



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA MALÁRIA POR NESTED-
PCR E PCR EM TEMPO REAL**

JANAYNA RORIZ HIPÓLITO

MANAUS
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

JANAYNA RORIZ HIPÓLITO

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA MALÁRIA POR
NESTED-PCR E PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Maria das Graças Costa Alecrim

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Vieira

**MANAUS
2006**

Ficha Catalográfica (Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Hipolito, Janayna Roriz

H667D Diagnóstico molecular para malária por Nested-PCR e PCR em tempo real / Janayna Roriz Hipolito. - Manaus: UFAM, 2006.

92 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) —

Universidade Federal do Amazonas, 2006

Orientadora: Prof^a Dra Maria das Graças Costa Alecrim

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Vieira

1. Malária - Diagnóstico 2. Epidemiologia I. Alecrim, Maria das Graças Costa II. Vieira, Pedro Paulo III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.936(043.3)

JANAYNA RORIZ HIPÓLITO

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA MALÁRIA POR
NESTED-PCR E PCR EM TEMPO REAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 28 de julho de 2006.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr.^a Maria das Graças Costa Alecrim, Presidente.
Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Prof^a Dr.^a Joselita Maria Mendes dos Santos, Membro.
Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas

Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, Membro.
Universidade do Federal do Amazonas

Dedico este trabalho aos amores da minha vida, minha mãe Maria da Consolação Roriz Hipólito, meu irmão Fabrício Roriz Hipólito, e meus avós João Hipólito e Nair da Abadia Roriz Hipólito pelo amor e compreensão dedicados a mim durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

- A Universidade Federal do Amazonas e a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, pela oportunidade de realizar o Mestrado.
- A FAPEAM, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste estudo.
- À Dr.^a Maria das Graças Costa Alecrim, pela orientação na realização deste trabalho.
- À Dr.^a Mônica Regina Farias Costa Manso, pelo apoio na execução do trabalho.
- Ao Dr. Pedro Paulo Vieira, por aceitar participar como co-orientador deste trabalho.
- Ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda e ao Dr. Franklin Simões, pela colaboração e pelas sugestões dadas ao presente trabalho.
- À amiga de mestrado Cynthia Oliveira, pela colaboração em vários momentos da realização deste trabalho.
- Aos funcionários do Laboratório de Malária da FMTAM, pelo apoio durante a execução deste trabalho.
- Aos meus tios Eliane Roriz Hipólito e Francisco Vieira Filho, por terem me adotado durante esse tempo.
- Às minhas primas Érika Vanessa Roriz Hipólito Vieira e Taysa Roriz Hipólito, pelo carinho e paciência.
- Às amigas Marinez Nogueira, Yane Almeida e Márcia Rúbia Melo, pela amizade e companheirismo partilhados principalmente nos momentos de angústias.
- Ao meu amor Claudio Fernández Araujo, pelo carinho e paciência durante os momentos mais difíceis e conturbados dessa fase.
- A Prof.^a Maria do Socorro Nobre Tavares, pela revisão do texto.
- E a todos aqueles que, em algum momento, com palavras de carinho e coragem, me incentivaram a concluir este trabalho.

RESUMO

A malária é um problema de saúde pública na região Amazônica, mais de 200 mil casos dessa doença ocorrem anualmente no Amazonas, sendo 80% deles causados pelo *P. vivax*, que vem apresentando índices crescentes de morbidade, principalmente associados à diminuição da sensibilidade aos antimaláricos. Dentre as estratégias para combate e controle da doença, a identificação rápida e precisa da espécie é ferramenta indispensável para um tratamento apropriado, diminuição do risco de transmissão e melhor entendimento da epidemiologia desses parasitas. A técnica microscópica da gota espessa é a principal para diagnóstico da malária, entretanto, outros métodos vêm sendo testados, principalmente os moleculares que tem se mostrado mais sensíveis e específicos para detectar e diferenciar as espécies em baixas parasitemias. Avanços desse método, como a PCR em tempo real, permitem que o resultado do teste seja detectado simultaneamente a amplificação, diminuindo o tempo gasto para a realização do diagnóstico. Com o intuito de detectar molecularmente a malária, verificando a presença de plasmódios, o diagnóstico molecular foi realizado através das técnicas de PCR em tempo real e nested-PCR, para se fazer uma comparação desses dois métodos com o diagnóstico microscópico da gota espessa em 300 amostras criopreservadas, 200 coletadas no dia inicial do tratamento (D0), das quais 88% (176/200) eram provenientes de pacientes de Manaus, as 24 amostras restantes (12%) eram provenientes de localidades do interior do Amazonas: São Gabriel da Cachoeira (09), Tefé (08), Humaitá (04) e Careiro (03). Apenas 9% dessas amostras tinham diagnóstico microscópico de monoinfecção por *P. falciparum* e 91% (182/200) por *P. vivax*, não havia nenhuma amostra mista pelo diagnóstico microscópico. O diagnóstico molecular por nested-PCR confirmou a presença de DNA de plasmódio em 100% das amostras monoinfectadas. Adicionalmente, foram observadas infecções mistas, co-infecção de *P. falciparum* e *P. vivax*, em 19% (38/200) destas amostras. O diagnóstico molecular por PCR em tempo real (Lightcycler, Roche[®]) foi realizado em apenas 17% (34/200) dessas amostras. A co-positividade (sensibilidade) dos testes para *P. vivax* foi em média 71% e a co-negatividade (especificidade) 92%, para *P. falciparum* a co-positividade foi 91% e a co-negatividade 79%. A concordância entre os testes foi regular. As 100 amostras restantes haviam sido coletadas no sétimo dia (D7) de tratamento e eram negativas pela microscopia. O diagnóstico molecular demonstrou 21% de positividade. Este estudo mostrou que muitas infecções mistas vêm sendo subestimadas para fins de avaliação epidemiológica, demonstrando que a sensibilidade e especificidade do diagnóstico molecular são superiores a do teste microscópico. O diagnóstico molecular seria então mais indicado como teste complementar no diagnóstico de pacientes com baixas parasitemias, na análise da quantidade de portadores assintomáticos, em estudo de infecções criptônicas e na avaliação da negatificação da parasitemia para monitoramento terapêutico, e em estudos que visem a diminuição da transmissão pela existência de prováveis gametócitos persistentes após o tratamento. Entretanto, esse método não é indicado para rotina de diagnóstico de malária, uma vez que os resultados positivos por essa técnica não significam necessariamente que o paciente desenvolva a doença.

