo Banco Mundial, como a mais grave das doenças parasitárias com impacto socioeconômico na AL, consideravelmente maior do que os efeitos combinados de todas as outras infecções parasitárias do mundo (WORLD BANK, 1993).

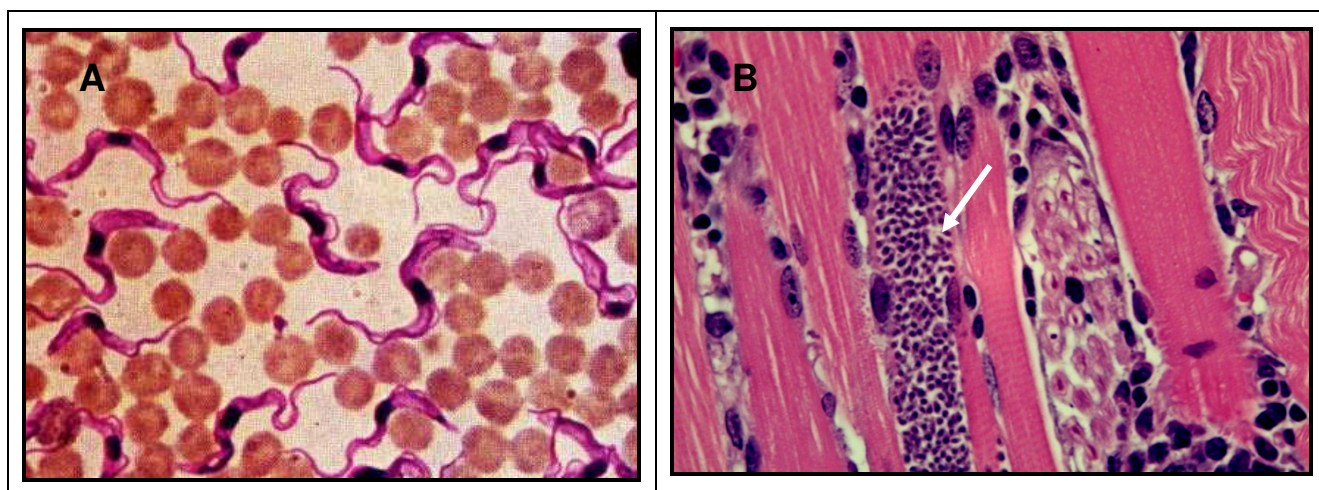


Figura 3 Observa-se na figura (A) a representação microscópica de sangue em lâmina: presença de *Trypanosoma cruzi* com presença de flagelo (fase de desenvolvimento tripomastigota). Fonte: pterra.blogspot.com/2007/02/reino-protocista.html. Na figura B, observa-se fotomicrografia de tecido muscular contendo no seu interior ninho parasitário com formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Guerreiro, S.L.M ; 2009.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é transmitida por barbeiros ou triatomíneos, vetores da DC. O inseto insere sua probóscide (estilete) na pele de sua presa e captura o sangue que necessita, esse tempo de alimentação dura em torno de dez minutos. No momento em que o barbeiro se alimenta, o abdômen do inseto se transforma de uma estrutura achatada em globular, e deposita seu excremento contaminado com formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) do *Trypanosoma cruzi* próximo do local da picada na região da pele (TEIXEIRA, 2007).

A evolução das formas infectantes ocorre na porção anterior do intestino médio do hemíptero, onde as formas tripomastigotas sanguícolas transformam-se em esferomastigotas que é caracterizada por apresentar-se arredondada com flagelo livre, é a transição entre a forma amastigota e as formas flageladas. É encontrada nos hospedeiros invertebrados e posteriormente em epimastigotas. As formas epimastigotas, ao chegarem à porção posterior do intestino médio, encontram um ambiente bioquimicamente favorável, onde se instalam e mantêm a infecção durante toda a vida do inseto, restabelecendo a capacidade reprodutiva do parasita, através de uma multiplicação ativa por divisão binária. Essas formas ao chegarem ao intestino posterior dos triatomíneos, sofrem uma metamorfose retomando à forma tripomastigota. A transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese), é um fenômeno intrínseco e determinante no ciclo de vida deste parasita (REY,1991;SCHAUB, 1989).

4.2 Aspectos epidemiológicos

Os aspectos epidemiológicos distinguem-se basicamente em dois com base na circulação do *Trypanosoma cruzi* na natureza: ciclo silvestre e ciclo doméstico do parasita. Esse aspecto é responsável pela ampla distribuição que vai desde o Sul dos Estados Unidos da América até a Patagônia, geograficamente situado ao nível do paralelo 49° S (CIMERMAM, 2005).

No ciclo de transmissão da tripanosomíase americana, participam mais de duzentas espécies entre hospedeiros e triatomíneos silvestres. O *Trypanosoma cruzi* circula naturalmente entre os mamíferos silvestres e no inseto vetor. Entretanto, os

ciclos da DC nestes animais permanecem com muitas dúvidas, devido à complexidade dos inúmeros hospedeiros e vetores envolvidos. O ciclo doméstico é bem estudado e desse participam o homem, animais sinantrópicos e triatomíneos domiciliares. Seu início ocorreu quando o homem passou a ocupar os ecótopos silvestres, em vivendas rurais, oferecendo abrigo e alimento abundante aos vetores (VINHAES, DIAS, 2000).

Inicialmente a DC era exclusivamente de animais e triatomíneos silvestres, com o passar do tempo a doença passou a acometer também os homens, na medida em que o homem avançou em territórios antes exclusivamente silvestres, modificando o ciclo silvestre ou natural da infecção promovendo múltiplas infecções e microepidemias na zona rural e urbana (NEVES, 1998).

Os principais elos da cadeia epidemiológica que se destacam na doença de Chagas são: mamíferos silvestres, ninhos, triatomíneos silvestres, *Trypanosoma cruzi*; casas domiciliares, mamíferos domésticos, triatomíneos domiciliados, homem, onde esse elo compõe uma biocenose, uma associação de seres de espécies em áreas alimentares ou áreas de abrigo (NEVES, 1998).

