

DINAMICA DE CRECIMIENTO DE CUATRO CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN TRES MEDIOS DE CULTIVO

Reyes Alirio Torres*
Yoleida Caldera**
Deisy Rubio***

RESUMEN

Con la finalidad de estandarizar en nuestro laboratorio un método parasitológico fácil, económico y práctico para el diagnóstico de la infección del huésped vertebrado por *Trypanosoma cruzi*, se estudió la dinámica de crecimiento de cuatro cepas del parásito (Zuliana, Y, Elpidio Padrón e IgF) en los medios de cultivo Warren, Caldo Cerebro Corazón y Difásico (N.,N.N. modificado). Ratones blancos (*Mus musculus*) de 21 días de edad fueron experimentalmente infectados con las cepas de *T. cruzi* en estudio. Tubos que contenían los diferentes medios de cultivo fueron sembrados con sangre obtenida por punción cardiaca, cuando los ratones habían alcanzado 30 días de infección. Los medios sembrados fueron incubados a 25°C y examinados a los 7, 15, 21, 30 y 45 días. A los 28 días de incubación se practicaron

* Profesor Asociado de la Cátedra de Parasitología.

** Estudiantes de la Escuela de Bioanálisis.

*** Facultad de Medicina - Universidad del Zulia. Maracaibo - Venezuela.

repiques de medio para medio y los exámenes también se efectuaron a los 7, 15, 21, 30 y 45 días. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio Difásico (N.N.N. modificado) tanto para el aislamiento primario como para el mantenimiento de las cepas. El crecimiento fue mayor cuando los medios fueron sembrados a partir de sangre de ratones infectados, mientras que fue escaso en los repiques de medio para medio. En todos los medios de cultivo, las cepas Elpidio Padrón y zuliana mostraron altos porcentajes de formas amastigotas. El medio Difásico es de gran valor para el diagnóstico parasitológico de la infección del huésped vertebrado por *Trypanosoma cruzi*. Se deben realizar estudios con este medio, en infecciones crónicas, inclusive humanas. Es recomendable examinar los medios de cultivo tanto al fresco como por coloración, para evitar el reporte de falsos resultados negativos cuando en las cepas predominen las formas amastigotas.

ABSTRACT

In order to standardize an easy, economic and practical parasitological method for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infections in vertebrate hosts in our laboratory, the growth dynamics of four parasite strains (Zuliana, Y, Elpidio Padrón and IgF) in the Warren, Brain Heart Infusion and biphasic (modified N.N.N. medium) culture media was studied. 21 day-old mice were experimentally infected with the four *T. cruzi* strains under study. Tubes containing the different culture media were inoculated with blood obtained by heart puncture when mice had a 30-day infection. Inoculated media were incubated at 25°C and then examined at the days 7, 15, 21, 30 and 45. When media had completed a 28-day incubation, subcultures from media to media were made and examinations were too practiced at the days 7, 15, 21, 30 and 45. The best results were obtained with the biphasic medium (modified N.N.N. medium), not only for the primary isolation but for the strain maintenance. Growth was higher when media were seeded with blood from infected mice whereas it was low in media to media subcultures. Elpidio Padrón and Zuliana strains showed high percentages of amastigote forms in all of the culture media. Biphasic medium has a great value for the parasitological diagnosis of the vertebrate infection by *Trypanosoma cruzi*. This medium must be employed in studies of chronic infections, including human infections. Culture media would rather be examined not only by wet swabs but by coloration to avoid the report of false negative results when the strain under study shows predominantly amastigote forms.

INTRODUCCION

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado que produce en los vertebrados la enfermedad de Chagas.

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas durante la fase aguda es relativamente fácil mediante métodos directos tales como: examen al fresco, frotis, gota gruesa y biopsia de tejidos. Esto se debe a la abundante cantidad de parásitos que circulan en sangre durante esta fase.

Durante la fase crónica, el diagnóstico parasitológico es muy difícil debido a la baja parasitemia que presenta el huésped vertebrado, lo que descarta la posibilidad del diagnóstico por métodos directos; por lo que son necesarios los métodos indirectos que permitan la multiplicación del parásito, tales como: el xenodiagnóstico, la inoculación de animales de experimentación y el hemocultivo.