Palavras chave: Malária, Diagnóstico, Nested-PCR, PCR em tempo real.

ABSTRACT

The malaria is a problem of public health in the Amazon area, more than 200 thousand cases of that disease happens annually in Amazonas, being 80% of them caused by *Plasmodium vivax*, which is presenting growing indexes of morbidity, mainly associated to the decrease of the sensibility to the antimalarial treatment. Among the strategies for combat and control of the disease, the fast and needs identification the species is indispensable tool for an appropriate treatment, decrease of the transmission risk and better understanding of the epidemiology of these parasites. The microscopic technique of the thick smear is the main for diagnosis of the malaria, however, other methods have been tested, mainly the molecular ones that has been showing more sensitive and specific to detect and to differentiate the species in low parasitaemias. Progresses of that method, like real time PCR, allow the result of the test to be detected the amplification simultaneously, reducing the time spend in the diagnosis. With the intention of detecting the malaria, verifying the *Plasmodium sp* presence, the molecular diagnosis was accomplished through the techniques of PCR in real time and nested-PCR, to do a comparison of the two methods with the microscopic diagnosis of the thick smear in 300 samples preserved in the freezer, 200 collected in the initial day of the treatment (D0), of the which 88% (176/200) were coming of patients from Manaus, the 24 remaining samples (12%) were from places of the interior of Amazonas: São Gabriel Cachoeira (09), Tefé (08), Humaitá (04) and Careiro (03). Only 9% of those samples had microscopic diagnosis of infected by only parasite species *P. falciparum* and 91% (182/200) for *P. vivax*, there was non mixed sample for the microscopic diagnosis. The molecular diagnosis for nested-PCR confirmed the presence of *Plasmodium sp* DNA in 100% of the samples. Mixed infections, co-infection of *P. falciparum* and *P. vivax* were observed, in 19% (38/200) of these samples. The molecular diagnosis for real time PCR (Lightcycler, Roche[®]) was accomplished in only 17% (34/200) the samples. The co-positivity (sensibility) of the tests for *P. vivax* was 71% and the on average co-negativity (specificity) 92%, for *P. falciparum* the co-positivity it was 91% and the co-negativity 79%. The agreement among the tests went to regulate. The 100 remaining samples had been collected in the seventh day (D7) of treatment and they were negative for the microscopy. The molecular diagnosis demonstrated 21% of positivity. This study showed that many mixed infections have been underestimated for ends of epidemic evaluation, demonstrating that the sensibility and specificity of the molecular diagnosis are superior to the microscopic test. The molecular diagnosis would be more suitable as complementary test in the patients diagnosis with low parasitemias, in the analysis of the amount of bearers asymptomatic, in study of cryptic infections and in the evaluation of the clearance of the parasitemia for monitoring therapeutic, and in studies that seek the decrease of the transmission for the existence of possible persistent gametocyte after the treatment. However, this method is not indicated for routine of malaria diagnosis, once the positive results for that technique don't necessarily mean that the patient develops the disease.

Key Words: Malaria, Diagnosis, Nested-PCR, real time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição mundial dos casos de malária	14
Figura 2	Áreas de risco para malária no Brasil segundo IPA – 2004	15
Figura 3	Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp.	18
Figura 4	Gráfico da detecção (por fluorescência) de uma monoinfecção por <i>Plasmodium falciparum</i> em um aparelho de PCR em tempo real	29
Figura 5	Gráfico da área de detecção da infecção por Plasmodio pelos testes mais utilizados no diagnóstico da malária	33
Figura 6	Locais de coleta das amostras de sangue criopreservado	38
Figura 7	Foto do gel do diagnóstico por Nested-PCR em amostras coletadas no D0	44
Figura 8	Percentual de detecção laboratorial em duas técnicas de diagnóstico da malária.....	45
Figura 9	Gráfico do diagnóstico por PCR em tempo real de algumas amostras coletadas no D0	47
Figura 10	Foto do gel do diagnóstico por Nested-PCR em amostras coletadas no D7	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Interpretação da concordância dos testes de acordo com os possíveis valores do índice Kappa	43
Tabela 2	Diagnóstico laboratorial das amostras coletadas no D0.....	45
Tabela 3	Sítios de coleta e diagnóstico para malária nas três metodologias.....	46
Tabela 4	Comparação do diagnóstico da malária por PCR em tempo real x Gota Espessa	47
Tabela 5	Comparação do diagnóstico da malária por nested-PCR x Gota Espessa	48
Tabela 6	Comparação do diagnóstico da malária por PCR em tempo real x nested-PCR	48
Tabela 7	Diagnóstico molecular positivo em D7	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	77
Anexo 2	Parecer do comitê de ética em pesquisa – FMTAM	79
Anexo 3	Diagnóstico microscópico pela Gota Espessa	80
Anexo 4	Esquema de tratamento para malária utilizado na FMTAM	81
Anexo 5	Protocolo de extração de DNA	82
Anexo 6	Protocolo de extração de DNA - CHELEX 10%	83
Anexo 7	Géis do diagnóstico molecular em D0	84
Anexo 8	Géis do diagnóstico molecular para <i>P. vivax</i> em D7	86
Anexo 9	Gráficos de diagnóstico por PCR em tempo real	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ct	Ciclo de referência
dhps	Diidrofolato redutase
dhfr	Diidropteroa sintetase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D0	Dia do início do tratamento
D7	Sétimo dia do tratamento
EDTA	Etileno diamino tetracético
FMTAM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
HRP2	Proteína rica em histidina II
IPA	Incidência Parasitária Anual
LDH	Lactato desidrogenase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAP	Portador Assintomático de Malária
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIACM	Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária
PNCM	Programa Nacional de Controle da Malária
Pr	Primaquina
QBC	Quantitative Buffy Coat
RAVREDA	Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas
SEMSA	Secretaria Municipal de Saúde
SP	Sulfadoxina-Pirimetamina
SSUrRNA	Subunidade menor do RNA ribossomal

