

Revisão

Review

Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase

Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction

Ana Angélica Bulcão Portela-Lindoso e Maria Aparecida Shikanai-Yasuda

Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Doença de chagas, diagnóstico.
Trypanosoma cruzi. Xenodiagnóstico.
Reação em cadeia por polimerase.
Cultura de sangue.

Keywords

Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*.
Xenodiagnosis. Polymerase chain
reaction.

Resumo

Embora tenham ocorrido aprimoramentos no diagnóstico parasitológico da doença de Chagas crônica, a baixa sensibilidade dos exames indiretos é uma limitação para sua aplicação ao diagnóstico e controle pós-terapêutico. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem seu emprego restrito na rotina diagnóstica pela necessidade de infra-estrutura adequada, facilidade de contaminação e custo elevado. Paralelamente, a variabilidade de resultados pela PCR observados em diferentes regiões do Brasil suscita questões relativas à sua aplicação ao diagnóstico. Sua alta especificidade aponta para sua aplicação como método confirmatório no diagnóstico de pacientes com provas sorológicas duvidosas e como método auxiliar no controle pós-terapêutico da doença crônica em comparação às técnicas sorológicas e parasitológicas. O objetivo do trabalho foi discutir e comparar a aplicação dos métodos moleculares e parasitológicos indiretos no diagnóstico e controle pós-terapêutico da doença de Chagas crônica, com base na literatura publicada no período de 1954-2001.

Abstract

Although there has been an improvement in the diagnosis of chronic Chagas' disease, the low sensitivity of indirect parasitological tests is a drawback to its application in diagnosis and post-therapeutic control. Polymerase chain reaction (PCR) has limited use in routine diagnosis due to the need of specific laboratory facilities, common DNA cross-contamination, and high costs. At the same time, the high variability of PCR results found in different regions of Brazil raises some questions concerning its applicability for diagnosis. PCR's high specificity is indicative that it can be used as a confirmation method in inconclusive serology diagnosis as well as an auxiliary method in pos-therapeutic control of chronic Chagas' disease when comparing to serology and parasitological techniques. It is discussed here the applicability of molecular and indirect parasitological methods in the diagnosis and post-therapeutic control of chronic Chagas' disease based on the literature published from 1954 to 2001.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, ou tripanosomíase americana, constitui-se em uma das mais importantes endemias do Brasil e da América Latina, estimando-se que haja mais de 16-18 milhões de pessoas infectadas e 120 milhões de pessoas expostas ao risco de adquiri-la em nosso continente.⁴⁰ No Brasil, o Inquérito Sorológico Nacional realizado em 1975-1980 mostrou 4,2% de prevalência em áreas rurais, passando para 2,7% na população geral do Brasil, elevando-se para 3,1% com a inclusão de São Paulo.^{1,14}

Com a implementação de programas de eliminação do vetor, a situação epidemiológica da doença é de controle em vários países da América Latina. Atualmente Uruguai e Chile e 10 dos 12 estados endêmicos do Brasil são considerados livres da transmissão vetorial da doença.^{40,63,64,69} Este controle é demonstrado por indicadores entomológicos e pela redução para 0,14% da prevalência de crianças e adolescentes infectados no Brasil⁶⁴ no período de 1989 a 1997, além da redução da incidência em 96% na faixa etária 7-14 anos no período de 1983 a 1997.⁴⁰

Em função do controle vetorial com uso de inseticidas, a transmissão, embora ainda a principal, teve sua importância diminuída.⁵² Os grandes movimentos de migração da zona rural para a urbana ocorridos nas décadas de 70 e 80^{40,69} e as condições inadequadas de triagens sorológicas de doadores em bancos de sangue apontam a importância da transmissão por via transfusional,^{42,56} com prevalência de anticorpos

variável de 0,2% a 1,2% no País em 1994.^{42,43} A porcentagem de candidatos a doadores com anticorpos contra antígenos de *T. cruzi* era de 1% a 7% na América Latina e de 1% a 3,2% no Brasil.^{42,43} Na atualidade tem-se reconhecido um melhor controle da hemoterapia;^{43,56} a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, no seu relatório do ano 2000, mostra um perfil de doadores com prevalência de anticorpos para *T. cruzi* no Brasil de 0,6%, variando de 0,3% na região Sul a 1% na região do Centro-Oeste.³

A doença de Chagas, por sua evolução crônica com diferentes perfis de morbi-mortalidade nas formas cardíaca e digestiva, tem elevado impacto econômico devido a gastos decorrentes de internação, absenteísmo, licença saúde e óbitos precoces.⁶⁹

A forma crônica da doença caracteriza-se por baixo nível de parasitemia e alto nível de anticorpos. O diagnóstico laboratorial da doença nesta fase pode ser realizado por diversas técnicas, porém todas com limitações. Os exames parasitológicos indiretos consistem no enriquecimento da amostra de sangue, possibilitando a multiplicação do parasito existente; são exames com 100% de especificidade, mas não podem ser considerados como padrão por terem sensibilidade limitada nessa forma, decorrente da parasitemia baixa e transitória.