El xenodiagnóstico, introducido por Brumpt, 1914 (2), ha sido el método indirecto más empleado para el diagnóstico parasitológico de la infección chagásica crónica (12, 14). Consiste en investigar el parásito en el contenido intestinal de insectos vectores, varias semanas después de haber sido alimentados con sangre de pacientes con sospecha de la enfermedad. A pesar de ser el método más utilizado, tiene baja sensibilidad, los resultados se obtienen tardíamente, requiere de crianza de una buena colonia de triatomíneos y la persona a examinar debe exponerse a la picada de los insectos, lo que podría resultar peligroso en personas sensibles a la saliva inoculada con la picada.

La inoculación de animales de experimentación con sangre supuestamente infectada no ha dado buenos resultados, a pesar de que varios animales de laboratorio son sensibles a la infección por *T. cruzi* (5, 13).

El hemocultivo ha dado resultados variables, a pesar de que *T. cruzi* crece bien en diferentes medios de cultivo.

Albuquerque y cols. (1) del Instituto Riberão Preto en el Estado de São Paulo-Brasil practicaron hemocultivo, utilizando el medio de Warren a 38 pacientes con reacción de Guerreiro-Machado positiva y obtuvieron resultados positivos en 37 (97.4%).

Chiari y Brener (3), emplearon conjuntamente el xenodiagnóstico y el hemocultivo con medio líquido LIT para el diagnóstico de 35 pacientes, obteniendo 31.4% y 25.7% de positividad respectivamente.

Minter-Goeldbloed y cols. (7), estudiaron 29 casos, obteniendo 25 casos positivos con el xenodiagnóstico y 27 con el hemocultivo.

Mourao y Mello (8), diagnosticaron 9 casos (45%) al aplicar hemocultivo con medio LIT a 20 chagásicos crónicos.

Chiari y Dias (4), utilizando la técnica de Mourao y Mello comprobaron la infección en 7 (43.7%) de los 16 casos estudiados.

Neal y Miles (10), compararon los métodos de cultivo (medios de Warren, Bone y Parents, Agar sangre, Adler y LIT) con el xenodiagnóstico. Los medios de Warren y Bone y Parents fueron los más adecuados para el aislamiento primario; con Warren obtuvieron cultivos positivos inclusive con 10 a 20 tripamastigotas sembradas. El cultivo en medio de Warren resultó más sensible que el xenodiagnóstico, sobre todo en la fase aguda, mientras que en la fase crónica el hemocultivo y el xenodiagnóstico son complementarios.

Freitas (5), aplicó hemocultivo con los medios de Bonacci y N.N.N. a 37 pacientes con reacción de Guerreiro-Machado positiva, obteniendo resultados negativos.

Martínez-Silva y cols. (6), realizaron estudios comparativos entre tres métodos de diagnóstico: la siembra en medio N.N.N., la inoculación intracerebral en ratones recién nacidos y el cultivo de células. Utilizando 8 ratones con infección aguda y 30 con infección crónica; obteniendo el siguiente resultado: en aquellos casos con infección crónica el cultivo de tejido fue positivo en 100% de los casos; mientras que la positividad se restringe a 93.3% tanto para el hemocultivo como para la inoculación intracerebral.

Pifano (12), practicando simultáneamente el xenodiagnóstico y el hemocultivo en 35 pacientes, obtuvo positividad de 91% y 14% respectivamente.

En vista de las dificultades que existen en nuestro medio para el diagnóstico parasitológico de la infección chagásica, realizamos este estudio preliminar con la finalidad de tratar de estandarizar un método de cultivo sencillo, económico y eficaz que pudiera ser utilizado en un futuro, inclusive para el diagnóstico de la infección humana.

MATERIAL Y METODOS

1. Cepas de *Trypanosoma cruzi*.

- Cepa Y: aislada de caso agudo de enfermedad de Chagas en Sao Paulo - Brasil.

- Cepa IgF: aislada de paciente con fase crónica de enfermedad de Chagas, Sao Paulo - Brasil.
 - Cepa Zuliana: aislada a partir del contenido intestinal de triatomino naturalmente infectado, en Maracaibo Estado Zulia, Venezuela.
 - Cepa Elpidio Padrón: aislada de paciente con fase crónica de enfermedad de Chagas, en Valencia - Venezuela.
2. Ratonés.

Se utilizaron ratones blancos (*Mus musculus*) de 21 días de edad, del mismo peso, del mismo sexo, criados en el biotero de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.
 3. Triatominos.