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 Malária - Aspectos Gerais	13
1.2 Epidemiologia	14
1.3 Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i>	18
1.3.1 <i>Plasmodium</i> - Características espécie-específica	20
1.4 Diagnóstico da doença	21
1.4.1 Gota Espessa	23
1.4.2 Detecção molecular.....	25
1.4.3 Diagnóstico molecular em tempo real	28
1.5 Diagnóstico molecular - aplicação epidemiológica	32
2. OBJETIVOS	36
2.1 Geral	36
2.2 Específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Amostragem e Localidades	37
3.2 Diagnóstico molecular da doença	38
3.2.1 Extração de DNA.....	39
3.2.2 Nested-PCR	39
3.2.3 PCR em tempo real.....	40
3.3 Análise Comparativa dos Testes de Diagnósticos	42
4. RESULTADOS	44
4.1 Diagnóstico molecular- amostras coletadas em D0.....	44
4.1.1 Técnica alternativa de Diagnóstico molecular.....	46
4.2 Diagnóstico molecular- amostras coletadas em D7.....	49
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Malária - Aspectos Gerais

A malária é uma doença infecciosa, não-contagiosa, com manifestações de caráter agudo. É também chamada paludismo, febre palustre, febre terçã, febre quartã, impaludismo, maleita ou sezão. Conhecida desde a antiguidade, está amplamente distribuída, sendo a doença parasitária que mais acomete o homem e é considerada fator limitante para o crescimento demográfico, econômico e cultural (MENDIS et al., 2001; FERREIRA, 2004).

Em 1880, o médico francês Alphonse Laveran observou parasitas dentro das hemácias de pacientes febris. Esses parasitas são hoje conhecidos como pertencentes ao gênero *Plasmodium*. Na sistemática zoológica, os mesmos são classificados no filo *Protozoa*, classe *Sporozoa* e família *Plasmodidae*. Existem mais de cem espécies de *Plasmodium* conhecidas. Destas, apenas quatro parasitam o homem preferencialmente: *P. malariae*, LAVERAN, 1881; *P. vivax*, GRASSI; FELETTI, 1890; *P. falciparum*, WELCH, 1897 e *P. ovale*, STEPHENS, 1922 (FERREIRA, 2004; SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004).

Em 1898, Ronald Ross percebeu o desenvolvimento de oocistos na parede do estômago de mosquitos *Anopheles*, confirmando que a transmissão da doença ao homem se dá por esse vetor invertebrado. Estes mosquitos têm maior atividade durante a noite, do crepúsculo ao amanhecer, e geralmente fazem repasto sanguíneo no interior das habitações. Recentemente foi possível verificar a importância da transmissão da malária por diversas espécies de anofelinos nas Américas. Dentre as diversas espécies encontradas na Amazônia, o *A. darlingi* apresenta-se como o principal vetor com relevância epidemiológica (CIVES, 2006; NEVES, 1998; TADEI; DUTARY-THATCHER, 2000).

1.2 Epidemiologia

A malária encontra-se amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais (figura 1) e representa uma das mais importantes causas de morbidade e mortalidade em regiões endêmicas, tais como a África, Ásia, América do Sul, Caribe, Europa Oriental e Oceania. Mais de cem países, cerca de 40% da população mundial, estão expostos ao risco de transmissão. Anualmente, 90% dos casos ocorrem no continente africano, onde trezentos a quinhentos milhões de pessoas são infectadas e cerca de 1,5 a 2,7 milhões morrem em consequência da doença. (CIVES, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2004; OPAS/OMS, 1998; SUH; KAIN; KEYSTONE, 2004).

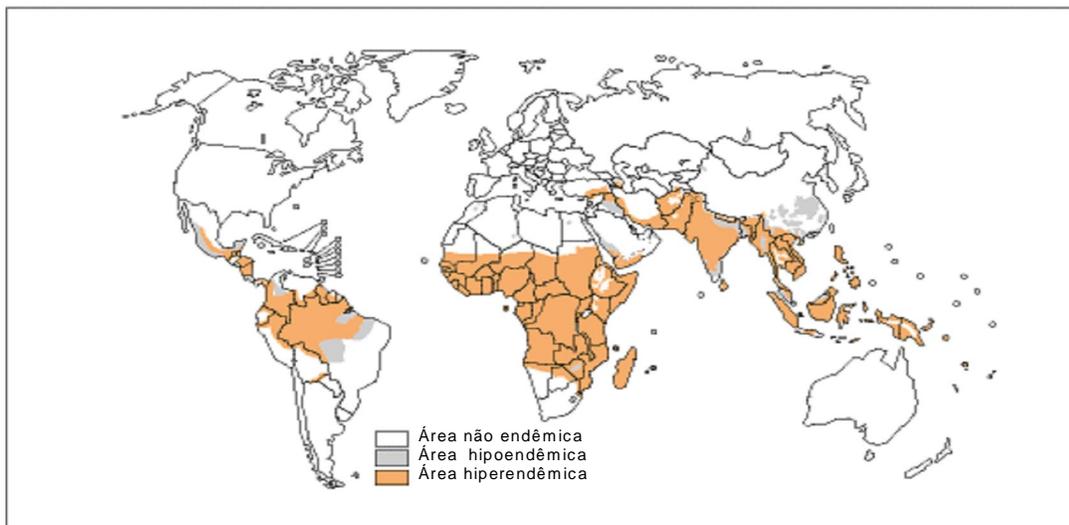


Figura 1: Distribuição mundial dos casos de malária.
Fonte: Adaptado de ROLL BACK MALARIA (2003).