Para que a infecção chagásica ocorra em condições naturais é necessário, em primeiro lugar, que haja o contato das pessoas com os triatomíneos infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Participam do processo de infecção diversas outras variáveis dependentes do vetor, como seu grau de antropofilia, tempo entre a picada e a defecação, número e quantidade de evacuações na unidade de tempo e o número de parasitos eliminados nas fezes ou urina.

Além disso, a infecção depende do percentual de formas infectantes nas fezes do barbeiro e sua capacidade de penetração bem como da intensidade do prurido causado pela picada levando o paciente a coçar-se e levando o parasito ao local da picada ou às mucosas. Considerando que a transmissão da infecção é feita pelas fezes e pela urina dos triatomíneos, é de grande importância o tempo de defecação, aqueles triatomíneos que defecam imediatamente após o repasto ou durante a picada, como o *Triatoma infestans* Klug, 1834 e o *Panstrongylus megistus*, Burmeister, 1835, depositando as fezes no local da picada, têm grande importância na transmissão.

Por outro lado, triatomíneos que defecam minutos depois do repasto, quando já estão fora do paciente, como o *Triatoma vitticeps*, Stal, 1859, têm pouca ou nenhuma importância na transmissão (DIAS, 2005).

4.3 Resposta imune a *Trypanosoma cruzi*

Na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* a imunidade inata não previne a expansão parasitária do parasita pelo corpo o que permite que a infecção expanda-se até alcançar níveis elevados do parasita. Já na fase crônica da infecção, as reações imunológicas adquiridas mais eficazes contra o parasita acabam deixando raras formas circulantes tornando a parasitemia subpatente.

No que tange a fase crônica da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, essa tem sido extensivamente analisada em hospedeiros mamíferos (TEIXEIRA, 1987). Nesta fase as reações imune começam pelos anticorpos da classe IgM e pelas subclasses de IgG e IgG2a, associada a reações de imunidade celular incluindo linfócitos T CD4 e CD8. Os macrófagos agem apresentando os antígenos aos linfócitos, ativando-os para torná-los mais eficientes na destruição das formas intracelulares do parasito (FREIRE, PEÇANHA, 1996).

São múltiplos os mecanismos pelos quais a resposta imunológica (humoral e celular) adquirida é regulada durante o curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Na imunoproteção os linfócitos CD4⁺ são os principais componentes de indução da imunidade protetora, já os CD8⁺ são responsáveis pela ação efetora citolítica contra infecções pelo *Trypanosoma cruzi* (TARLETON, 1991).

Vários estudos clínicos e experimentais, vêm demonstrando que linfócitos CD4⁺/TCD8⁺, a citocina interferon-gama (IFN) produzida pelos macrófagos são importantes no controle da multiplicação do parasito durante a fase aguda da infecção. A imunodepressão e o silenciamento de certos genes nos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ diminuem a resposta inflamatória e conseqüentemente a liberação de parasitos nos tecidos (TARLETON, 1991).

Dados da literatura revelam a carência ainda na atualidade de técnicas capazes de detectar ou descrever os vários mecanismos de regulação nas respostas imunes inata e adquirida, contra a infecção chagásica tanto em modelos experimentais, como em humanos infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Em vista disso, pesquisadores em várias linhas de investigação sugerem a criação de redes multidisciplinares, visando à perspectiva de interação dos conhecimentos, visando a melhores interpretações no que tange aos aspectos clínicos, não obstante opiniões

entusiastas de autores que alardeiam o desenvolvimento de vacinas contra a infecção chagásica (KIERSZENBAUM,1993; DOS REIS,1999).

4.4 Patologias da Doença de Chagas

Em relação à transmissão clássica da DC para o indivíduo, essa se faz, quando esse entra em contato com as dejeções intestinais do inseto vetor (triatomíneo), contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas, através das mucosas, outros líquidos de continuidade, ou e alternativamente por outros mecanismos não vetoriais (LARANJA, 1953).

A infecção chagásica pode apresentar-se em duas fases distintas já citadas acima: na fase aguda ou inicial assintomática, podendo ser fatal em até 10% dos casos graves. A grande maioria dos óbitos dá-se por miocardite ou por meningoencefalite quase sempre fatal nos menores de dois anos de idade, segundo observações de próprio Carlos Chagas (CARLOS, 1916). E caracteriza-se pelas primeiras manifestações clínico-imunológicas, em resposta à interação parasito-hospedeiro, desencadeada pela penetração do parasito nas células alvo. Nos humanos e no animal experimental, essa fase inicial da infecção, é observada pela intensa multiplicação do parasito, tendo como conseqüência o surgimento dos primeiros focos inflamatórios (ANDRADE, 1979).

No início da infecção, tripomastigotas aparecem no sangue e se espalham pelo organismo do infectado, multiplicando-se no interior do macrófago do hospedeiro e em outras variedades de células, com predominância de alguns órgãos como: baço, fígado, linfónodos, tecidos conjuntivos intersticiais, miocárdio ou músculo esquelético. Alguns parasitos, sob a forma de tripomastigotas, recirculam e voltam a se localizar em outras células, reiniciando o ciclo (MUNIZ, 1947; VIANNA, 1911).

A evolução e o prognóstico freqüentemente não são malignos levando os indivíduos a fase crônica indeterminada da infecção. A fase aguda pode durar de um a três meses após a infecção e é caracterizada por uma intensa parasitemia, sendo na maioria dos indivíduos imperceptível devido à escassez ou ausência de

manifestações clínicas. A presença do parasito desencadeia uma intensa reação inflamatória, com conseqüente formação de anticorpos específicos, a partir da 1ª semana do período de incubação da infecção, o que pode corresponder ao início da parasitemia (AMATO-NETO *et al.*, 1997).

É nessa fase da infecção e a depender do local da inoculação do parasito, que o macrófago a célula com maior chance de adesão, pode fagocitar o parasito que passa a se multiplicar podendo sofrer expansão intracelular, assim, como em qualquer outra célula do hospedeiro (NEVES, 1998).