Como fuente de *Trypanosoma cruzi* se utilizaron Hemíptero de la familia Rhodniidae (*Rhodnius prolixus*), experimentalmente infectados y mantenidos en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia
 4. Medios de Cultivo.
 - A) Medio de Warren:
 - Preparar una solución, 37g/lt, de "Brain Heart Infusión" en agua destilada
 - Hervir en recipiente que contenga perlas de vidrio.
 - Agregar 10% de sangre desfibrinada de carnero.
 - Dejar enfriar y filtrar en papel de filtro.
 - Ajustar el pH a 7.0 - 7.2.
 - Distribuir a razón de 5 ml de medio en cada tubo.
 - Esterilizar en autoclave a 120°C durante 20-30 minutos.

NOTA: La filtración debe hacerse en nevera para evitar la contaminación y se debe refiltrar varias veces a través del mismo filtro.
 - B) Caldo Cerebro Corazón:
 - Preparar una solución, 37g/lt, de "Brain Heart Infusión" en agua destilada
 - Hervir hasta disolver completamente.
 - Repartir a razón de 5 ml de medio en cada tubo.
 - Esterilizar en autoclave a 120°C durante 15-20 minutos.
 - C) Medio Difásico (N.N.N. modificado):
 - Preparar una solución que contenga 37g de "Brain Heart Infusión" y 20g de Agar y 1000 ml de agua destilada.
 - Hervir.

- Esterilizar en autoclave a 115°C durante 20 minutos.
- Agregar 400ml de sangre desfibrinada de carnero.
- Repartir a razón de 5 ml de base en cada tubo inclinando el mismo, de tal manera que se forme un bisel.
- Agregar como parte líquida 3ml de caldo cerebro corazón estéril.

Triatominos (*Rhodnius prolixus*), experimentalmente infectados con cada una de las cepas en estudio (Y, IgF, E.P. y Zuliana) fueron seleccionados como fuente de *Trypanosoma cruzi*. En cada caso se preparó una suspensión en solución fisiológica del contenido intestinal, obtenido por sección de los dos últimos segmentos abdominales de los insectos. 0.2 ml de esa suspensión fueron inoculados intraperitonealmente a ratones blancos de 21 días de edad (4 ratones por cada cepa). La evolución parasitológica de la infección fue investigada mediante exámenes sistemáticos 2 veces por semana, obteniendo la sangre mediante sección de la cola de los ratones.

Los experimentos se realizaron cuando los ratones tenían 30 días de haber sido inoculados. La sangre para los hemocultivos se obtuvo mediante punción cardíaca de los ratones. 3 gotas de sangre eran sembradas en cada uno de los tubos que contenían los medios de cultivo (2 tubos por cada uno de los siguientes medios: Warren, Caldo cerebro corazón y Difásico. Los tubos fueron mantenidos en estufa a 25°C y examinados a los 7, 15, 21, 30 y 45 días de haber sido sembrados. Después de 28 días de incubación, cuando el crecimiento era abundante, se practicaron repiques de medio a medio, sembrando 3 tubos para cada medio de cultivo. Los tubos fueron incubados a 25°C y examinados a los 7, 15, 21, 30 y 45 días.

RESULTADOS

El crecimiento de las 4 cepas de *Trypanosoma cruzi* sembradas en el medio de Warren a partir de sangre de ratones infectados tuvo la siguiente dinámica:

Con la cepa Elpidio Padrón se observaron resultados positivos a los 21 días después de la siembra. El crecimiento máximo se obtuvo a los 30 días y a los 45 días los cultivos se hicieron negativos.

La positividad para las cepas IgF, Y y Zuliana se logró a los 15 días. El crecimiento máximo para la cepa IgF fue a los 21 días, para la cepa Y a los 30 días y para la cepa Zuliana a los 45 días. Como puede observarse, los tubos

sembrados con las cepas IgF, Y y Zuliana se mantuvieron positivos después de 45 días de incubación.

El comportamiento de las 4 cepas de *Trypanosoma cruzi*, sembradas en Caldo Cerebro Corazón, a partir de sangre de ratones infectados ocurrió de la siguiente manera:

Los tubos se hicieron positivos a los 7 días para la cepa Elpidio Padrón, a los 15 días para las cepas IgF y Y y a los 21 días para la cepa Zuliana.

El crecimiento máximo de la cepa IgF ocurrió a los 21 días y para las otras 3 cepas a los 30 días. En todos los casos, la positividad se mantuvo después de 45 días de sembrados los medios.