Nas Américas, aproximadamente 75% dos casos de malária ocorrem na bacia Amazônica. A Amazônia Legal Brasileira, que corresponde aos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, é responsável por mais de 99% do total de casos relatados no país, sendo a maioria das notificações realizada em áreas mais afastadas dos centros urbanos. Em 2001, apenas 11,9% do total de casos

corresponderam a infecções adquiridas em áreas urbanas (CIVES, 2006; FUNASA, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2004;).

O risco de aquisição da doença não é uniforme, mesmo em área endêmica e pode sofrer variações com as estações do ano e ao longo do tempo, influenciado principalmente pelas alterações climáticas, medidas de controle da doença e combate aos mosquitos. Este risco é medido pela Incidência Parasitária Anual (IPA), correspondendo à quantidade de lâminas positivas dividido pela população sob risco e multiplicado por uma constante (1.000) (CIVES, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS, 2004). A Amazônia Legal Brasileira apresenta zonas com diferentes índices de risco parasitário, como mostra a figura 2.

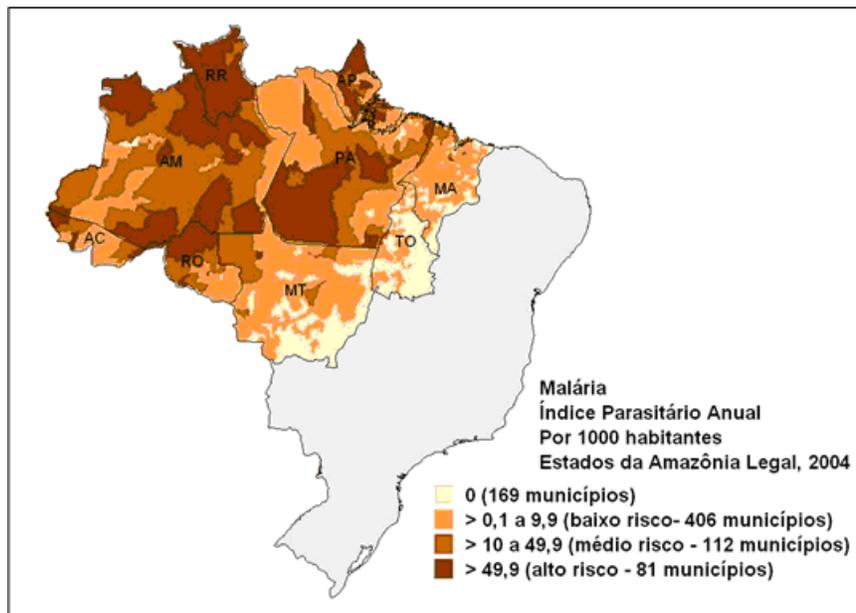


Figura 2: Áreas de risco para malária no Brasil segundo IPA – 2004.
Fonte: CGPNM/SVS/Ministério da Saúde.

Nos Estados fora da Região Amazônica, o risco de transmissão *autóctone* é praticamente inexistente e a quase totalidade dos casos de malária registrados são importados da Amazônia Legal ou de outros países, principalmente da África. Como, em geral, não é possível eliminar os *Anopheles* dessas áreas onde a transmissão da malária já foi controlada,

eventualmente existe o risco de ocorrer a reintrodução da malária advinda de casos importados da doença (CIVES, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Por esse motivo, nos últimos anos foram implantadas medidas de controle e combate à doença na Região Amazônica, como o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), lançado pelo Ministério da Saúde em julho de 2000, com o intuito de reduzir em 50% os casos da doença até o final de 2001. A estratégia visava a uma melhora política, com estruturação dos sistemas locais de saúde: diagnóstico e tratamento precoce; educação em saúde; mobilização social; capacitação de recursos humanos; e ações interinstitucionais. O PIACM alcançou uma redução de até 50,2% na incidência da malária, mas não de forma homogênea, em todos os estados da Amazônia Legal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

No intuito de manter os avanços já alcançados com o PIACM, atualmente o Ministério da Saúde vem mantendo uma política permanente para prevenção e controle da endemia, por intermédio do Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM). Em 2001, o RAVREDA- Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas - foi criado no sentido de diminuir a morbidade e a mortalidade causadas pela malária. Com vistas a subsidiar o controle da doença, o RAVREDA tem o objetivo de monitorar a resistência às drogas antimaláricas em toda Região Amazônica, avaliando a suscetibilidade dos parasitas aos medicamentos, sendo coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde, OPAS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

No ano de 2004 foram notificados 149.504 casos positivos de malária no Estado do Amazonas, sendo 118.519 causados pelo *P. vivax*, 29.619 pelo *P. falciparum* e apenas 1.366 casos eram malária mista, com infecção pelas duas espécies. O município de Manaus contribuiu com 55.851 dos casos, dos quais 45.701(82%) causados pelo *P. vivax*. Dentre os municípios do interior do estado com maior número de notificações de casos de malária,

podemos citar Tefé com 3.364 casos de malária, Humaitá com 2.630 casos e São Gabriel da Cachoeira com 1.934 casos (FMTAM, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em 2005 foram diagnosticados 601.264 casos em toda região Amazônica, registrando aumento de 30% em relação a 2004. No estado do Amazonas foram relatados 221.233 casos, um aumento de 48% do total de casos de 2004. Manaus contribuiu com 80.009 dos casos, aproximadamente 36% do total dos casos de todo o estado. O atendimento na cidade de Manaus é descentralizado, contando com o serviço de 106 postos de atendimento, sendo a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) o centro de referência de assistência ao paciente de malária e responsável por cerca de 25% dos atendimentos de pacientes de Manaus.