A outra fase é conhecida como fase crônica, que se caracteriza por uma miocardite (inflamação do miocárdio, a camada muscular grossa da parede do coração), progressiva associada à presença de células inflamatórias mononucleares, áreas de necrose de fibras cardíacas e musculares, formação de trombos, envolvimento do sistema nervoso autônomo e do sistema excito-condutor do miocárdio, dilatação de câmaras cardíacas e fibrose cicatricial (ANDRADE, 1979; ANDRADE, 1999; ANDRADE *et al.*, 2000).

Essa fase é também marcada pela escassez de parasitos no sangue e pelos elevados níveis de anticorpos, destacando-se devido a sua elevada morbimortalidade nas áreas endêmicas (CANÇADO, 1985). A inflamação e a miocitólise e fibrose ocorrem progressivamente, acometendo os três folhetos do órgão, onde o volume pode ser normal, pequeno ou grandemente aumentado (LOPES, 1997).

O reconhecimento desta fase em pacientes assintomáticos é feita pelas alterações eletrocardiográficas associadas à cardiomiopatia crônica. Estudo prospectivo mostrou que entre a população com infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi*, 57 por cento das mortes são devidas as doenças de Chagas, onde destes, 58 por cento morrem de insuficiência cardíaca e 37,5 por cento são acometidos por morte súbita. O restante dos pacientes morrem de doença digestiva, megaesôfago ou megacólon (PRATA, 1975, p. 191).

O diagnóstico desta fase tem como base os exames sorológicos devido à alta quantidade de anticorpos que existe, assim, os exames parasitológicos diretos ou indiretos não são recomendados, por apresentar baixa sensibilidade (MS, 2005), possuindo, entretanto 100% de especificidade, porém não podem ser considerados como padrões por terem uma sensibilidade limitada (YASUDA, LINDOSO .2003).

O diagnóstico laboratorial na fase crônica da DC se dá por diversas técnicas e métodos citados anteriormente. Com o passar do tempo e do advento de novas

tecnologias, outros métodos e técnicas foram sendo incorporados como ferramentas na busca e detecção de critérios de cura. Em ordem cronológica temos o uso da Hemaglutinação e da Imunofluorescência Indireta. Ambos os métodos indiretos e, a reação de ELISA realizados respectivamente (CERISOLA *et al.* 1962; CAMARGO, 1966; VOLLER *et al.* 1975).

Posteriormente novos testes utilizando-se de métodos moleculares surgiram como a reação em cadeia da polimerase (PCR) que emprega uma solução mix de nucleotídeos sintéticos e um DNA como marcador positivo.

4.5 A PCR e suas múltiplas aplicações

A Reação em Cadeia da Polimerase é uma técnica molecular que permite a amplificação de sequências específicas do ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA), sendo este último realizado a partir da síntese de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) utilizando-se a enzima transcriptase reversa. A PCR foi originalmente descrita por SAIKI *et al.* (1985) e, aprimorada por Mullis, *et al.* (1987) e conseqüentemente tem sido utilizada em vários campos da ciência (VIEIRA, 2009).

A PCR é uma técnica com alta especificidade/sensibilidade e de ampla aplicabilidade, com centenas de métodos descritos. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de DNA a partir de quantidade diminutas de material. Esta técnica pode ser utilizada na realização de estudos de DNA obtidos de apartir de múltiplas amostras celulares, sendo atualmente utilizado como técnica complementar no diagnóstico laboratorial de múltiplas infecções (CHEN, *et al.* 2003).

Recentemente, a PCR sofreu um extraordinário avanço, com o desenvolvimento de métodos quantitativos automatizados, baseados em sondas fluorescentes e de aparelhos capazes de monitorar em tempo real a reação de amplificação (CAVALCANTI *et al.*, 2008).

Para a realização da PCR, existe a necessidade da obtenção de ácidos nucléicos, trazendo na literatura algumas técnicas que descrevem a sua importância onde são utilizadas substâncias e estratégias diferentes (BOOM, 1990).

Dentre os diversos métodos para extração do DNA o mais utilizado são fenóis com digestão enzimática, partículas de sílica associadas à digestão enzimática e partículas de sílica sem digestão enzimática. Essa técnica de extração também pode ocorrer na presença de digestão com enzimas proteolíticas, purificação com solventes orgânicos e precipitação com etanol (GOELZ, *et al.* 1985; JACKSON, *et al.* 1990).

A PCR já existe para detecção de uma série de enfermidades, como por exemplo, para AIDS, onde amostras de pacientes positivos são submetidas ao teste de quantificação viral. Também já se vem utilizando essa técnica com sucesso para confirmação do diagnóstico de hepatites B e C (GILBER, 2007).

Quando se pretende incluir uma nova técnica de diagnóstico na rotina dos Laboratórios de Análises Clínicas, deve-se ainda observar sua eficácia quanto à sensibilidade e especificidade, sendo que a mesma deve ser preferencialmente de baixo custo, baixa complexidade e deve desprender o mínimo de tempo para se alcançar o resultado preciso e desejado (MARCON *et al.*, 2002).

4.6 Uso da PCR como meio de diagnóstico da doença de Chagas.

Existe atualmente um arsenal de técnicas laboratoriais para o diagnóstico da doença de Chagas humana. No entanto, poucos trabalhos sobre seu diagnóstico levaram em consideração a diversidade genética do agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*.

Várias publicações recentes têm demonstrado associação estatística entre divergência filogenética e as propriedades biológicas dos genótipos de *Trypanosoma cruzi* (REVOLLO *et al.*, 1998; TOLEDO *et al.*, 2002 e 2003). Recentemente, a PCR vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *Trypanosoma cruzi* em amostras de pacientes na fase crônica doença de Chagas (BRITTO *et al.*, 1993; DIAZ, 1992; GOMES *et al.*, 1998).

A Reação em Cadeia da Polimerase constitui-se como instrumento diagnóstico valioso, notadamente no caso de doenças infecciosas graves, devido à sua capacidade para detectar e distinguir agentes infecciosos de forma direta com maior sensibilidade/especificidade (SILBER *et al*, 1997).

É capaz de detectar *Trypanosoma cruzi* em pacientes, a partir de amostras de sangue periférico, 30 dias antes do aparecimento de sinais e sintomas da doença ou mesmo de reativação da mesma (MALDONADO *et al.*, 2004).