El crecimiento de las diferentes cepas, sembradas en el medio Difásico a partir de sangre de ratones infectados, mostró el siguiente patrón:

Se logró positividad a los 7 días para las cepas Elpidio Padrón y Zuliana, mientras que el crecimiento de las cepas IgF y Y se detectó a los 15 días. Llama la atención el intenso crecimiento observado para las cepas IgF y Y y a lo largo del tiempo, inclusive después de los 45 días.

A continuación se muestra la dinámica de crecimiento de las cepas estudiadas cuando fueron repicadas en el medio de Warren.

Los primeros resultados positivos se obtuvieron a los 7 días para las cepas Elpidio Padrón, IgF y Y y a los 15 días para la cepa Zuliana. Todas las cepas experimentaron crecimiento bastante escaso, contrario a lo observado cuando la siembra se hizo directamente de ratones infectados. El máximo crecimiento ocurrió a los 21 días para las cepas Elpidio Padrón e IgF, a los 30 días para la cepa Y y a los 45 días para la cepa Zuliana. Todos los tubos sembrados con las cepas IgF y Y se hicieron negativos a los 45 días.

Las cepas crecieron mal cuando se repicaron en Caldo Cerebro Corazón, a pesar de que en todos los casos se observaron resultados positivos a los 7 días. Con excepción de la cepa Elpidio Padrón, las otras 3 cepas fueron negativas a los 45 días después de sembradas.

Cuando las diferentes cepas se repicaron en medio Difásico se observó un crecimiento intermedio. Con todas las cepas se obtuvieron resultados positivos a los 7 días. El crecimiento máximo fue observado a los 30 días para las cepas Elpidio Padrón y Zuliana, mientras que para las cepas IgF y Y el máximo crecimiento ocurrió a los 45 días. Todos los tubos sembrados con las diferentes cepas persistieron positivas después de 45 días.

Algo que llama la atención es el predominio de formas amastigotas en las cepas Elpidio Padrón y Zuliana, fenómeno observado en todos los medios de cultivo, sobre todo en los primeros 30 días de sembradas.

El Cuadro N° 1 muestra el crecimiento promedio de los parásitos en los diferentes medios de cultivos sembrados con sangre de ratones infectados y los porcentajes de formas amastigotas, independientemente de la cepa de *Trypanosoma cruzi*.

El crecimiento fue más abundante (94.649 parásitos por ml) y el porcentaje de amastigotas más elevado (60.39%) en el medio Difásico. El menor crecimiento se observó en el medio Warren (31.489 parásitos por ml), mientras que el porcentaje más bajo de formas amastigotas fue observado en Caldo Cerebro Corazón (14.58%).

El crecimiento fue mucho menos y el porcentaje de formas amastigotas más bajo cuando las diferentes cepas fueron repicadas de medio para medio, como lo muestra el Cuadro N° 2.

También en este caso hubo mayor crecimiento en el medio Difásico (19.074 parásitos por ml), así como un porcentaje más elevado de formas amastigotas (13.4%); mientras que el menor crecimiento se observó en Caldo Cerebro Corazón, en el cual solamente se observaron formas flageladas.

CUADRO N° 1

Crecimiento de cuatro cepas de *T. cruzi* a partir de sangre de ratón infectado en tres medios de cultivo.

MEDIOS DE CULTIVO	N° PARASITOS/ml.	% AMASTIGOTAS
Warren	31.489	52.00
Caldo Cerebro Corazón	61.525	14.58
Difásico (N.N.N. modificado)	94.649	60.39

CUADRO N° 2

Crecimiento de cuatro cepas de *T. cruzi* a partir de medio de cultivo en tres medios de cultivo.

MEDIOS DE CULTIVO	N° PARASITOS/ml.	% AMASTIGOTAS
Warren	5.378	9.4
Caldo Cerebro Corazón	314	0.0
Difásico (N.N.N. modificado)	19.074	13.4

DISCUSION

El hemocultivo es un método parasitológico indirecto que se utiliza para detectar la infección del huésped vertebrado por *Trypanosoma cruzi*. Los resultados obtenidos por los diferentes autores han sido muy variados y poco satisfactorios cuando el método se emplea con fines diagnósticos, sobre todo en las infecciones humanas crónicas.

La sensibilidad del hemocultivo como método diagnóstico depende de diversos factores. Así, para Pifano (12), los factores que condicionan el aislamiento de *Trypanosoma cruzi* son la densidad parasitaria, el potencial macrofágico de los leucocitos transportados y las condiciones metabólicas del medio. Según Chiari y Brener (3), la sensibilidad del método depende fundamentalmente de la naturaleza del medio empleado y de la técnica de preparación del inóculo; mientras que para Mourao y Mello (8), la positividad depende del número de hemocultivos practicados.

