

Pacientes com sorologia para doença de chagas *versus* exames moleculares em hospital quaternário do noroeste paulista

Patients with positive serology for chagas disease versus molecular exams in a quaternary northwest hospital

Adriana Antônia da Cruz Furini

Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP. E-mail: adriana.cruz.furini@gmail.com

Bárbara Ellen Magalhães Batista

Hospital de Base de São José do Rio Preto. E-mail: barbara.bellen@gmail.com

Thessa Beatriz de Oliveira Cogo

Biomédica. E-mail: thessabeatriz7@gmail.com

Maria Gabriela De Lucca Oliveira

Laboratório Central do Hospital de Base, São José do Rio Preto. E-mail: mgabriela.lucca@hospitaldebase.com.br

Carlos Eugênio Cavasini

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. E-mail: cecavasini@famerp.br

Ricardo Luiz Dantas Machado

Universidade Federal Fluminense. E-mail: rivemachado@yahoo.com.br

Moacir Fernandes de Godoy

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. E-mail: mf60204@gmail.com

Resumo: A Doença de Chagas (DC) é uma parasitose endêmica nos países da América do Sul, causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Apesar dos avanços diagnósticos e da utilização de técnicas moleculares e sorológicas, muitos casos de resultados falsos negativos são reportados. O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil clínico, epidemiológico de 21 pacientes com exames moleculares e sorológicos para DC. Com caráter retrospectivo, realizado em prontuários do Hospital de Base de São José do Rio Preto de pacientes com teste para de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) qualitativo, realizados no período de janeiro de 2010 a abril de 2015. Doze pacientes possuíam exames confirmatórios para a DC enquanto dez pacientes apresentaram sorologia e PCR negativas e eram assintomáticos para DC. Os parâmetros de comparação obtidos para os exames foram de: sensibilidade de 50%, especificidade de 47,37%, acurácia de 52,38%, valor preditivo positivo de 10%, valor preditivo negativo de 90,91%. A padronização de técnicas com alta sensibilidade e especificidade, sem custos excessivos poderá constituir-se em importante ferramenta para o diagnóstico confirmatório da DC, em especial em casos assintomáticos.

Palavras-chave: Tripanossomíase americana; Reação da polimerase em Cadeia; Exames imunológicos

Abstract: Chagas' disease (DC) is an endemic parasitic disease in the South American countries caused by *Trypanosoma cruzi*. Despite the diagnostic advances and the use of molecular and serological techniques, many cases of false negative results are reported. The present study aimed to analyze the clinical and epidemiological profile of 21 patients with molecular and serological tests for CD. A retrospective study was carried out in the medical records of the São José do Rio Preto Base Hospital of patients with a qualitative Polymerase Chain Reaction (PCR) test performed from January 2010 to April 2015. Twelve patients had confirmatory tests for DC whereas ten patients had negative serology and PCR and were asymptomatic for DC. The comparison parameters obtained for the tests were: sensitivity of 50%, specificity of 47.37%, accuracy of 52.38%, positive predictive value of 10%, negative predictive value of 90.91%. The standardization of techniques with high sensitivity and specificity, without excessive costs may constitute an important tool for the confirmatory diagnosis of CD, especially in asymptomatic cases.

Key words: American trypanosomiasis; Polymerase Chain Reaction; Immunological examinations

Recebido em: 26/01/2018

Aprovado em: 07/01/2019



INTRODUÇÃO

Carlos Chagas descreveu em 1909 uma nova doença, a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC), tendo como agente etiológico um protozoário flagelado nomeado de *Trypanossoma cruzi* (ALMEIDA et al., 2007). Essa endemia afeta de 7 a 8 milhões de pessoas na América Latina e acarreta em 10 mil mortes/ano (MOTA et al., 2014; CEVALLOS et al., 2014; OMS, 2020). No Brasil estima-se mais de 1 milhão de pessoas infectadas (ALMEIDA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2007). A incidência por via oral é crescente no Brasil, em geral por alimentos como o açaí e o caldo de cana contaminados com vetores infectados por *T. cruzi*, caracterizando a via a mais frequente entre os 2000 a 2013, com 1081 casos versus 100 casos vetoriais (DIAS et al., 2015).