Objetivando discutir a aplicabilidade dos exames parasitológicos no diagnóstico da doença de Chagas crônica, realizou-se uma busca na Lilacs/OPAS e no Medline/ National Library of Medicine, das referên-

Tabela 1 - Positividade de exames de xenodiagnóstico "in vivo" realizados em pacientes com doença de Chagas crônica.

Ano	Autor	Pacientes N	Ninfas aplicadas N	Positividade %	Espécie de ninfa empregada	Exames Realizados N
1954	Pifano ⁵¹	80	15	49,0	<i>R. prolixus</i>	2
1969	Marsden et al ³⁸	65	5	55,0	<i>R. prolixus</i>	1
1974	Schenone et al ⁶¹	27	10-20	67,1	<i>T. infestans</i>	3
1978	Minter-Goedbloed et al ³⁹	16	5	69,0	<i>P. megistus</i>	1
1978	Barreto et al ⁷	32	30	87,5	<i>T. infestans</i> , <i>D. maximus</i>	1
1983	Barbosa et al ⁶	100	40	9,0	<i>T. infestans</i>	1
1983	Castro et al ¹⁸	303	40	69,3	<i>T. infestans</i> , <i>D. maximus</i>	3
1989	Borges-Perreira et al ⁸	206	40	49,0	<i>T. infestans</i>	3
1991	Coura et al ²⁵	158	40	57,7	<i>T. infestans</i>	3
1995	Santos et al ⁵⁷	57	40	21,1	<i>D. maximus</i>	1
1995	Santos et al ⁵⁷	57	40	28,1	<i>D. maximus</i>	1*
1995	Santos et al ⁵⁷	47	40	29,8	<i>D. maximus</i>	3
1995	Fernandes et al ²⁷	30	40	13,3	<i>T. infestans</i>	1
1996	Borges-Perreira et al ⁹	563	40	36,4	<i>T. infestans</i> , <i>P. megistus</i>	1
1996	Junqueira et al ³¹	101	40	35,6	<i>T. infestans</i> , <i>P. megistus</i>	1
1997	Moreira, Perlowagora-Szumlewicz ⁴⁴	264	40	26,3	<i>P. megistus</i> , <i>T. infestans</i> , <i>T. vitticeps</i> , <i>R. neglectus</i>	1
1998	Pineda & Luquetti ⁵¹	57	40	28,0	<i>D. maximus</i>	1
1998	Pineda & Luquetti ⁵¹	57	40	32,0	<i>D. maximus</i>	1*
1999	Santos et al ⁵⁸	36	40	19,5	<i>D. maximus</i>	1

*"in vitro".

cias de publicações editadas no período de 1954 a 2001 na América Latina, particularmente no Brasil.

XENODIAGNÓSTICO

O xenodiagnóstico é um dos exames parasitológicos aplicados à forma crônica, registrando-se positividade entre 9% a 87,5%.^{6-8,10,15,37,38} Têm sido realizados estudos comparativos com emprego de ninfas de espécies diferentes, visando encontrar a melhor espécie a ser aplicada ao exame.^{20,44,50}

Barreto et al⁷ (1978), comparando ninfas de *Dipetalogaster maximus* e *Triatoma infestans*, observaram 52,3% de triatomíneos infectados da espécie *D. maximus* e 31% de *T. infestans*. Borges-Pereira et al⁹ (1996), comparando *Panstrongylus megistus* e *T. infestans* aplicados ao xenodiagnóstico de pacientes chagásicos crônicos, mostraram que os primeiros foram mais sensíveis independentemente de sexo, idade e área de origem. No município de Virgem da Lapa, Minas Gerais, Moreira et al⁴⁴ (1997) encontraram 26,3% de positividade do exame após 392 aplicações com 20 ninfas de quatro espécies diferentes de triatomíneos (*Rhodnius neglectus*, *P. megistus*, *T. infestans*, *Triatoma vitticeps* - Tabela 1).