As várias reações diferentes da PCR visam ampliar o DNA do cinetoplasto ou DNA satélite nuclear. Essas técnicas têm sido usadas com sucesso para diagnosticar a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença, sendo uma boa maneira de avaliar a persistência dos poucos parasitos existentes nesta fase da infecção (WOR, 2002).

Considerando-se, portanto, que pacientes chagásicos moradores de áreas endêmicas estão sujeitos à infecção por múltiplos patógenos, reveste-se de importância à associação de métodos clássicos de diagnóstico (parasitológicos) juntamente com os modernos (moleculares), como ferramentas para um diagnóstico seguro e preciso da doença de Chagas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a opinião dos autores nos artigos utilizados na pesquisa, buscou-se evidenciar de forma específica as vantagens e especificidade da PCR quando comparado aos outros métodos de tratamento como: xenodiagnóstico e a hemocultura para diagnóstico da doença de Chagas.

Quando comparado com os testes parasitológicos (xenodiagnóstico ou hemocultura) para diagnóstico da doença de Chagas, a técnica de PCR (Wincker et al 1996; Britto et al. 1995a) mostrou-se consideravelmente mais consistente em termos de sensibilidade.

De acordo com Yan & Rothman (2004) e Luquetti & Rassi (2000), a utilização da PCR tem-se mostrado um teste vantajoso, pois se fazendo uso deste procedimento, o mesmo revelou resultados vantajosos em relação a tempo empregado e aos métodos parasitológicos diretos. No entanto, tal procedimento metodológico ainda requer investimento e pesquisadores qualificados para desenvolvimento e melhoramento na manipulação da técnica, pois é uma técnica complexa e com facilidade de contaminação.

Por outro lado, o sistema *TaqMan*, que é uma técnica de PCR em tempo real, fornece dados quantitativos precisos sem necessidade de análise bioquímica posterior dos produtos amplificados, evitando desta forma os riscos de contaminação laboratorial pelos *amplicons*, um dos problemas inerentes à tecnologia de PCR (MARIN, et al. 2002; MONTARINO et al.2004).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), segundo Avila et al. (1993) e Wincker et al. (1994), é um método de diagnóstico com alta confiabilidade em relação xenodiagnóstico ou sorologia em clínicas e em estudos epidemiológicos da DC na fase crônica, a especificidade dessa reação está em torno de 45 a 100%. Já que o xenodiagnóstico apresenta positividade entre 9% a 87,5% (BARBOSA et al. 1983; BORGES et al 1989). Já hemocultura tem alcançado na mesma fase da doença, 0% a 94% de positividade (BARBOSA et al. 1983; BRENER et al. 1992). Pode-se perceber que, dentre os métodos citados acima, a PCR mostra-se mais específica para diagnosticar a fase crônica da DC, vindo a confirmar com os achados descritos nesse levantamento bibliográfico.

A PCR pode ainda ser mais utilizada no acompanhamento de pacientes tratados para verificação da persistência de parasitos, apresentando-se mais satisfatório que o xenodiagnóstico (BRITO *et al.* 2001).

Neste contexto é importante salientar a importância do procedimento e uso da PCR como meio de diagnóstico em modelos humanos e experimentais, esse procedimento tem demonstrado alta sensibilidade na detecção de DNA de *Trypanosoma cruzi* (AVILA *et al.* 1993; GOMES *et al.* 1998; MOSER *et al.* 1996).

Alguns estudos, porém, afirmam que a técnica da PCR pode não ter uma alta sensibilidade em relação aos outros métodos. Em um estudo publicado em 1995 em coletas de *T. infestans* da Argentina, a discrepância entre os dois métodos (microscopia e PCR), foi 14,70%: microscopia foi significativamente mais sensível que a PCR quando comparado a ampliação da região hipervariável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* (MARCET *et al.* 2006). Mas normalmente múltiplos estudos afirmam ser a PCR é um método mais sensível, por exemplo, uma publicação de 1996, demonstrou a detecção de *Trypanosoma cruzi* em *T. infestans* alimentados em pacientes com DC crônica superior a 46% quando comparado à detecção do exame microscópico (SHIKANAI *et al.* 1996).

A Reação em Cadeia da Polimerase apresenta-se como uma alternativa no controle pós-terapêutico pela sua maior sensibilidade frente os testes parasitológicos diretos (hemocultura e xenodiagnóstico) por serem esses de baixa sensibilidade com resultados negativos e por vezes inconclusivos após tratamento (BRITTO *et al.* 1995; COURA *et al.* 1996; GOMES *et al.* 1999).

Na busca para desenvolver testes mais sensíveis, estudos clínicos e experimentais, passaram a utilizar a tecnologia de PCR com o objetivo de detectar especificamente *Trypanosoma cruzi*. Nessa técnica, o DNA de amostras de sangue de pacientes chagásicos, são coletados e avaliados abrindo novas possibilidades no diagnóstico e, na avaliação de follow-up, que visa sempre buscar respostas quanto ao sucesso da quimioterapia anti-chagásica (Ávila *et al.* 1991, 1993, 2001, Junqueira *et al.* 1996, Gomes *et al.* 1998, 1999, Castro *et al.* 2002 ;Galvão *et al.* 2003).

A PCR também tem se mostrado ser uma técnica bastante eficaz na detecção de uma série de enfermidades e outras doenças como: AIDS, onde amostras de pacientes positivos são submetidas ao teste de quantificação viral, e com sucesso para confirmação de diagnóstico de hepatites B e C (GILBER, 2007).

Quando usado o teste da PCR para diagnosticar a DC, ela independe do estágio em que a doença se encontra, independe também do tamanho (estádio de vida) ou habitat do triatomíneo.

As apresentações de hipóteses moleculares da PCR em tempo real são úteis na demonstração dos níveis absolutos de *Tripanosoma cruzi* circulantes em indivíduos infectados, permitindo descrever uma possível associação entre a carga parasitária e formas clínicas da DC. Do mesmo modo, ensaios da PCR em tempo real são mais vantajosos em relação ao PCR convencional, essas vantagens são: maior rapidez na obtenção dos resultados (eliminação da etapa de detecção dos produtos pós-PCR); eliminação da possibilidade de resultados falso-positivos decorrentes de contaminação com produtos previamente amplificados (elimina a manipulação de amplicons); possibilidade de análise de um grande número de amostras em um único ensaio e possibilidade de detecção não apenas do patógeno, mas também a sua quantificação absoluta (MAIA *et al.* 2010).