A DC possui três fases características, a aguda, a crônica e a indeterminada. Na fase aguda a alta parasitemia é frequente, com detecção do protozoário em sangue periférico (DIEZ, et al., 2007; QVARNSTROM, et al., 2012) e sorologia reagente para anticorpos anti-*T. cruzi* da classe imunoglobulina M, o IgM, e posteriormente da classe imunoglobulina G, o IgG (ANDRADE, et al., 2014). Na fase crônica, existem raros parasitos circulantes e a sorologia em geral é reagente para anticorpos da classe IgG. Na crônica indeterminada, o paciente também apresenta sorologia positiva para anticorpos da classe IgG, porém sem sintomatologia associada como: eletrocardiograma (ECG) normais, raio-x de tórax normais e sem sintomas cardíacos ou gastro-intestinais (DIAS et al., 2015).

Quanto ao diagnóstico, preconizado pelo Consenso Brasileiro (2020) é estabelecido à realização de técnicas sorológicas como imunofluorescência, enzima imunoensaio, quimioluminescência, hemaglutinação indireta (OLIVEIRA, et al., 2010; MARCHI, et al., 2007). Contudo pode haver discrepância entre os resultados, reações falso-positivas com *Leishmania* (MARCHI, et al., 2007; DIAS et al., 2016; CAMPOS, et al., 2009) que carecem de confirmação. O teste molecular qualitativo tem sido amplamente utilizado como ferramenta auxiliar para o diagnóstico, monitorização da progressão da doença e avaliação terapêutica.

As estratégias com uso das reações da polimerase em cadeia (PCR) têm sido desenvolvidas com o objetivo de analisar amostras clínicas infectadas pelo *T. cruzi*, no entanto, técnicas qualitativas apresentam resultados falsos, (QVARNSTROM et al., 2012; DIAS et al., 2015), até mesmo em amostras sucessivas do mesmo paciente. Por outro lado, a PCR quantitativa apresenta maior sensibilidade, devido o uso de múltiplos alvos para o genoma do parasita, menos riscos de amplificar contaminantes, além dos fatores intrínsecos de cada metodologia, entretanto de alto custo e difícil padronização. As dificuldades na PCR qualitativa e quantitativa devem-se à variabilidade genética do *T. cruzi* (QVARNSTROM, et al., 2012).

Resultados contraditórios e inconclusivos em testes sorológicos e moleculares foram detectadas em testes reproduzidos nas mesmas amostras (DIAS et al., 2015). Resultados sorodiscordantes, titulações indeterminadas e soronegativas com achados clínicos da doença foram reportados em estudos anteriores (BATISTA et al., 2009). Desta forma, aspectos relacionados a diagnóstico laboratorial podem contribuir para determinação de metodologias padrão.

O objetivo desse trabalho foi avaliar parâmetros para os testes de sorologia anti *T. cruzi* e reação da polimerase em cadeia em pacientes com Doença de Chagas em um Hospital quaternário do Noroeste paulista.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo é do tipo retrospectivo, com análise de 21 pacientes com sorologia reagente ou não reagente e realizaram exames de PCR para Doença de Chagas. Os dados referem-se a prontuários de pacientes do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Esta unidade hospitalar é de grande porte e referência nacional. A coleta de dados foi realizada por prontuário eletrônico e formato papel, de pacientes confirmados com a DC. Esse estudo foi aprovado pelo CEP/FAMERP com o número 43.868.115.2.0000.5415. Foram incluídos no estudo todos os pacientes que realizaram sorologia para DC de 2010 a 2015 e que tinham realizado exame de PCR. Os pacientes que não possuíam exame molecular foram excluídos da análise.

Os testes sorológicos realizados pelo hospital foram pelo método de imunofluorescência indireta para pesquisa de IgG, com um cut off de 1,00. Os testes de PCR foram encaminhados para o Instituto Adolfo Lutz. A técnica de PCR foi a convencional de amplificação do DNA de *Trypanossoma cruzi*, com os oligonucleotídeos TCZ1 e TCZ2 (QVARNSTROM et al., 2012).