Cerisola et al²⁰ (1971), na Argentina, verificaram que o rendimento com *T. infestans* foi maior que com *R. prolixus* e *T. pallidipennis*, sugerindo que estes resultados decorriam do fato de *T. infestans* ser mais prevalente naquela área e de apresentar condições biológicas mais apropriadas no trato digestivo para reprodução de *T. cruzi*. Um número maior de ninfas aplicadas também gera mais positividade, sem interferência da hora da aplicação do exame.⁶¹

Outro fator importante, que pode aumentar a positividade do xenodiagnóstico, é sua repetição.

Aplicando 15 ninfas de *R. prolixus*, Pifano⁵¹ (1954), observou aumento de 20% no diagnóstico final comparativamente à hemocultura, com positividade de 31,2%. Castro et al¹⁸ (1983), empregando uma série de aplicações, registraram positividade em 69,3% dos pacientes, sendo 41,2% no primeiro exame, 19,5% no segundo e 8,6% no terceiro. Classificando os pacientes segundo o grau de parasitemia, esses autores observaram que a positividade em pacientes com baixa parasitemia elevou-se de 22,8% para 41,1%, no segundo exame, e para 54%, no terceiro exame.¹⁸ Com uma série de três xenodiagnósticos em pacientes crônicos, Coura et al²⁴ (1991) observaram 46,3% de positividade, aumentando para 53,2% no segundo exame e para 57,7% no terceiro (Tabela 1).

O emprego da técnica de xenodiagnóstico “in vivo” e “in vitro” tem mostrado resultados similares. Utilizando *D. maximus*, Santos et al⁵⁷ (1995) compararam xenodiagnóstico “in vivo” e “in vitro” e observaram 21,1% de positividade com o primeiro e 28,1% com o segundo, havendo aumento para 29,8% com o “in vivo” quando repetido mais duas vezes. Pineda & Luquetti⁵² (1998) registraram 28% de positividade com xenodiagnóstico “in vivo” e 32% com xenodiagnóstico “in vitro”. Reações alérgicas no braço do paciente devido à aplicação do teste, melhor aceitabilidade do paciente, facilidade na coleta e restrições em pacientes com lesão de pele e imunodeprimidos são indicações para o emprego do xenodiagnóstico “in vitro” (Tabela 1).

O emprego rotineiro dessa técnica fica restrito devido sua sensibilidade e limitações outras inerentes à técnica tais como: tempo prolongado para o resultado final de até 90 dias, necessidade de criação de triatomíneos em laboratório, perdas dos insetos durante o período de teste e rejeição do paciente à aplicação repetida do exame ao natural.

Tabela 2 - Positividade de exames de hemocultura em pacientes com doença de Chagas crônica.

Ano	Autor	Pacientes N	Volume de Sangue/ml	Hemocultura N	Positividade %
1954	Pifano et al ⁵¹	80	9	1	6,0
1966	Chiari e Brener ²³	35	15	1	25,7
1972	Albuquerque et al ²	38	9	3 *	97,4
1975	Chiari & Dias ²²	16	10	1	43,7
1975	Mourão & Mello ⁴⁷	20	10	1	30,0
1975	Mourão & Chiari ⁴⁶	15	9	3 *	86,6
1978	Minter-Goedbloed et al ³⁹	16	1	1	44,0
1983	Barbosa et al ^{6,**}	100	10	1	0,0
1983	Barbosa et al ^{6,**}	100	10	1	0,0
1983	Barbosa et al ^{6,**}	30	10	1	0,0
1989	Chiari et al ²³	40	30	1	55,0
1994	Luz et al ³⁵	52	30	3 *	94,0
1995	Fernandes et al ²⁷	30	30	1	53,3
1996	Mora ⁴¹	85	30	1	40,0
1996	Junqueira et al ³¹	101	30	1	25,7
1999	Gomes et al ²⁹	79	30	1	36,5

*Hemoculturas seriadas.