Nos seis primeiros meses de 2006 houve uma redução no número de casos de malária em relação ao mesmo período de 2005. Em todo o Brasil foram diagnosticados 230.103 casos de malária (18% de redução). O estado do Amazonas contribuiu com 69.325 desses casos (redução de 35%) e os 17.220 casos relatados em Manaus (43% de redução) representaram 25% de todos os casos do Estado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Apesar dos expressivos resultados obtidos com as ações de controle, os mesmos não têm sido suficientes para interromper a transmissão da doença na Região Amazônica devido, principalmente às condições climáticas, ao padrão de ocupação territorial, às características das habitações e ao grau de desenvolvimento socioeconômico da população. Os principais obstáculos que dificultam as operações de combate e controle da doença têm sido a grande extensão territorial, com regiões de difícil acesso, intenso processo migratório de grupos populacionais não-imunes e habitações rudimentares (projetos agropecuários, colonização e mineração). A questão do clima é fator favorável à proliferação do mosquito, vetor da doença (ALECRIM, 1981; ALECRIM et al., 1999; ALVES et al., 2002; DEANE, 1985; FMT-AM, 2000; MARQUES;GUTIERREZ, 1994).

1.3 Ciclo Biológico do *Plasmodium*

O ciclo biológico do *Plasmodium* é metaxênico, do tipo assexuado no hospedeiro vertebrado (homem) e sexuado no hospedeiro invertebrado (fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*), conforme demonstrado na figura 3. O ciclo sexuado inicia-se quando a fêmea do vetor alimenta-se de sangue infectado com gametócitos machos (micro) e fêmeas (macro). Os macro e microgametas, uma vez diferenciados, iniciam o processo de fertilização, produzindo um zigoto e posteriormente uma forma invasiva, o oocineto, que pode movimentar-se e migrar para a parede do estômago do mosquito, transformando-se em oocisto. Este se diferencia e sofre divisões mitóticas (esporogonia) produzindo milhares de esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito.

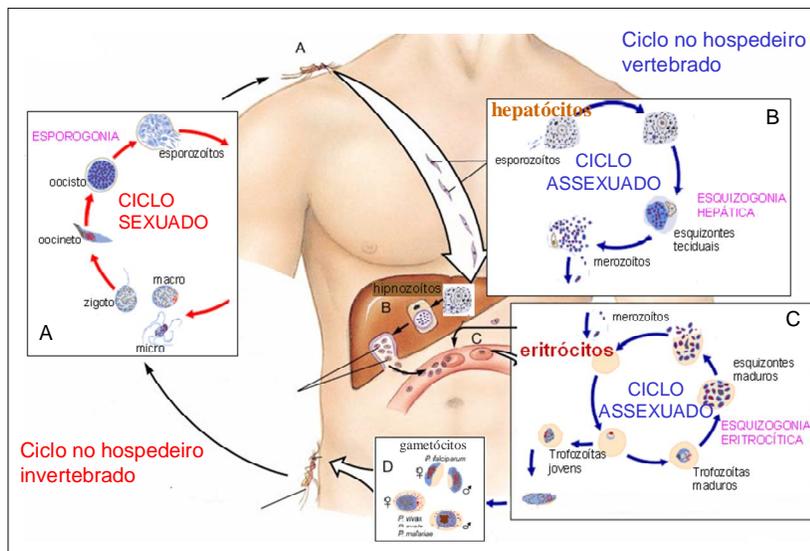


Figura 3: Ciclo biológico do *Plasmodium* sp.

Fonte: Adaptado de Center for Diseases Control and Prevention (2004).

No momento do novo repasto sanguíneo ocorre a inoculação dos esporozoítos no sangue do hospedeiro vertebrado. Uma vez inoculados, os esporozoítos deixam rapidamente o

tecido subcutâneo e caem na corrente sanguínea seguindo diretamente para o fígado. Estas formas desaparecem da circulação sanguínea num período de 30 minutos (FERREIRA, 2004; SHERMAN, 1998).

O desenvolvimento parasitário nas células do fígado requer aproximadamente uma semana para o *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Dentro dos hepatócitos, por um processo assexuado de divisão celular (esquizogonia tecidual), os parasitas se diferenciam em esquizontes teciduais, os quais rompem os hepatócitos quando maduros, liberando milhares de merozoítos na circulação sanguínea, iniciando-se o ciclo eritrocítico. O *P. vivax* tem mais afinidade por moléculas presentes na superfície dos reticulócitos sanguíneos. Em infecções causadas por esta espécie parasitária, alguns dos parasitas podem permanecer em estado de latência no hepatócito por meses ou anos e são denominados hipnozoítos. Estas formas são responsáveis por recaídas tardias de malária vivax (FUNASA, 2001; KROTOSKI, 1985).

Durante o ciclo eritrocítico, os merozoítos invadem as hemácias e diferenciam-se em trofozoítos jovens. A invasão depende da interação entre moléculas presentes na membrana do parasito e receptores específicos na superfície do eritrócito. Após a maturação dos trofozoítos, estes passam por esquizogonia eritrocítica, formando esquizontes maduros que acabam por romper as células infectadas e liberam no sangue novos merozoítos capazes de infectar outras hemácias (FERREIRA, 2004).

A periodicidade da esquizogonia sanguínea é variável de acordo com a espécie de plasmódio. Para o *P. vivax* e *P. falciparum* são necessárias 48 horas. Nessa parte do ciclo é que os sintomas da doença geralmente aparecem. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos, em vez de trofozoítos jovens, diferenciam-se em gametócitos machos e fêmeas, que amadurecem e tornam-se as formas infectantes ao mosquito. Esse processo de maturação sexual é chamado de gametocitogênese, e nos plasmódios ainda não está totalmente esclarecido (NEVES, 1998; TALMAN et al., 2004).