O questionário aplicado foi elaborado por membros da equipe multidisciplinar de saúde do Hospital de Base, com auxílio de cardiologistas, hematologistas, farmacêuticos e biomédicos. Os critérios avaliados foram: idade, sexo, moradia, naturalidade, tipo de moradia (alvenaria, madeira, outros), cidade em que reside, ocupação profissional, nível de escolaridade, provável época da infecção, transfusão sanguínea, fase da doença, reativação da doença, PCR na reativação, hemodiálise, quimioterapia, sorologias positivas, sintomas da DC, transplante cardíaco, sorologia IgG, PCR qualitativa.

Os resultados discordantes de PCR para pacientes que tinham mais de um exame não foram considerados para os parâmetros avaliados. Os índices de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram calculados por meio do programa Bioestat versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 13.141 pacientes atendidos no Hospital de Base (2000 -2014) que realizaram exames sorológicos para pesquisa de IgG anti-*T. cruzi*, um quantitativo de 1.550 pacientes obtiveram resultados reagentes. Dos 1150, apenas 21 possuíam resultados de sorologia e exame molecular de PCR para doença de Chagas, no quantitativo de 21 pacientes prontuários analisados. Nove pacientes eram do sexo masculino (42,86%) e doze mulheres (57,14%).

Os resultados de vinte e um pacientes que tinham sorologia para IgG anti-*T. cruzi* e que realizaram teste de PCR qualitativo são pormenorizados na Tabela 1. Quanto aos critérios laboratoriais avaliados, dois (9,52%) pacientes foram reagentes na PCR, 9 (42,85%) apenas na sorologia e 10 (47,61%) foram negativos para a sorologia e PCR. Os parâmetros de comparação (PCR como padrão ouro) obtidos

para os pacientes que não obtiveram discordância na PCR são: sensibilidade de 50%, especificidade de 52,63 %, acurácia de 52,38%, valor preditivo positivo de 10%, valor preditivo negativo de 90,91%.

Para um dos pacientes, resultados moleculares repetidos foram discordantes, sendo um reagente e quatro não reagentes.

Tabela 1. Comparativo dos resultados de exames de 21 pacientes que realizaram teste genotípico e exame sorológico para detecção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* no Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Imunológico (IgG) - Imunofluorescência Indireta	PCR Qualitativa		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	1	9	10
Negativos	1	10	11
Total	2	19	21

Dos 21 pacientes, apenas onze (52,38%) tinham DC confirmada. Os outros dez pacientes tinham sorologia e PCR negativas sendo soronegativos para DC. Os casos positivos apresentam-se na fase crônica e um (1/11) dos casos é de reativação. Três pacientes tem insuficiência cardíaca congestiva (27,27%), um (9,09%) tinha insuficiência cardíaca congestiva associada a distúrbios gastro-intestinal, quatro (36,36%) distúrbios gastro-intestinais e três (27,27%) eram assintomáticos para a DC, sendo o número de 21 pacientes podendo levar a um viés ao estudo.

A Hemaglutinação Indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), *EnzymeLinked-Immunesorbent assay* (ELISA) e Quimioluminescência são os testes sorológicos mais utilizados para a DC. O Consenso Nacional brasileiro de diagnóstico para Chagas, preconiza a associação de dois métodos (DIAS et al., 2016). Entretanto para os 21 pacientes analisados constava apenas a informação de resultados de imunofluorescência indireta, que pode acarretar em resultados falso negativos. Outros estudos (ALMEIDA, et al., 2007; IZQUIERDO, et al., 2013; MARCHI, AMATO NETO, ALMEIDA, 2007; SOUZA, AMATO NETO, 2012), mostram que a quimioluminescência-ELISA (CL-ELISA) é mais sensível que outros métodos sorológicos, com valores de 100% e acurácia de 99,3%. O CL-ELISA utiliza tripomastigotas purificados (tGPI-muc), que aumenta a sensibilidade e especificidade em relação a imunofluorescência indireta. Os parâmetros obtidos nesse estudo são inferiores, avaliado pelo valor preditivo positivo de apenas 10% (IZQUIERDO, et al., 2013).