En el presente estudio los mejores resultados fueron obtenidos con el medio Difásico, tanto para el aislamiento primario a partir de sangre como para el mantenimiento de las diferentes cepas de *T. cruzi* cuando se hicieron los repiques de medio para medio. Independientemente de la cepa del parásito, en promedio, el medio Difásico dio resultados positivos más tempranamente, el crecimiento fue mayor y los tubos se mantuvieron positivos durante más de 45 días después de sembrados, mientras que el medio de Warren aparentemente fue el menos adecuado. Resultados contrastantes han sido reportados por algunos autores: Freitas (5), obtuvo resultados negativos con el medio N.N.N. al practicar 37 hemocultivos a 21 pacientes chagásicos crónicos. Albuquerque y cols (1), aislaron trypanosomas en 37 (97.4%) de 38 chagásicos crónicos utilizando el medio de Warren; sin embargo, este resultado ha sido muy discutido ya que todavía no ha podido ser reproducido por otros autores. Neal (9), comparando cinco medios de cultivo, mostró que el medio de Warren era el mejor para la detección de *Trypanosoma cruzi* en sangre; el autor señala que en condiciones experimentales se necesita menor número de parásitos para obtener hemocultivos positivos que para infectar *Rhodnius prolixus*.

El medio Difásico utilizado en el presente trabajo es una modificación del medio original de Novy, MacNeal y Nicolle (11). A continuación se resumen ambas fórmulas:

<u>N.N.N. Original</u>		<u>Difásico (N.N.N.Modificado)</u>	
Agar	14 grs.	Brain Heart Infusión	37 grs.
Cloruro de Sodio	6 grs.	Agar	20 grs.
Agua destilada	900 ml	Agua destilada	1000 ml
Agregar la tercera parte del volumen en sangre desfibrinada de conejo.		Sangre desfibrinada de carnero	400 ml

Como se puede observar, la diferencia básica consiste en el uso de "Brain Heart Infusión", sustancia rica en nutrientes y sangre de carnero en vez de conejo; la sangre de carnero se utilizó simplemente por la disponibilidad de estos animales en el Bioterio de la Facultad de Medicina y por la experiencia de nuestro personal para obtener sangre en condiciones de esterilidad a partir de los mismos. Otra modificación fue la adición de Caldo Cerebro Corazón como sobrenadante, mientras que en el medio original los parásitos se desarrollan en la pequeña cantidad de agua que se condensa en el fondo de los tubos. Los buenos resultados obtenidos con el medio Difásico (N.N.N. Modificado), sugieren que para la preparación del mismo se puede utilizar, tanto sangre de carnero como de conejo.

Algo digno de resaltar fue el predominio de formas amastigotas, en todos los medios de cultivo, para las cepas Elpidio Padrón y Zuliana, sobre todo en los 30 primeros días después de la siembra; mientras que para las cepas Y e IgF casi la totalidad de las formas evolutivas observadas fueron epimastigotas. Este fenómeno tiene gran importancia práctica ya que, tradicionalmente cuando se examinan medios de cultivos sembrados con sangre obtenida a partir de huéspedes con posible infección por *T. cruzi*, la positividad es dada por la observación de formas flageladas que se desplazan rápidamente en el campo microscópico. El predominio en algunas cepas de formas amastigotas, que no tienen suficiente movimiento como para llamar la atención del observador, pudiera originar el reporte de falsos resultados negativos. Para obviar este inconveniente, es recomendable que además de la observación del material al fresco, se practique coloración de las láminas, con la finalidad de detectar formas amastigotas. Minter-Goedbloed (7), estudió el comportamiento del hemocultivo y del xenodiagnóstico en 29 casos de infección por *T. cruzi*. Con el xenodiagnóstico detectó 25 casos positivos, mientras que con

el medio de Warren detectó 27. La autora opina que los buenos resultados obtenidos con el hemocultivo se debieron en parte a que los medios fueron examinados durante mucho tiempo (hasta 5 meses) antes de considerar los negativos, pero sobre todo al examen de frotis coloreados con Giemsa, del sedimento de los tubos, lo que permitió la detección de formas amastigotas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten considerar al medio Difásico (N.N.N. Modificado) como una alternativa de gran valor para la detección de *T. cruzi* a partir de sangre de vertebrados natural o experimentalmente infectados; por lo tanto, mayores estudios se deben realizar con este medio, sobre todo en infecciones crónicas, inclusive humanas.