**O autor empregou técnicas diferentes em um mesmo trabalho.
NR = não registrado.

HEMOCULTURA

O cultivo do sangue ou hemocultura alcança, na forma crônica da doença, 0% a 94% de positividade.^{6,10,21,23,29,35} Registrou-se maior sensibilidade do método com as seguintes modificações: coleta de maior número de hemoculturas, aumento de volume de sangue para 30 ml, maior tempo de observação, emprego do meio Liver Infusion Tryptose (LIT) e menor tempo entre coleta e processamento da amostra.^{3,6,23,35,36,48} Dessa forma, Albuquerque et al² (1972) já observavam 97,4% de positividade com três hemoculturas com 9 ml de sangue para cada coleta em 38 pacientes com doença crônica (Tabela 2).

Chiari et al²³ (1989) mostraram que com alterações como aumento do volume de sangue coletado para 30 ml, retirada imediata do plasma e adição do sedimento ao meio LIT, com conservação a 4°C para posterior processamento, ocorre melhora significativa, com 55% de positividade, comparativamente a 27,5% do xenodiagnóstico. Luz et al³⁵ (1994) registraram sensibilidade de 94% com três exames destacando-se já no primeiro teste 79% de positividade e empregaram o método modificado com três hemoculturas de 30 ml de sangue e processamento imediato do exame, com o tempo máximo de 30 min.

Chiari & Brener²¹ (1966), obtiveram 31,4% de positividade em xenodiagnóstico e 25,7% em hemocultura de uma amostra de 35 pacientes chagásicos crônicos, chegando a 42,8% com a associação de ambos. Fernandes et al²⁷ (1995) mostraram superioridade da hemocultura com 53,3% de positividade contra 13,3% do xenodiagnóstico. Santos et al⁵⁸ (1999), comparando xenodiagnóstico realizado com 20 ml de sangue e 40 ninfas da espécie *Dipetalogaster* e hemocultura com 30 ml, observaram positividade similar com ambas as técnicas: 22,2% e 19,4% de positividade, respectivamente. A associação da hemocultura ao xenodiagnóstico, empregados repetidas vezes, elevam a sensibilidade dessas técnicas. Em estudo de campo, considerando as dificuldades inerentes aos trabalhos em zonas rurais com laboratórios improvisados, a hemocultura surgiu como uma alternativa para melhorar a positividade dos métodos parasitológicos indiretos, porém os dados são variáveis, segundo as condições empregadas.

XENODIAGNÓSTICO E HEMOCULTURA EM CO-INFEÇÃO COM HIV

Sensibilidade elevada das técnicas parasitológicas tem sido referida em pacientes co-infectados por cepas de *T. cruzi* e vírus da imunodeficiência humana (HIV), sem reativação da doença de Chagas, regis-

trando-se 81% de positividade ao xenodiagnóstico.⁶⁰ A comparação entre portadores de doença de Chagas crônica e pacientes com doença de Chagas co-infectados com o HIV realizada por Perez-Ramirez et al⁴⁹ (1999), em estudo não randomizado, mostrou positividade mais elevada nos pacientes co-infectados de 74% e de 37% em pacientes com doença de Chagas, não tendo os autores observado diferenças genotípicas nos parasitos isolados em ambos os grupos. Sartori,⁵⁹ empregando hemocultura e xenodiagnóstico em três momentos, registrou parasitemia total de 80,9% nos pacientes com co-infecção com o HIV em relação a 35,3% nos pacientes com doença de Chagas. Com o emprego do xenodiagnóstico “in vitro”, a autora analisou a frequência de ninfas positivas por exame e observou que uma positividade maior ou igual a 20% sugere maior possibilidade de reativação da doença de Chagas em pacientes co-infectados.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Recentemente, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem demonstrando elevada sensibilidade na detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras de pacientes com doença de Chagas.^{11,26,28,30,45,65} Infectando camundongos BALB/c com epimastigotas da cepa Tulahuén, Moser et al⁴⁵ 1989 observaram na PCR, com iniciadores de 188 pares de base (pb), limite de detecção de até 110 fentogramas (fg) sem hibridização e de até 1,1 fg mediante uso de hibridização. Com os mesmos iniciadores, Russomando et al⁵⁵ (1992) detectaram 55 fg de DNA de *T. cruzi* extraído de soro de macacos infectados.

Comparando dois pares de iniciadores capazes de amplificar uma seqüência de DNA genômico de 188 pb e do DNA do cinetoplasto de 330 pb, Kirchhoff et al³² (1996) demonstraram melhor sensibilidade dos iniciadores de 188 pb, ao analisar sangue de camundongos infectados com tripomastigotas da cepa Tulahuén, um a 380 dias após infecção.