O teste molecular qualitativo tem sido amplamente utilizado como ferramenta confirmatória para o diagnóstico, ou para casos sintomáticos com sorologia negativa. As estratégias de PCR em amostras clínicas infectadas pelo *T. cruzi*, tem sido realizada em geral por metodologias 'in house' e muitos resultados também são contraditórios em técnicas qualitativas (DIAS et al., 2015; QVARNSTROM, et al., 2012). A discordância entre os resultados oriundos de repetidos exames de PCR reportados para um paciente desse estudo podem ser devido à extração do DNA, amplificação do DNA, o método da PCR e oligonucleotídeos utilizados. Por outro lado, o uso do método molecular quantitativo poderia

apresentar melhores resultados, devido sua alta sensibilidade 95% podendo ser utilizado como teste confirmatório de resultados sorológicos e de PCR qualitativas discordantes (COURA, 2003; FERREIRA, et al., 1997; PIRON, et al., 2007).

Na Fiocruz do Rio de Janeiro, a avaliação de 40 pacientes com DC crônica, demonstrou que a PCR quantitativa em tempo real em amostras de soro apresentou alta sensibilidade com 97,5% e especificidade de 100% (MELO, et al., 2015; MOREIRA, et al., 2013). Entretanto, a dificuldade de padronização da técnica ocorre devido fatores relacionados ao parasita, por ele possuir diferentes populações classificadas como Discrete Typing Units (DTUs), classificadas de TcI a TcVI, sendo elas distribuídas diferentemente nas regiões endêmicas (DUFFY, et al., 2013), e a fase da doença. Schijman e colaboradores (2011) reportaram que sensibilidade do teste molecular para pacientes imunossuprimidos por transplante cardíaco era equivalente a 100%, para assintomáticos de 56,5%, e na fase crônica de 57,1%. O ideal seria uma técnica capaz de detectar todos os genomas do parasita, com alta sensibilidade e especificada para qualquer fase da doença.

Dado de estudo multicêntrico realizado em 2011, com avaliação de 26 laboratórios e técnicas de PCR, mostraram grande variabilidade nos resultados de sensibilidade e especificidade, dependentes de: quantidade de amostra, condições de preservação, técnicas de extração do DNA, entre outros (DIAS et al., 2016), com maior sensibilidade da PCR-Sat-DNA (tempo real), do tipo quantitativa. Qvarnstrom et al² descreveram que a PCR-kDNA TaqMan (tempo real) apresenta maior sensibilidade comparada a PCR-TCZ e PCR-rRNA. Nossos dados moleculares foram avaliados pela PCR-TCZ, que pode amplificar DNA de outra espécie de *Trypanosoma*, como *T. rangeli* (QVARNSTROM, et al., 2012), e assim ser um dos fatores de resultados falso positivos como observados para um paciente que realizou cinco exames de PCRs com somente um resultado reagente.

De 30-40% dos pacientes podem desenvolver manifestações clínicas na fase crônica com manifestações cardíacas, intestinais e cerebrais, como a miocardiopatia, o megaesôfago e o megacólon (GOBBI, et al., 2014; PINTO, et al., 2013; QVARNSTROM, et al., 2012), sintomas avaliados em 8 pacientes desse estudo. Quatro pacientes assintomáticos para DC, com sorologia reagente podem estar na fase crônica indeterminada, que pode durar entre 10 a 20 anos e demonstra equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014; DIEZ, et al., 2007; QVARNSTROM, et al., 2012). Estudos apontam que pacientes com insuficiência cardíaca com sorologia positiva para DC tem maior risco de óbito se comparado a pacientes que apresentam outras complicações provenientes da DC, entretanto ainda há poucas pesquisas relacionando a DC com alterações cardíacas, digestivas ou neurológicas (LINETZKY, et al., 2012; NUNES, 2013).

A reativação observada para uma paciente pode ser decorrente de imunossupressão como: HIV/AIDS, neoplasias hematológicas, terapêuticas quimioterápicas, transplantes de órgãos (ALMEIDA, et al., 2009; DIEZ, et al., 2007; FERREIRA, et al., 1997; GÓMEZ, MANTILLA,

RODRIGUEZ-MORALES, 2014; GURGEL, et al., 2014; a única condição que a paciente apresentava era que possa justificar tal fato era o transplante cardíaco.