Segundo Blanco *et al.* (1999, 2000), a Reação em Cadeia de Polimerase é uma ferramenta útil para a detecção precoce de falha do tratamento em pacientes que iniciam tratamento na fase indeterminada da doença. Foi demonstrado que a PCR não é um método adequado como único diagnóstico nesta fase da DC, mas sim como um complemento à sorologia, (WINCHER *et al.* 1996). Apesar do alto custo e quando a obtenção de resultados diferentes em diferentes pesquisas tanto na fase crônica como na aguda da doença, o Ministério da Saúde, não indica a PCR devido da alta eficácia como um teste complementar pós tratamento.

Gilber (2007), em seu trabalho de avaliação dos diferentes testes sorológicos e moleculares para diagnóstico DC, observou resultados discrepantes quando comparado os testes de ELISA, IFI (Imunofluorescência indireta) e PCR, em seus grupos de pacientes. Esses grupos advêm de vários grupos epidemiológicos dentre eles: pacientes ambulatoriais com DC, pacientes encaminhados pelas Regionais de Saúde do interior do estado do Paraná e pacientes do serviço de Endoscopia Per - Oral. Todos os pacientes que foram submetidos a esses testes tiveram seus resultados conclusivos para a DC. Para os pacientes do ambulatório o resultado obtido com a positividade para o teste ELISA foi 58,8%, e para o IFI 61,8% aproximadamente. Quando os resultados foram com os pacientes do Serviço de Endoscopia Per – Oral, verificou-se 75,8% de positividade tanto para o teste ELISA como para o IFI, e por fim os pacientes encaminhados pelas Regionais de Saúde do

interior do Estado onde foram encontrados triatomíneos em suas moradias, deram resultados semelhantes entre o IFI e ELISA em torno de 50% de positividade.

Os resultados encontrados por Gilber (2007) foi concordante com Teixeira *et al.* (1994), onde ambos avaliaram diferentes testes sorológicos, encontrando 100% de sensibilidade para o teste ELISA e especificidade de 94% em pacientes na fase crônicos da DC, e para o teste IFI foram encontrados 100% de sensibilidade e 95% de especificidade. Apesar dos resultados encontrados ambos os métodos apresentaram reações cruzadas com outras doenças como a leishmaniose visceral ou tegumentar, dificultado assim seu uso como resultado final.

O estudo acima só confirma que o trabalho feito com os métodos já citados (sorológicos) não são de todo confiáveis devido o cruzamento com outras doenças, isso, quando se pensa em pacientes em áreas com múltiplos patógenos.

Com a utilização da PCR para detecção da DC nos mesmos pacientes, os resultados foram de aproximadamente os mesmos atendidos em laboratórios 95%, os do serviço de Endoscopia Per- Oral de 95,6% e os vindos das regiões do interior do Estado houve concordância de 100% entre a sorologia e a PCR.

Para preencher a lacuna deixada pela hemocultura na confirmação da DC em pacientes suspeitos, a reação de PCR utilizando marcadores específicos para *Tripanosoma cruzi*, tem demonstrado alta sensibilidade para o diagnóstico (TAIBI *et al.*, 1995, KIRCHHOFF *et al.*, 1996, MARCON *et al.*, 2002, RAMIREZ *et al.*, 2002, BRAZ-ALMEIDA, 2006) o que torna uma técnica bastante interessante para ser usada em rotina para diagnosticar doenças parasitárias.

Esse estudo de GILBER veio para reafirmar e concordar com o estudo desenvolvido, que dentre os métodos, ELISA, IFI e PCR, a PCR continua sendo o método mais eficaz para diagnóstico da DC, devido a sua especificidade, confiabilidade, tornando assim esse teste mais vantajoso. A PCR na atualidade é considerada uma ferramenta precisa para a detecção do *T. cruzi*, porém, devido ao seu alto custo recomenda-se como uma ferramenta complementar aos testes sorológicos clássicos (ELISA e IFI).

Em relação à técnica de Machado - Guerreiro a mesma possui desvantagem, pois padronizou-se ao longo do tempo e é muito difícil de ser obtida caindo assim no desuso, principalmente porque encontraram muitas reações cruzadas com indivíduos com hanseníase (PESSOA, 1982).

Apesar dos resultados promissores com técnica de PCR, ainda deveram existir mais estudos sobre a coerência e a conformidade quanto ao uso desse testes visando baratear os custos para postular esse teste como padrão-ouro em diagnóstico da DC. Assim a exigência de equipamentos especializados e do alto custo dos testes, a PCR torna difícil a utilização normal e rotineira desse teste em todo o sistema de saúde. No entanto, estudos paralelos e grupos de investigação sugerem uma “construção” para tornar a PCR um teste de padrão-ouro, usando como diagnóstico, além de resultados clínicos e epidemiológicos (VACCA *et al.* 2006).

A Reação em Cadeia Polimerase mostrou-se em diversos artigos ser um teste com alta especificidade e de excelente confiabilidade para a detecção e diagnóstico da DC, bem como, um teste bastante vantajoso, mas devido o seu alto custo e dificuldade de manipulação não pode se tornar um teste de padrão-ouro, igual a outros testes já citado durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Os resultados obtidos nesse levantamento bibliográfico indicam que o método da PCR é seguro e eficaz, tanto no diagnóstico quanto na avaliação pós tratamento da doença de Chagas.