1.3.1 *Plasmodium* - Características espécie-específica

A infecção por *P. vivax* acarreta em evolução clínica predominantemente menos grave, raramente é letal, denominada febre terçã benigna (NEVES, 1998). A malária causada por *P. vivax* é responsável por 70-80 milhões de casos por ano em todo mundo. Em alguns locais endêmicos como o Brasil, a porcentagem dos casos causados por este parasita é aproximadamente 80%. Contudo, as infecções por essa espécie apresentam crescente importância como causa de morbidade e de perdas socioeconômicas nas localidades onde a transmissão se mantém de forma endêmica (MENDIS et al., 2001).

As infecções causadas pelo *P. falciparum* apresentam maior morbidade e mortalidade e, na atualidade, são consideradas como um grave problema de saúde pública em diferentes regiões endêmicas. Apesar de a malária grave ser atribuída principalmente às infecções causadas pelo *P. falciparum*, nos últimos anos casos graves em pacientes com infecção pelo *P. vivax* têm sido observados na Amazônia Brasileira. Estudos realizados pelos pesquisadores da Gerência de Malária da FMTAM evidenciaram o aumento da morbidade das infecções causadas por *P. vivax* (ALECRIM, 1981; ALECRIM et al., 1999; ALECRIM, 2000; ALEXANDRE, 2004; LACERDA et al., 2004; SIMÕES, 2005).

A identificação correta da espécie de parasita causador da malária é de extrema importância para o tratamento da doença. Infecções por *P. falciparum*, por exemplo, causam um tipo mais severo da doença e podem ser letais, necessitando de um tratamento mais cauteloso. Já os *P. vivax* e *P. ovale* apresentam formas que ficam em latência nos hepatócitos, os hipnozoítos, podendo causar recaídas caso o tratamento não seja efetuado de forma correta (HANSCH, 1999).

Para confirmação diagnóstica é importante identificar os tipos de formas parasitárias que se encontram na amostra, saber relacionar a fase do ciclo em que o parasito se encontra

com as informações clínicas do paciente. O achado de gametócitos no sangue do paciente, por exemplo, pode indicar infecções ativas, caso não tenha ocorrido nenhum tipo de tratamento da doença ou infecções persistentes, com indícios de resistência dos parasitas à droga e/ou falha do tratamento por algum outro motivo (HANSCHIED, 1999). O atraso no diagnóstico e no tratamento é decisivo para a disseminação das espécies de plasmódios e manutenção da transmissão da doença.

1.4 Diagnóstico da doença

A forma diagnóstica mais utilizada para pesquisa de parasitas da malária no sangue é a microscopia. O material utilizado nesse exame é o sangue obtido da punção digital. O teste pode ser realizado, de duas maneiras, em lâminas de vidro: na forma de esfregaço sanguíneo ou na forma de gota espessa, corados com Giemsa pela coloração de Walker ou pela coloração de Field's (WARHURST; WILLIAMS, 1996). O exame por meio da gota espessa é usado para detectar a presença dos parasitas no sangue, enquanto o da forma de esfregaço é mais indicado para determinação da morfologia e caracterização da espécie. Aproximadamente cem campos examinados pela gota espessa correspondem a 0,25 μ L de sangue, enquanto que pelo esfregaço correspondem apenas a 0,005 μ L (HANSCHIED, 1999).

Outro teste microscópico para diagnóstico da malária é realizado utilizando fluorescência com afinidade para ácidos nucleicos dos parasitas. O QBC (Quantitative Buffy Coat) é um desses testes que visualiza os parasitas em capilares centrifugados. Esse teste é recomendado para triagem em banco de sangue, entretanto, pode também ser usado na rotina laboratorial assistencial. O fluorocromo utilizado nesse teste é o laranja de acridina que embora tenha uma intensa fluorescência, não é específico apenas para os parasitas, pois cora todos os tipos de ácidos nucleicos. Além disso, requer equipamentos específicos como

microscópio de fluorescência e centrifugador de capilar, o que torna seu custo mais elevado do que os testes microscópicos normais de rotina. Esse tipo de exame pode ser realizado rapidamente, todavia, requer profissionais experientes (MOODY, 2002).

Métodos alternativos de diagnósticos para malária por imunocromatografia foram criados na última década, no intuito de melhorar a sensibilidade dos exames laboratoriais. Esses métodos são baseados na captura de anticorpos monoclonais para antígenos parasitários específicos dos plasmódios, com melhor especificidade para a espécie de *P. falciparum* (MURRAY et al., 2003). O Ministério da Saúde está avaliando alguns desses métodos de imunodiagnóstico para que sejam usados no controle da malária em situações especiais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Alguns métodos imunocromatográficos baseiam-se na detecção de anticorpos para a proteína rica em histidina II, principalmente quando a infecção é causada pela espécie de *P. falciparum*. Outros métodos detectam anticorpos de isoformas de enzimas lactato desidrogenase (pLDH) que podem ocorrer nas quatro espécies que infectam humanos. Embora alguns desses métodos apresentem sensibilidade melhor que a do diagnóstico microscópico, em alguns casos o mesmo não acontece com a mesma especificidade (ARCANJO, 2004; MOODY, 2002; NDAO et al., 2004).

O diagnóstico molecular para malária começou a ser testado em meados dos anos 80, com hibridização de sondas espécie específica em membrana de nitrocelulose. O gene de escolha para tais testes tem sido o que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal (SSUrRNA) o qual está presente no genoma em multicópias e é conservado nas espécies. Por esses motivos, é altamente sensível para testes moleculares de diagnósticos. O primeiro diagnóstico para malária por meio de hibridização de sondas de oligonucleotídeos para o SSUrRNA foi testado em 1989, possibilitando a detecção das quatro espécies de plasmódio.

Entretanto, esse tipo de análise não é muito indicado pelo fato de usar a radioatividade (BARKER et al., 1986; LANAR et al., 1989).