Variações na sensibilidade da PCR analítica para *T. cruzi* são encontradas por diversos autores.^{4,5,45} Aplicando os dois pares de iniciadores acima, a sensibilidade alcançada na PCR analítica, empregando DNA de epimastigotas da cepa Y, foi de 5 fg, o que representa menos de um parasito com os dois pares de iniciadores³⁴ (Tabela 3).

A PCR tem sido utilizada como alternativa no diagnóstico da doença de Chagas. Os iniciadores de 188 pb e os de 330 pb vêm demonstrando sensibilidade de até 100% no diagnóstico da forma crônica^{5,12,28,31,55,66-68} (Tabela 4). Com o emprego de um ou-

tro par de iniciadores, que amplifica 692 pares de base do genoma, denominado BP1/BP2, observou-se 100% de sensibilidade, comparativamente aos métodos sorológicos, em sangue de crianças com doença de Chagas na Argentina⁶² (Tabela 4).

A aplicação da hibridização para detecção de DNA, amplificado por PCR no sangue de pacientes, é seguida de aumento de sensibilidade observada à leitura por gel de agarose. Estudos em determinadas regiões endêmicas detectaram em pacientes com reações sorológicas positivas para a doença sensibilidade de 96,5% a 100% na PCR associada à hibridização,^{5,16,62} conforme Tabela 4. No entanto, na Paraíba, Brito et al¹² (1995) observaram apenas 45% de positividade com o emprego concomitante da hibridização. Gomes et al²⁸ (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. Os mesmos autores,²⁹ em 1999, mostraram 83,5% de positividade na PCR, com iniciadores 330 pb em pacientes com doença de Chagas crônica comprovada com reações sorológicas convencionais. Outros autores, no entanto, encontraram em amostras de doadores de sangue, com os mesmos iniciadores, 4,5% de positividade, alcançando 25,7% com o “nested” PCR.⁵⁴

Esses dados sugerem diferenças regionais, uma das quais seria representada por parasitemia menor e transitória, na forma crônica da doença, conforme a área geográfica estudada. No nordeste, observou-se variabilidade de positividade de exames parasitológicos indiretos e PCR em duas áreas estudadas. No Piauí, em pacientes com doença de Chagas crônica comprovada sorologicamente, verificou-se positividade de 34% ao xenodiagnóstico, 25,7% à hemocultura e 59,5% à PCR.²⁵ No mesmo estudo, na Paraíba, os autores observaram positividade de 13% ao xenodiagnóstico e 44,6% à PCR; a hemocultura não foi realizada. Alguns fatores, que poderiam estar relacionados a tal variabilidade, não informados no trabalho, seriam o tempo de afastamento da área endêmica e a gravidade de formas clínicas. Outro fator residiria na diferença genética dos isolados. Em estudo realizado por Lindoso,³⁴ em 1998, mostrou-se amplificação por iniciadores de DNA de cinetoplasto e genômico em 100% dos parasitos isolados a partir de hemocultura e xenodiagnóstico de pacientes na forma crônica provenientes de várias regiões do Brasil.

CONCLUSÃO

Aprimoramento das técnicas de xenodiagnóstico e

Tabela 3 - Limite de detecção da reação da polimerase em cadeia aplicada a *T. cruzi* de cultura empregando diferentes iniciadores.

Ano	Autor	Produto Amplificado	Cepa	PCR	Hibridização
1989	Moser et al ⁴⁵	188 pb	Tulahuén, Sylvio, Corpus Christi	110 fg	1,1 fg
1989	Sturm et al ⁶⁵	122 pb	Cl	NR	6 fg
1992	Russomand et al ⁵⁵	188 pb	São Felipe, Berenice, Y, Tulahuén	55 fg	NR
1992	Diaz et al ²⁶	195 pb	Y	NR	15 fg
1994	Centurion-Lara et al ¹⁹	330 pb	Cl	15 fg	NR
1996	Kirchhoff et al ³²	188 pb	Tulahuén	220 fg	NR
1996	Kirchhoff et al ³²	330 pb	Tulahuén, Sylvio	660 fg	NR
1997	Silber et al ⁶²	692 pb	Miranda	10 fg	NR
1998	Gomes et al ²⁸	330 pb	Tulahuén	10 fg	0,1 fg
1998	Lindoso ³⁴	330 pb	Y	5 fg	NR
1998	Lindoso ³⁴	188 pb	Y	5 fg	NR

fg = fentograma.