CONCLUSÕES

Os parâmetros de comparação da reação da polimerase em cadeia em relação a sorologia *anti-T. cruzi* foram considerados baixos, com sensibilidade de 50%, especificidade de 52,63 %, acurácia de 52,38%, valor preditivo positivo de 10%, valor preditivo negativo de 90,91%.

A utilização de apenas uma técnica de diagnóstico sorológico pode acarretar em resultados falsos, em especial falso negativos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, B .C. S.; RESENDE, P. I.; PINTO, L. L. N.; CARMO, A. A. L.; ROCHA, M. O. C.; RIBEIRO, A. L. P. Preditores para desenvolvimento de arritmia ventricular maligna na cardiopatia chagásica: protocolo de estudo caso-controle. Revista de Medicina de Minas Gerais, v.3, n.23, p.12-17, 2003.

ALMEIDA, E. A.; BARBOSA NETO, R. M.; GUARIENTO, M. E.; WANDERLEY, J. S.; SOUZA, M. L. Apresentação clínica da doença de Chagas crônica em indivíduos idosos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.3, p.311-315, 2007.

ALMEIDA, E. A.; SILVA, E. L.; GUARIENTO, M. E.; DE SOUZA, M. L.; AOKI, F. H.; PEDRO, R. J. Evolução fatal da co-infecção doença de Chagas/AIDS: dificuldades diagnósticas entre a reagudização da miocardite e a miocardiopatia chagásica crônica. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.42, n.2, p.199-202, 2009.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: New global challenges for an old neglected disease. PLOS Neglected Tropical Diseases ,v 8, n.7, p.3010 2014.

ANDREOLLO, N. A.; MALAFAIA, O. Os 100 anos da Doença de Chagas no Brasil.ABCD Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva, v.4, n.22, p.189- 191, 2009.

BRENIÈRE, S. F.; YAKSIC, N.; TELLERIA, J.; BOSSENO, M. F.; NOIREAU, F.; WINCKER, P.; SANCHEZ, D. Immune response to *Trypanosomacruzi* shed acute phase antigen in children from an endemic area for Chagas disease in Bolivia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 92, n.4, p.503-507, 1997.

CAMPOS, Y.; BRICEÑO L.; REINA, K.; MOSCA W. Serological diagnosis of Chagas disease: evaluation and characterisation of a low cost antigen with high sensitivity and specificity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 104, n. 6, p. 914-917, 2009.

QVARNSTROM, et al., 2012). Entretanto CEVALLOS, A. M.; HERNÁNDEZ, R. Chagas disease: Pregnancy and Congenital transmission. BioMedResearchInternational, v.2014, p.10, 2014.

COURA JR. Tripanosomose, doença de Chagas. Cienc. Cultura, v.55, n.1, 2003.

DIAS, J. C. P.; RAMOS, J. R.; NOVAES, A.; et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. Epidemiol Serv Saúde, v.25 n. esp. p.7-86, 2015.

DIEZ, M.; FAVALORO, L.; BERTELOTTI, A.; BURGOS, J.M.; VIGLIANO, C.; LASTRA, M.P.; et al. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chaga's disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation.American Journal of Transplantation, v.7, p.1633-1640, 2007.

DUFFY, T.; CURA, C. I.; RAMIREZ, J. C.; ABATE, T., CAYO, N. M.; PARRADO, R.; et al. Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Qualification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. PLOS Neglected Tropical Diseases, v.7, n.1, 2013.

FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; SILVESTRE, M. T.; BORGES, A. S.; ARAÚJO, F. R. F. N.; ROCHA, A. Reactivation of Chagas disease in patients with AIDS: Report of three new cases and review of the literature. Clinical Infectious Diseases, v.25, n.6, p.1397-400, 1197.

GOBBI, F.; ANGHEBEN, A.; ANSEMI, M.; POSTIGLIONE,C.;REPETTO, E.; BUONFRATE, D., et al. Profile of *Trypanosomacruzi* infection in a tropical medicine reference center, northern italy. PLOS Neglected Tropical Diseases. v. 8, n.12, p.3361, 2014.

GURGEL, C.B.F.M.; ROSA, C.A.P.; BASSANEZE, B.; RUSSI, M.T.Perfil trabalhista de pacientes chagásicos na região de Campinas (SP). Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, v. 12, n.4, p.272-277, 2014.