6. CONCLUSÃO

- Foi possível através de estudos e conclusões de outros autores utilizados nesse trabalho, evidenciar a eficácia da técnica da PCR para diagnóstico da doença de Chagas;
- A PCR é considerada uma ferramenta útil para detectar falha no tratamento com pacientes na fase indeterminada da doença de Chagas, porém não é um único método adequado para diagnóstico, devido ao seu alto custo sendo esse indicado como complementar aos testes sorológicos;
- Em comparação aos métodos parasitológicos (Hemocultura e Xenodiagnóstico) em pacientes suspeitos, a reação da PCR utilizando-se de marcadores específicos para *T. Cruzi* tem demonstrado alta sensibilidade para diagnóstico da doença de Chagas;
- A PCR é um teste confiável, devido a falta de reações cruzadas ou falso positivo com outras doenças;
- A Reação em Cadeia da Polimerase é um teste complementar muito útil para confirmar diagnóstico, especialmente nos casos de sorologia duvidosa de pacientes assintomáticos, pois esse acabar por confirmar ou excluir o diagnóstico.

REFERÊNCIAS

AMATO-NETO, V.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; AMATO, V. S. Doença de Chagas CHAGAS, C. **Tripanomíase Americana. Forma aguda da moléstia**. Mem Inst Oswaldo Cruz 8: 37-65. 1997.

ANDRADE S.G, PIMENTEL AR, DE SOUZA MM, ANDRADE ZA .Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**. v. 63, p. 64-70, 2000.

ANDRADE, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p.17-27, 1990.

ANDRADE, S.G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A.S.; GRIMAUD, J.A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 187-200, 1991.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M.; ANDRADE, S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 18, p. 499-506, 1985.

ANDRADE, Z.A. A patogenia da doença de Chagas. **Rev. Ciên. Cult.**, v. 31, supl, p. 55-59, 1979.

ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl. 1, p. 71-80, 1999.

AVILA HÁ, SIGMAN DS, COHEN LM, MILLIKAN RC, SIMPSON L. Polymerase chain reactin amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas' diseases. **Mol Biochem Parasitol.**; 48: 211-22. 1991.

ÁVILA SLM; FERREIRA A.W. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

AVILA, H., BORGES-PEREIRA, J., THIEMANN, O., DE PAIVA, E., DEGRAVE, W., Detection of *Trypanosoma anosoma cruzi* DNA in serum. *Journal of Clinical Microbiology cruzi* in blood specimes of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Compar- ison with serology and xenodiagnosis. *Journal of ClinicalMicrobiol- ogy* **31**, 2421–2426. 1993.

BARBOSA. W, CZEREWUTA AC, OLIVEIRA RL. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. **Revista Patologica Tropical**;12:155-63. 1983.

BLANCO SB, SEGURA EL, GÜRTLER RE. El control de la transmisión congénita de *T. cruzi* en la Argentina. *Medicina (B Aires)* 59 (Suppl. 2): 138-142. 1999.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 495-503, Mar. 1990.

BORGES-PEREIRA J, WILLCOX HPF, MARCONDES CB, COURA JR. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. **Revista Tropical Sociedade Brasileira Medicina** ;22:39-44. 1989.

BRAZ-ALMEIDA, L. **Comparação da reação em cadeia da polimerase com o exame microscópico na detecção de *T. cruzi* em amostras do trato digestório do *T. infestans*.** São Paulo, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo. 2006.

BRENER Z. DIAGNOSTIC TESTS FOR CHAGAS DISEASE. IN: WENDEL SB, BRENER Z, CAMARGO ME, RASSI A, editors. *Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine*. São Paulo: ISBT Brazil' 92; p. 153-64. 1992.

BRITTO C, CARDOSO MA, VANNI CM, HASSLOCHER-MORENO A, XAVIER SS, OELEMANN W ET AL. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110:241-7. 1995.

BRITTO C, CARDOSO MA, WINCKER P, MOREL CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 88:1711-2. 1993.

BRITTO, C. CONSTANÇA. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations . *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 122-135, 2009

BRITTO, C. *et al.* Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 823-826, aug. 2001.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.8, n. 5, p. 227-235, sep./oct. 1966.

CAMARGO, M. E.; AMATO-NETO, V. Anti-*Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 16, n. 4, p. 200-202, jul./aug. 1974.

CAMARGO, M. E.; Laboratory Diagnosis for seroepidemiology of Chagas' disease. Ann.Congr. Intern D. Chagas, Rio de Janeiro: H.7-8. 1979.

CANÇADO JR. Tratamento específico. In: CANÇADO JR, Schuster M (Eds). Cardiopatia Chagásica, Belo Horizonte: **Fundação Carlos Chagas**. 1985.

CASTRO AM, LUQUETTI AO, RASSI A, RASSI GG, CHIARI E, GALVÃO LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88: 894-900. 2002.

CAVALCANTI MP, LORENA VMB, GOMES Y.M. Avanços Biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista Patologia Tropical**, v. 37, p. 1-14, 2008.

CERISOLA JA, FATALA CHABEN M, LAZZARI JO. Hemagglutination test for the diagnosis of Chagas' disease. *Prensa Med Argent* 49: 1761-1767; 1962.

CHEN, B.; CLEJAN, S. Rapid preparation of tissue DNA from paraffin-embedded blocks and analysis by polymerase chain reaction. **J Histochem Cytochem**, v. 41, n. 5, p. 765-768, May 2003.

CHIARI E, DIAS JCP, LANA M, CHIARI CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. **Revista Tropical Sociedade Brasileira Medicina**. 22: 19-23. 1989.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN S. (Org.). **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 1-375.2005.

COURA JR, BORGES-PEREIRA J, ALVES FILHO FI, CASTRO JÁ DE, CUNHA RV DA, COSTA W, JUNQUEIRA AC. morbidade da doença de Chagas em áreas do sertão da Paraíba e da caatinga do Piauí. **Revista Tropical Sociedade Brasileira Medicina**. 29:197-205. 1996.

COURA JR.,. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I): 113-122, 2007.

COURA, J. R. . **Tripanosomose, Doença de Chagas.**. Ciência e Cultura (SBPC) ^{JCR}, Rio de Janeiro, v. 55, p. 30-33, 2003.

DIAS JCP, Schofield CJ. Controle da transmissão transfusional da doença de Chagas na iniciativa do Cone Sul. **Revista Tropical Sociedade Brasileira Medicina.** 3: 373-83. 1998.

DIAS, J. C. P.; MACEDO, V. O. Doença de Chagas. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitológicas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 557-593. 2005.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. **Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas:** uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 127-134, 1997.