Outros tipos de diagnósticos moleculares para a malária por meio da amplificação do DNA do parasita vêm demonstrando maior sensibilidade e especificidade em relação aos métodos microscópicos e imunológicos. No entanto, os custos são mais elevados e há a necessidade de uma infra-estrutura apropriada (ALI et al., 2005; HANSCHIED, 1999; HANSCHIED et al., 2002; DI SANTI et al., 2004; FABRE et al., 2004; KIMURA et al., 1995, 1997; LEE et al., 2002; MORASSIN et al., 2002; NDAO et al., 2004; ROUGEMONT et al., 2004; SNOUNOU et al., 1993 a; TIRASOPHON et al., 1994; WHILEY et al., 2004).

1.4.1 Gota espessa

O diagnóstico microscópico por meio da gota espessa continua sendo padrão ouro para detectar a presença dos parasitas no sangue. Essa técnica permite a diferenciação e quantificação das espécies, sendo possível até a observação do estágio de evolução do parasito. Entretanto, seu limite de detecção é baixo, cerca de 50 parasitas/ μ L, com níveis de 98% de acerto na identificação das espécies, além de ser pouco sensível nos casos de algumas infecções mistas, quando se tem baixíssimas parasitemias de uma espécie em relação à outra. A qualificação dos profissionais que realizam o exame é de extrema importância para validade do diagnóstico nesses casos (COLEMAN et al., 2002; WARHURST ; WILLIAMS, 1996).

A distribuição do sangue na gota espessa pode gerar entre quinhentos a oitocentos campos microscópicos, entretanto, a visualização microscópica geralmente não ocorre em toda a extensão da lâmina. Alguns campos em que as células estão uniformemente distribuídas são escolhidos para serem visualizados. Na rotina da FMTAM, pelo menos cem campos uniformes devem ser examinados.

A montagem correta da lâmina para os testes microscópicos é importante para que não haja falha no diagnóstico. A padronização da investigação e da quantificação da parasitemia do plasmódio por meio da gota espessa envolve vários fatores. Alguns exemplos podem ser citados como: a profundidade e distribuição do sangue sobre a lâmina, a qualidade da fixação desse material e o pH dos corantes usados para coloração das lâminas. Outros fatores relacionados à coleta do material, como o uso de alguns anticoagulantes (EDTA e heparina), podem alterar a conformação dos parasitas e com isso levar a erros do diagnóstico. Além disso, falhas na coloração, como tempo incorreto, também podem levar a erros no diagnóstico microscópico (MILNE et al., 1994; WARHURST; WILLIAMS, 1996).

O tempo utilizado no diagnóstico de malária por microscopia, em cada exame, é muito importante. Coleman e colaboradores (2002) realizaram um estudo com 585 indivíduos para avaliar os resultados obtidos pelos microscopistas no diagnóstico para malária de duas formas: durante cinco minutos por três microscopistas diferentes e durante vinte minutos por um microscopista com mais de 25 anos de experiência. A acurácia dos testes variou de acordo com a parasitemia.

Os principais fatores que podem levar a erro no diagnóstico pela microscopia são: a baixa prevalência de parasitas na amostra, equipamentos inadequados, pouco tempo para avaliação das lâminas, somados à falta de experiência do profissional que realiza o exame e a falha na montagem da lâmina e/ou falha na coloração.

Em países endêmicos em desenvolvimento, como o Brasil, o diagnóstico para malária é realizado principalmente pela técnica microscópica da gota espessa. Entretanto, outros tipos de diagnóstico vêm sendo testados para otimizar o tempo dos exames e garantir a qualidade dos resultados. Esses novos métodos contribuem para melhorar dados epidemiológicos detectando casos assintomáticos e/ou infecção com baixa prevalência de parasitas. Na gerência de malária da FMTAM foi realizado um estudo comparativo para o diagnóstico de

malária entre os métodos da gota espessa x PCR, quando foram analisadas 344 amostras com 35,7% de positividade pelo exame da Gota Espessa e 68,3% pela PCR, demonstrando a maior sensibilidade da técnica molecular (MANSO, 2004).

1.4.2 Detecção molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta molecular desenvolvida por Kary Mullis (1979), que consiste em uma reação de síntese de regiões específicas de DNA em ciclos repetidos de temperatura, onde a cada ciclo o número de fragmentos amplificados é duplicado, e, conseqüentemente, ao final de aproximadamente 30 ciclos a molécula inicial do DNA é amplificada bilhões de vezes. Por apresentar alta sensibilidade e especificidade para amplificar seqüências específicas de nucleotídeos das espécies, essa técnica vem sendo indicada para diagnóstico molecular de doenças infecciosas (ROSSETTI, 2006).

Desde 1993 que a técnica de PCR vem sendo utilizada em pesquisas de diagnóstico para malária. Essa técnica foi aprimorada para criação de um método de diagnóstico capaz de diferenciar as quatro espécies através de duas reações seqüenciais de amplificação da seqüência do gene para subunidade menor do RNA ribossomal, conhecida como nested-PCR (aninhada), onde a primeira reação amplifica um segmento correspondente ao gênero *Plasmodium* e o seu *amplicom* é posteriormente usado como molde para uma segunda amplificação, específica para cada espécie (SNOUNOU et al., 1993 a, b).

Em experimentos para comparar o diagnóstico molecular de malária por nested-PCR com a técnica microscópica da gota espessa, amostras infectadas com um único parasita por μ l de sangue foram amplificadas e demonstraram grande sensibilidade do método para detectar parasitas da malária. Os autores observaram que amostras de sangue examinadas através da gota espessa detectaram apenas monoinfecções pelos plasmódios, já pela técnica de

diagnóstico por nested-PCR foram encontradas infecções mistas (TIRASOPHON et al., 1994).