GÓMEZ, C. F. P.; MANTILLA, H.J.C.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Fatal Chagas disease among solid-organ transplant recipients in Colombia. Open Forum Infectious Disease, v.1, n.1. p.1-4, 2014.

IZQUIERDO, L.; MARQUES, A.F.; GÁLLEGO, M.; SANZ, S.; TEBAR, S.; RIERA, C.; QUINTÓ, L.; ALDASORO, E.; ALMEIDA, I.; GASCON, J. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nondemic setting.Memórias Instituto Oswaldo Cruz, v.108, n.7, p.928-931, 2013.

LINETZKY, B.; KONFINO, J.; CASTELLANA, N.; DE MAIO, F.; BAHIT, M. C.; ORLANDINI, A., et al. Risk of cardiovascular events associated with positive serology for Chagas: a systematic review. Int J Epidemiol, v. 4195, p.1356-66, 2012.

- MARCHI, C. R.; AMATO NETO, V., ALMEIDA, I. C.. Comportamento do método quimioluminescente-ELISA em relação a resultados considerados discordantes por meio de três técnicas convencionais para diagnóstico da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.40, n.1, p.68-70, 2007
- MEDEI, E. H.; NASCIMENTO, J. H. M.; PEDROSA, R. C.; CARVALHO, A. C. C. Envolvimento de Auto-Anticorpos na fisiopatologia da doença de Chagas. *ArqBras Cardiologia*, v.4, n. 91 p, 281-286, 2008.
- MELO, M. F.; MOREIRA, O. C.; TENÓRIO, P.; LORENA, V.; LORENA-REZENDE, I.; OLIVEIRA JÚNIOR, W.; et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *ParasitVectors*, v.8, p.154, 2015.
- MONTEIRO, W. M.; BARBOSA, M. G. V.; TOLEDO, M. J. O.; FÉ, F. A., FÉ, N. F. Série de casos agudos de doença de Chagas atendidos num serviço terciário de Manaus, Estado do Amazonas, de 1980 a 2006. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.43, n.2, p.207-210, 2010.
- MOREIRA, O. C.; RAMÍREZ, J. D.; VELÁSQUEZ, E.; MELO, M. F. A. D.; FERREIRA, C. L.; GUHL, F.; et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosomacruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropical*, v.125, p. 23-31, 2013.
- MOTA, T.; VITTA, A. C. R.; LORENZO-FIGUEIRAS, N. A.; BAREZANI, C. P.; ZANI, C. L.; LAZZARI, C. R.; et al. A multi-species bait for Chagas disease vectors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.2, n.8, p.2677, 2014.
- NUNES, D. F.; GUEDES, P. M.; ANDRADE, C. DE M.; CÂMARA, A. C.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. Troponin T autoantibodies correlate with chronic cardiomyopathy in human Chagas disease. *Trop Med Int Health*, v. 18, n.10, p.1180-92, 2013.
- OLIVEIRA, L. R.; ASSIS, L. L. T.; MALTOS, A. L., CALIL, M. C. F. R; MORAES-SOUZA, H. Reativação da doença de Chagas com envolvimento do sistema nervoso central durante tratamento de linfoma não Hodgkin. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 32, n.3, p.269-272, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas Disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 31 de outubro de 2020.
- PINTO, A.Y.N.; VALENTE, V.C.; COURA, J.R.; VALENTE, S.A.S.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SANTOS, L.C., FERREIRA, A.; MACEDO, R. Clinical follow-up of responses to treatment with Benznidazol in Amazon: A cohort study of acute Chagas disease. *PLOS One*. 2013, v.8, n.5.
- PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJAMA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M., et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, v.103, p.195-200, 2007.
- QVARNSTROM, Y.; SCHIJMAN, A.G.; VERON, V.; AZNAR, C.; STEURER, F.; SILVA, A.J. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v.6, n.7, p.1689, 2012.
- SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A. M. M.; et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. *PloS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, p.931, 2011.
- Secretaria em Vigilância e Saúde do Ministério da Saúde: Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.3, p.1- 29, 2005.
- SOUZA, R. M.; AMATO NETO, V. Discrepancies and consequences of indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and ELISA tests for the diagnosis of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop*, v.54, n. 3, p.141-3, 2012.