DIAS, J. C. P.; DIAS, R. B. Aspectos sociais da Doença de Chagas. **Revista Medicina. Goiana** .v.25, p.257-268, 1979.

DIAS, J. C. P.; MACHADO, E. M.; FERNANDES, A. L.; VINHAES, M. C.; General situation and perspectives of Chagas' disease in Northeastern Region, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, suppl. 2, 13-34, 2000.

DIAS, J. C. P.; O desafio da Doença de Chagas nos centros urbanos. **Revista Tropical Sociedade Brasileira Medicina**, v.32, p.45-48, 1999. Supl.II.

DIAS, J. C. P.;Doença de Chagas. Ambiente, participação e Estado. **Cad Saúde Pública**; 17 Suppl: 165-9. 2001.

DIAZ C, NUSSENZWEIG V, GONZALES A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* ;46:616-23. 1992.

DOS REIS, M.G. Cell mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Today**, v. 13, p. 335-340, 1997

FERREIRA, A. W. *et al.* Aspectos de padronização de testes sorológicos para a doença de Chagas. Um teste imunoenzimático para a triagem de doadores de sangue. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 2, p. 123-128, mar./abr. 1995.

FIFE Jr., E. H.; MUSHEL, L. H. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 101, n. 3, p. 540-543, jul. 1959.

FORATTINI, O. P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, v.14, p.265-299, 1980.

FREIRE-DE-LIMA C, PECANHA LM, DOS REIS GA. Chronic experimental Chagas' disease: functional syngeneic T-B-cell cooperation in vitro in the absence of an exogenous stimulus. *Infect Immun*; 64(7):2861-6, 1996.

FURUCHO, C. R. **Diagnóstico de doença de Chagas em bancos de sangue: linfoproliferação, detecção de anticorpo e estudo epidemiológico em indivíduos com provas sorológicas inconclusivas**. São Paulo: Dissertação de Mestrado: Universidade de São Paulo. 2006.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S. & JURBERG, J., A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa 202**: 1-36. 2003.

GILBER, R.S . *Reação em cadeia da polimerase em comparação com o Teste de imunofluorescência indireta (ifi) e Elisa (enzimaimunoensaio) no diagnóstico para a doença de chagas*. 2007.

GOELZ, S. E.; HAMILTON, S. R.; VOLGELSTEIN, B. Purification of DNA from formaldehyde-fixed and paraffin- embedded human tissue. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 130, n. 1, p. 118-126, July 1985.

GOMES ML, GALVÃO LMC, MACEDO AM, PENA SDJ. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* ;60:205-10. 1999.

GOMES ML, MACEDO AM, VAGO AR, PENA SD, GALVAO LM, CHIARI E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 88:28-33 1998.

GUEVARA, E.A. et al. PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* useful for specific diagnosis of human Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34, 485–486. 1996.

HAYES, R. J.; SCHOFIELD, C. J. Estimación de las tasas de incidencia de infecciones crónicas a partir de La prevalencia: la enfermedad de Chagas en America Latina. **Bol. Of. San. Pan.**, v.108, p.308-316, 1990

INTEGRATED PUBLIS HING. *Trypanosoma cruzi*. Disponível em :< www.Tpub.com/content/armymedical/DM0842/MD084200407>. Acesso em 14 de jan. 2011.23:20:03. Modificado 2011.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

JACKSON, D. P.; LEWIS, F. A.; TAYLOR, G. R. *et al.* Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. **J Clin Pathol**, v. 43, n. 6, p. 499-504, June 1990.

JUNQUEIRA ACV, CHIARI E, WINCKER P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 129-132. 1996

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12: 210-223. 1993.

KIRCHHOFF, L. V. *et al.* Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Clinical of Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1171-1175, may. 1996.

KIRCHHOFF, L. V.; American trypanosomiasis (Chagas'disease): a tropical disease now in the Unites States. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 9, p. 639-644, 1993.

KÖCHE, J. C. **Fundamentos de Metodologia Científica: teoria da ciência e prática da pesquisa**. 16ª edição, Rio de Janeiro: Editora Vozes, 1997.

LARANJA, F.S. Clinical aspects of Chagas' disease. **Rev. Bras. Med.**, v. 10, p. 482-491, 1953.

LOPES, ER, CHAPADEIRO. E; Dias J.C.D; COURA J.R. **Anatomia patologica da doença de chagas humana**. Um manual prático para o clinico geral. Rio de Janeiro: FIOCRUZ , 67- 84, 1997.

LUQUETTI AO, RASSI A. Diagnóstico laboratorial da Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. (Org). *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 17. p. 344-378. 2000.

MAIA M. S; RAMOS P. R.; LORENA V M. BARROS. **Avanços do diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas após 100 anos da sua descoberta, *Revista Tropical Sociedade Brasileira Medicina.*** 34- 45. 2010.

MALDONADO, C. *et al.* Using Polymerase Chain polymerase reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. **TheJournal of Heart and Lung Transplantation**, v. 23, n. 12, p. 1345-1348, dec. 2004.

MARCET PL, DUFFY T, CARDINAL MV, BURGOS JM, LAURICELLA MA, LEVIN MJ, KILTRON U, GÜRTLER RE, SCHIJAM AG: **PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina.** *Parasitology*, 132:57-65. 2006.

MARCON GE, ANDRADE PD, DE ALBUQUERQUE DM, WANDERLEY JDAS, DE ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, COSTA SC. Use of a nested polymerase chain reaction (NPCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 43 (1), 39-43. 2002.

MARIN LJ, CUNHA AA, AQUINO VH, FIGUEIREDO LTM. **Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativo utilizando plasmídeo clonado com parte do gene GB de citomegalovírus.** *Medicina, Ribeirão Preto*, v.35, p. 85-94, 2002.

MARTINS AV, VERSIANI V, TUPINANBÁ A. Estudo sobre a tripanosomíase americana em Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 35:285. 1987.

MIYAMOTO, C.T., GOMES, M.L., MARANGON, A.V., ARAUJO, S.M., BAHIA, M.T., LANA, M., TOLEDO, M.J.O. *Trypanosoma cruzi*: sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting the parasite in the blood of mice infected with different clonal genotypes. *Experimental Parasitology* 112, 198–201, 2006.