Algo que debemos dilucidar posteriormente es el hecho de que todas las cepas estudiadas crecieron muy bien cuando los medios fueron sembrados a partir de sangre de ratones infectados, mientras que el crecimiento fue bastante escaso cuando se hicieron los repiques de medio para medio. Este fenómeno pudiera ser explicado por la falta de adaptación de la cepa a los medios de cultivo; probablemente, en repiques sucesivos posteriores, cuando se logre la adaptación de las cepas a los medios, se podrá obtener crecimiento similar o superior al observado durante el aislamiento primario.

CONCLUSIONES

1. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio Difásico (N.N.N. Modificado) tanto para el aislamiento primario como para el mantenimiento de las cepas.
2. En todos los medios el crecimiento fue mucho mayor cuando la siembra se hizo a partir de sangre de ratones infectados, mientras que el crecimiento fue escaso cuando se realizaron los repiques de medio para medio.
3. En todos los medios, sobre todo en el medio Difásico, se obtuvieron altos porcentajes de formas amastigotas para las cepas Elpidio Padrón y Zuliana.

Tomando en cuenta las observaciones hechas en el presente trabajo, se recomienda:

1. El uso del medio Difásico (N.N.N. Modificado) para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi*.
2. La investigación de la sensibilidad del medio Difásico en infecciones crónicas por *T. cruzi* inclusive humanas.
3. El examen por coloración cuando se utilizan medios de cultivo; esto evitaría el reporte de falsos resultados negativos en aquellos aislamientos donde predominen las formas amastigotas.

LITERATURA CITADA

1. ALBUQUERQUE, R.D.R.; FERNANDEZ, L.A.R.; FUNAMAYA, G.K.; FERRIOLI Filho, F.; SIQUEIRA, A.F.: Hemoculturas seriadas como meio de Warren em pacientes com reacao de Guerreiro-Machado positiva. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 14:1-5, 1972.
2. BRUMPT, E.: O xenodiagnóstico. Aplicacao ao diagnóstico de algumas infeccoes parasitarias e em particular á Tripanosomose de Chagas. *Anals Paulistas de medicina e Cirurgia*, 3:97-102, 1914.
3. CHIARI, E.; BRENER, Z.: Contribuicao ao diagnóstico parasitológico da Doença de Chagas na sua fase crónica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 8:134-8, 1966.
4. CHIARI, E.; DIAS, J.C.P.: Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para o diagnóstico parasitológico na Doença de Chagas na sua fase crónica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 9:133-6, 1975.
5. FREITAS, J.L.P.: Contribuicao para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório. Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, 1947.
6. MARTINEZ-SILVA, R.; LOPEZ, V.A.; COLON, J.I.; CHIRIBOGA, J.: Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood of acutely and chronically infected mice in tissue culture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 18:878-84, 1969.
7. MINTER-GOELDBLOED, E.: Hemoculture compared with xenodiagnosis for the detection of *T. cruzi* infection in man and animals. In: *New Approaches in American Tripanosomiasis Research*. Proceedings of an International Symposium (Belo Horizonte, 1975). Sc. Publ. Nº 318 (Washington), p. 245-52, 1976.
8. MOURAO, O.G.; MELLO, O.C.: Hemoculturas para o diagnóstico parasitológico na fase crónica da Doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 9:183-8, 1975.
9. NEAL, R.A.: Superiority of the culture technique over xenodiagnosis for detection of trypanosomes in Chagas disease. In: *International Congress of Tropical Medicine and Malaria*, (Atenas, 1973) Atenas, Annals, 1973, p. 56, 1973.
10. NEAL, R.A.; MILES, R.A.: Sensibilidade dos métodos de cultura em relacao ao xenodiagnóstico para evidenciar infeccoes experimentais pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 19:167-70, 1977.
11. NOVY, F.G.; MACNEAL, W.J.: On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *Jornal of Infectious diseases*. 1:1-30, 1904.
12. PIFANO, F.C.: El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Archivo Venezolano de Patología Tropical y Parasitología Médica*, 2:89-120, 1954.
13. PIFANO, F.C.: Evaluación de los procedimientos de laboratorio empleados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 49:563-71, 1960.
14. SALGADO, A.A.: Consideraciones sobre metodología y sensibilidad del xenodiagnóstico. *Boletín Chileno de Parasitología*, 24:9-13, 1969.