Tabela 4 - Sensibilidade da reação da polimerase em cadeia em sangue de pacientes com doença de Chagas aguda e crônica.

Ano	Autor	Produto Amplificado	Casuística	Sangue Coletado	Sangue Extraído	Forma Clínica	PCR+Hibridização %	Hibridização %
1992	Russomando et al ⁵⁵	188 pb	5	NR	100 ml	Aguda	100,0%	NR
1992	Russomando et al ⁵⁵	188 pb	7	NR	100 ml	Crônica	100,0%	NR
1993	Ávila et al ⁵	330 pb	95	5 ml	500 ml	Crônica	100,0%	98%
1994	Wincker et al ⁶⁷	330 pb	86	10 ml	200 ml	Crônica	96,5%	NR
1994	Wincker et al ⁶⁶	330 pb	45	5 ml	100 ml	Crônica	93,0 %	NR
1995	Brito et al ¹²	330 pb	47	5 ml	200 ml	Crônica	45,0%	NR
1997	Wincker et al ⁶⁸	330 pb	113	5 ml	200 ml	Crônica	93,8%	NR
1996	Junqueira ³¹	330 pb	101	5 ml	200 ml	Crônica	59,4%	NR
1997	Silber et al ⁶²	692 pb	67	NR	200 ml	Crônica	95,3%	100%
1998	Gomes et al ²⁸	330 pb	12	15 ml	400 ml	Crônica	25,0%	83,5%
1998	Carrizo et al ¹⁶	220 pb	16	5 ml	300 ml	Crônica	100,0%	100%
1999	Gomes et al ²⁹	330 pb	79	15 ml	200 ml	Crônica	83,5%	NR
1999	Ribeiro dos Santos et al ⁵⁴	188 pb	52	NR	400 ml	Crônica	3,8%	NR
1999	Ribeiro dos Santos et al ⁵⁴	330 pb	88	NR	400 ml	Crônica	4,5%	NR
1999	Ribeiro dos Santos et al ⁵⁴	330 pb/ 120 pb Nested	105	NR	400 ml	Crônica	25,7%	NR

hemocultura contribuíram para aumentar a sensibilidade desses exames. Até o momento, são considerados como padrão no diagnóstico, particularmente quando as provas sorológicas são inconclusivas, em pacientes imunodeprimidos e no controle pós-terapêutico.

O xenodiagnóstico e a hemocultura têm grande valor quando positivos. Mesmo com os avanços, limitações importantes – como tempo prolongado para o resultado final dos exames e necessidade de grandes quantidades de sangue estendendo-se à manutenção de ninfas no caso do xenodiagnóstico – geram dificuldades na sua aplicação rotineira e em banco de sangue.

As técnicas de PCR e hibridização empregam reagentes e aparelhagem dispendiosa e exigem treinamento especializado, além dos cuidados em função da contaminação das amostras com emprego de controles normais de vários ambientes e em vários momentos da manipulação. O uso da técnica automatizada poderia minimizar esses problemas. Áreas isoladas para extração, manipulação de reagentes e análise de produtos amplificados são essenciais para obtenção de resultados confiáveis. Considerando que a hibridização acresce novos custos e usa material radioativo de difícil manipulação, seu uso é indicado quando a confirmação da especificidade ou o aumento da sensibilidade da PCR são fundamentais.

Uma das aplicações da PCR é o seu emprego em bancos de sangue quando os resultados sorológicos são inconclusivos. Deve-se ressaltar que a frequência de tais resultados chegou a ser, no início da década de 90, igual ou maior que os positivos, com sérias conseqüências econômicas para os hemocentros e psicossociais, para os portadores dessas alterações.¹⁷ Os estudos de PCR em sangue de pacientes com pro-

vas sorológicas inconclusivas para a doença de Chagas mostram elevada variabilidade, com 4,3% a 46,2% de resultados positivos.^{29,54}

A PCR apresenta-se como uma alternativa no controle pós-terapêutico pela sua maior sensibilidade frente às provas parasitológicas indiretas por essas terem baixa sensibilidade com resultados negativos e por vezes inconclusivos após tratamento.^{13,25,29} Infelizmente os registros publicados na maioria das vezes representam cortes transversais após a terapêutica, demonstrando maior sensibilidade da PCR em relação às provas parasitológicas.^{13,19,33} Considerando as dificuldades para o controle pós-terapêutico na forma crônica da doença com a persistência de anticorpos por longo período após o tratamento, é desejável verificar a contribuição de técnicas quantitativas ou semi-quantitativas na detecção de DNA do parasito,^{13,19,33} comparativamente às técnicas parasitológicas clássicas, em estudos evolutivos, para se estabelecer o seu papel no controle de eficácia do tratamento.