MONTARINO M, FRANCESCHI A, MANCIANTI F, BAZZOCHI C, GENCHI C, BANDI C. **Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*.** *Parasitologia.* Jun: 46 (1-2): 136-7. Review, Italian. 2004.

MOSER M. Management of hypertension, Part I. *Am Fam Physician* ; 53: 2295-2302. 1996.

MSB – MINISTÉRIO DA SAÚDE BRASILEIRA. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30 (Supl. III): 12-14. 2005.

MUNIZ, J.; AZEVEDO, A.P. "**Novo conceito da patogenia da doença de Chagas**". *O Hospital*; 32: 165-183. 1947.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 9ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Pessoa Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 125-182. 1982.

PRATA, A. R. **Natural history of chagasic cardiomyopathy**. In: American Trypanosomiasis Research. Pan-Am. Health Organ. Publ. nº 318 ,p. 191.1975.

RAMIREZ, L. E. *et al.* High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Tripanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formely – endemic área of Chagas disease in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 84, n. 3, p. 189-198, dec. 2002.

REVOLLO S, OURY B, LAURENT JP, BARNABÉ C, QUESNEY V, CARRIÉRE V, NOËL S, TIBAYRENC M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol*, 89, 30-39. 1998.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan. 2ed. pp. 128-137. 1991.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of b globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dec. 1985.

SCHAUB, GA. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies o development of two strains in small instestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. **Exp Parasitol**, 68: 260-273. 1989.

SCHUMUNIS, G. Tripanossomíase Americana: seu impacto nas Américas e perspectivas de eliminação. In: DIAS, J. C. P; COURA, J. R. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem para o clínico geral**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 11-23. 1997.

SHIKANAI-YASUDA MA, OCHS DE, TOLEZANO JE, KIRCHOFF LV: **Use of the polymerase chain reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors**. *Trans R Soc Trop Hyg*, 90(6):649-51,1996.

SILBER, A. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of *primers* (BP1/BP2) targeted it a nuclear DNA sequence. **Experimental Parasitology**, v. 85, n. 3, p. 225-232, mar. 1997.

SILVEIRA AC, FEITOSA VR, BORGES R. Distribuição de triatomíneos capturados no ambiente domiciliar no período de 1975/1983, no Brasil. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 36:15-312. 1984.

SILVEIRA, A. C.; VINHAES, M. C. **Grupo de trabalho em doença de Chagas**. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2000.

SMYTH, J. D. **Introduction to animal parasitology**. 3. ed. New York: Cambridge University Press, 1994.

TAIBI, A. *et al*. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by sorológicos polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. **Parasitology**, v. 111, n. 5, p. 581-590, dec. 1995

TARLETON, RL. **The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease**. *Res Immunol*. 142:130-133. 1991.

TEIXEIRA, A. Os Jogos Eônicos. In: TEIXEIRA, A. **Doença de Chagas e evolução**. Brasília, ed. UnB: Finatec, Cap. 2. p.29-50; 2007.

TEIXEIRA, A. The stercorarian trypanosomes. In: SOULSBY, E.S.L (Ed.). *Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology, immunoprophylaxis*. Boca Raton, FL: CRC Press, LLC, P. 125-145. 1987.

TEIXEIRA, M. G. M.; PEREIRA, J. B.; PERALTA, J. M. Avaliação de testes, *Trypanosoma cruzi* infection. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 101, n. 3, p. 540-543, jul. 1959.

TOLEDO MJO, BAHIA MT, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO OA, TIBAYRENC M, BARNABÉ C, TAFURI WL, LANA M. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for Mice infected with different *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes. *Antimicrob Agents Chemother*, Washington USA, 47, n. 1, p. 223-230, 2003.

TOLEDO MJO, LANA M, CARNEIRO CM, BAHIA M T, MACHADO-COELHO GLL, VELOSO V M, BARNABÉ C, TIBAYRENC M, TAFURI WL. **Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice**. *Exp Parasitol*, 100, 161-172. 2002

VACCA M, MERCADO M. Determinación de las características operativas de las pruebas serológicas con cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. (Tesis de Maestría en Epidemiología Clínica). Bogotá D.C.: Unidad de Epidemiología Clínica, Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana; 2006.

VATTUONE, N. H.; SZARFMAN, A.; GONZALES CAPPA, S. M. Antibody response and immunoglobulin levels in human with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infection. (Chagas' disease). **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 2, p. 45-47, feb. 1976.

VIANNA, G. **Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "moléstia de Carlos Chagas" (esquistotripanose humana ou tireoidite parasitária)**. Mem Inst Oswaldo Cruz; 3: 276-294. 1911.

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações.. Disponível em:< www.imt.usp.br/portal/images/stories/Proto/aula4.pdf >Acesso 19, jan. 2011. 2009.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**16. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 7-12. 2000.

VOLLER A, DRAPER C, BIDWELL DE, BARTLETT A. **A microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Chagas disease**. *Lancet* i: 426-429, 1975.

WHO. Proposals for the nomenclature of salivaria trypanosomes and for the maintenance of reference collections. **Bull, Wrld. Hlth.Org.**, 56: 476-480 WHO Expert Committee.**Control of Chagas disease. Tech. Rep. Ser.** 905, 1–109, , 2002.

WINCKER P, BRITTO C, PEREIRA JB, ARDOSO MA, OELEMANN W, MOREL CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from charonic chagasic patients in a rural endemic area. **Am J Trop Med Hvg** . 51: 771-7. 1994b.

WINCKER P, TELLERIA J, BOSSENO MF, CARDOSO MA, MARQUES P. **PCR based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis**. *Parasitology* 114: 367-373, 1996.

WORLD BANK. **World Development Report 1993. Investingn Health**. Oxford University Press, New York, 329 pp. 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease: second report of the World Health Organization Expert Committee. **World Health Organization Technical Report Series**, Geneva, v. 905, p. 109, 2002.

YANG & ROTHMAN R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *Lancet* 4:337-348, 2004.

YASUDA, S.A.; LINDOSO, A.B.P. Chronic Chagas disease: from xenodiagnosis an hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev. Saúde Pub*; 37 (1); 107-15, Jun 2003.