A análise de custo-efetividade, considerados gastos com material e equipamento, recursos humanos especializados, necessidade de infra-estrutura física adequada, e as características da reação (sensibilidade, especificidade, acessibilidade, risco de contaminação e tempo para liberação do resultado final) sugere as seguintes indicações para a PCR:

- Como prova confirmatória, em pacientes com provas sorológicas inconclusivas;
- No controle pós-terapêutico;
- Em estudos comparativos com novas técnicas sorológicas ou parasitológicas;
- Na detecção do nível de parasitemia em imunodeprimidos por técnica quantitativa visando intervenção terapêutica ou profilática precoce.

REFERÊNCIAS

1. Akhavan D. *Análise de custo-efetividade do programa de controle da doença de Chagas no Brasil*. Rio de Janeiro: PNUD/FNS; 1996.
2. Albuquerque RD, Fernandes LAR, Funayama GK, Filho FF, Siqueira AF. Hemoculturas seriadas no meio Warren em pacientes com reação de Guerreiro Machado positiva. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1972;14:1-5.
3. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária [on-line]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>.
4. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991;48:211-22.
5. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, de Paiva E, di Grave W, Morel CM, Simpon L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic Chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1993;31:2421-6.

6. Barbosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. *Rev Patol Trop* 1983;12:155-63.
7. Barreto AC, Marsden PD, Cuba CC, Alvarenga NJ. Estudo preliminar sobre o emprego de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Triatominae) na técnica do xenodiagnóstico em forma crônica da doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1978;20:183-9.
8. Borges-Pereira J, Willcox HPF, Marcondes CB, Coura JR. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989;22:39-44.
9. Borges-Pereira J, Junqueira ACV, Santos LC, Castro JAF, Araújo IB, Coura JR. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica: sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29:341-7.
10. 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; 1992. p. 153-64.
11. 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* 1993;88:1711-2.
12. Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR et al. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonreactive hybridization. *Exp Parasitol* 1995;81:462-71.
13. 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* 1995;110:241-7.
14. Camargo EP, Silva GR, Castilho EA, Silveira AC. Inquérito sorológico da prevalência de infecção chagásica no Brasil 1975/1980. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1984;26:192-204.
15. Camargo ME, Takeda GKF. Diagnóstico de laboratório. In: Brener Z, Andrade Z. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1979. p. 165-98.
16. Carriazo CS, Sembaj A, Aguerri AM, Requena JM, Alonso C, Bua J et al. Polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples chronic chagasic patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:183-6.
17. Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW et al. Chagas disease diagnosis: evolution of several test in blood bank screening. *Transfusion* 1993;33:830-4.
18. Castro N, Alves MT, Macedo VO. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1983;16:98-113.
19. Centurion-Lara A, Barrett L, Voorhis WCV. Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1994;170:1334-9.
20. Cerisola JA, Rohwedder RW, Prado CE. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíneos. *Bol Chil Parasitol* 1971;26:57-8.
21. Chiari E, Brener Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1966;8:134-8.
22. Chiari E, Dias JCP. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na Doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev Soc Med Trop São Paulo* 1975;9:1133-6.
23. Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989;22:19-23.
24. Coura JR, Abreu LL, Willcox HPF. 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* 1991;86:395-8.
25. 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. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29:197-205.
26. Diaz C, Nussenzweig V, Gonzales A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:616-23.
27. Fernandes AJ, Diotaiuti L, Azevedo BVM, Busek SU, Chiari E. Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condição de campo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995;28:123.
28. 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* 1998;88:28-33.
29. Gomes ML, Galvão LMC, Macedo AM, Pena SDJ. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:205-10.
30. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, Mccurley T. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:348-57.

31. Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90:129-32.
32. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 1996;34:1171-5.
33. Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira AR. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63:111-8.
34. Lindoso AABP. Reação da polimerase em cadeia na doença de Chagas crônica: Emprego de dois pares de iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36 em isolados de *Trypanosoma cruzi* de sangue de pacientes e em outros tripanosomatídeos, [Tese de mestrado] São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 1998.
35. Luz ZMP, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994;27:134-8.
36. Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Supl 1:295-8.
37. Maekelt GA. A modified procedure of xenodiagnosis for Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1964;13:11-5.
38. Marsden PD, Mott KE, Prata A. The prevalence of *Trypanosoma cruzi* parasitemia in 8 families in an endemic area. *Gaz Med Bahia* 1969;69:65-9.
39. Minter-Goedbloed E, Minter DM, Marshall TFC. Quantitative comparison between xenodiagnosis and hemoculture in the detection of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in experimental and natural chronic infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:217-25.
40. Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Supl 1:401-4.
41. Mora MXC. Avaliação de uma técnica modificada de hemocultura para *T. cruzi*, na forma crônica da doença de Chagas em uma área endêmica. *Rev Soc Med Trop São Paulo* 1996;29:515-6.
42. Moraes-Souza H, Wanderley DNV, Brener S, Nascimento RD, Antunes CMF, Dias JCP. Hemoterapia e doença de Chagas transfusional no Brasil. *Bol Oficina Sanit Panam* 1994;116:406-18.
43. Moraes-Souza H. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94 Supl 1:419-23.
44. Moreira CJC, Perlowagora-Szumlewicz A. Attempts to improve xenodiagnosis: comparative test of sensitivity using *Rhodnius neglectus*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma vitticeps*, *Triatoma infestans* in endemic areas of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92 Supl 1:91-6.
45. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989;27:1477-82.
46. Mourão OG, Chiari E. Comprovação parasitológica na fase crônica da doença de Chagas por hemoculturas seriadas em meio LIT. *Rev Soc Med Trop São Paulo* 1975;9:215-9.
47. Mourão OG, Mello OC. Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Med Trop São Paulo* 1975;9:183-8.
48. Neal RA, Miles A. The sensitivity of culture methods to detect experimental infections of *Trypanosoma cruzi* and comparison with xenodiagnosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1977;19:170-6.
49. Perez-Ramirez L, Barnabe C, Sartori AM, Ferreira MS, Tolizano JE, Nunes EV et al. Clinical analysis and parasite diversity in human immunodeficiency virus/Chagas' disease coinfections in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:198-206.
50. Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJC. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of host with Chagas disease. The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev Saúde Pública* 1990;24:165-77.
51. Pifano CF. El diagnostico parasitologico de la enfermedad de Chagas cronica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnostico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Arch Venez Patol Parasitol Med* 1954;21:20-55.
52. Pineda JP, Luquetti A. Comparação entre o xenodiagnóstico clássico e artificial na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31:473-80.
53. Pinto Dias JC. Epidemiologia in *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 48-74.
54. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Sabino EC, Chamone DF, Sáez-Alquézer A. An improved, PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:689-94.
55. Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. Polimerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1992;302:864-8.

56. Saéz-Alquézar A, Otani MM, Sabino EC, Ribeiro dos Santos G, Salles N, Chamone DF. Evaluation of the performance of Brazilian blood banks in testing for Chagas disease. *Vox Sang* 1998;74:228-31.
57. Santos AH, Silva IG, Rassi A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e artificial, em chagásicos crônicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995;28:367-73.
58. Santos MCA, Slegers CA, Silveira CA, Castro C, Santiago W. Estudos comparativos entre xenodiagnóstico artificial e hemocultura para doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32 Supl 2;81.
59. Sartori AM. Parasitemia por *Trypanosoma cruzi* em pacientes com doença de Chagas crônica co-infectados por vírus da imunodeficiência humana (HIV) [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2001.
60. Sartori AMC, Shikanai-Yasuda MA, Amato Neto V, Lopes MH. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas disease, with reactivation of Chagas disease causing cardiac disease in three patients. *Clin Infect Dis* 1998;26:177-9.
61. Schenone H, Alfaro E, Rojas A. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. *Bol Chile Parasitol* 1974;29:24-6.
62. Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol* 1997;85:225-32.
63. Silveira AC, Vinhaes MC. Doença de Chagas: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31 Supl 2;15-60.
64. Silveira AC, Vinhaes MC. Elimination of vector-borne transmission on Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 Supl 1;405-11.
65. Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells amplification of kinetoplast minicircle DNA sequence: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989;33:205-14.
66. Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Breniere SF. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area. *FEMS microbiol* 1994;124:419-24.
67. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a polymerase simplified chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:771-7.
68. Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N et al. PCR-based diagnosis for Chagas disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* 1996;114(Pt 4):367-73.
69. World Health Organization. Chagas disease, Brazil. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75(19):153-5.