Existe um polimorfismo no gene SSUrRNA para as quatro espécies de plasmódios, onde variações inter e intra-espécies podem ser observadas através da técnica de seqüenciamento. Em 1997, uma nova maneira de se realizar a técnica de nested-PCR foi desenvolvida incorporando quatro tipos de *primers* (iniciadores da reação) para a região 3' da seqüência de DNA a ser amplificada e isso possibilitou a identificação das variantes de uma mesma espécie. Esse novo tipo de diagnóstico detectou as variantes de *P. ovale* e *P. malariae* que não haviam sido detectados pelo método de hibridização (KIMURA et al., 1997).

Um estudo em vilarejos da África comparou resultados do diagnóstico para malária por microscopia convencional com resultados por PCR do tipo multiplex, que amplifica regiões de DNA de espécies diferentes de plasmódios no mesmo tubo e ao mesmo tempo. Esse trabalho demonstrou que a capacidade de detecção de amostras mistas continuava sendo melhor por esse tipo de PCR do que pela microscopia. Nesse estudo foram detectadas 11 infecções mistas pela gota espessa, enquanto que pela PCR foram detectadas 44 infecções mistas (RUBIO et al., 1999).

O uso da nested-PCR na rotina de diagnóstico para malária importada foi avaliado por Morassin e colaboradores (2002), em um centro hospitalar da França, durante o período de um ano. Foram avaliados 529 pacientes e os resultados demonstraram que a sensibilidade do teste foi boa, com 32 amostras positivas que tinham sido negativas para o teste do QBC, considerado mais sensível que o diagnóstico microscópico da gota espessa. Entretanto, o tempo para a realização do exame foi demorado (cerca de seis horas). Apesar da eficiência do diagnóstico molecular, os autores concluíram que esse tipo de teste é o mais indicado apenas como uma segunda linha de diagnóstico, em casos onde haja dificuldade de identificação da

espécie, ou quando o diagnóstico microscópico é negativo, mas com indícios clínicos da doença.

Ali e colaboradores, em 2005, conduziram um estudo no qual compararam a microscopia, a imunocromatografia e a nested-PCR para avaliar qual seria o melhor método de diagnóstico de malária para triagem de doadores para bancos de sangue. A PCR demonstrou ser a técnica mais sensível e específica e por isso seria o método mais indicado para diagnóstico de malária em bancos de sangue.

O custo do diagnóstico de malária por nested-PCR é elevado e necessita de uma infraestrutura apropriada, que torna esse método inapropriado para o diagnóstico de rotina. Entretanto, em áreas endêmicas esse teste é apropriado para avaliar a qualidade do diagnóstico da gota espessa, sendo indicado, principalmente, para centros de referências de pesquisa da doença, assim como em bancos de sangue, unidades de transplantes e no caso de infecção nosocomial (DI SANTI et al., 2004).

Contudo, o diagnóstico molecular pela nested-PCR tem contribuído imensamente para os estudos epidemiológicos de malária, sendo complementar à microscopia. Com esse exame é possível determinar uma incidência mais exata da doença, principalmente dos casos especiais de malária assintomática, pela presença de baixa parasitemia (AL SEROURI et al., 2000), assim como a identificação de infecções mistas, nas quais as espécies se encontram em proporções discrepantes e apenas uma é visualizada na microscopia. Em 2003, na Tailândia, um estudo foi realizado para avaliar a utilização da nested-PCR, o qual demonstrou que essa técnica supera a microscopia na detecção da presença de infecções mistas e, por isso, é a mais indicada nos estudos epidemiológicos e para avaliação do tratamento (SIRIBAL et al., 2004).

O diagnóstico molecular para malária vem se aperfeiçoando desde 1984, com a utilização de sonda por hibridização. Com o desenvolvimento da PCR, na década de 1980, houve grande avanço nos diagnósticos moleculares de infecções parasitárias, sendo a PCR,

em tempo real, a metodologia mais avançada dos últimos dias. Entretanto, o uso do diagnóstico molecular para malária por PCR em tempo real parece estar restrito a grandes centros de pesquisas (BERRY et al., 2005).

1.4.3 Diagnóstico molecular em tempo real

O diagnóstico molecular de PCR em tempo real é um método que amplifica e visualiza simultaneamente os ácidos nucleicos. Nas pesquisas com *Plasmodium sp*, pode ser usada tanto para diagnóstico quanto para quantificação dos genomas dos parasitas (FABRE et al., 2004; GINOCCHIO, 2004; LEE et al., 2002; ROUGEMONT et al., 2004). Atualmente essa técnica vem sendo utilizada para avaliação do uso de vacinas, medindo-se os estágios de vida do parasita nas diferentes fases do ciclo evolutivo e os níveis de expressão gênica (ANDREWS et al., 2005). Também pode ser usada para detecção de mutações, avaliação do perfil gênico e monitoramento de resistência dos parasitas aos antimaláricos (FARCAS et al., 2006; WILSON et al., 2005).

Os equipamentos de PCR em tempo real foram desenvolvidos com tecnologias adaptáveis às necessidades de cada tipo de estudo. As vantagens desses aparelhos estão diretamente relacionadas com o fato de dispensar manipulações com a amostra após a amplificação, tornando a técnica mais confiável e com menor risco de contaminação quando comparada a uma PCR convencional, cuja visualização do resultado é através de gel de agarose corado com brometo de etídeo (BELL; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; FABRE et al., 2004; ROUGEMONT et al., 2004).

Durante a realização desse tipo de PCR há um contínuo monitoramento da amplificação do DNA ao longo da reação. Isso acontece porque se usa a fluorescência para marcar o DNA (figura 4), que é colocada junto com os reagentes da reação, permitindo observar os *amplicons* gerados em tempo real. O sistema de detecção do equipamento analisa

e transfere os resultados da amplificação para um software na forma de curvas, possibilitando a análise da amplificação ao mesmo tempo em que ela está ocorrendo, de forma a disponibilizar os resultados mais rapidamente.

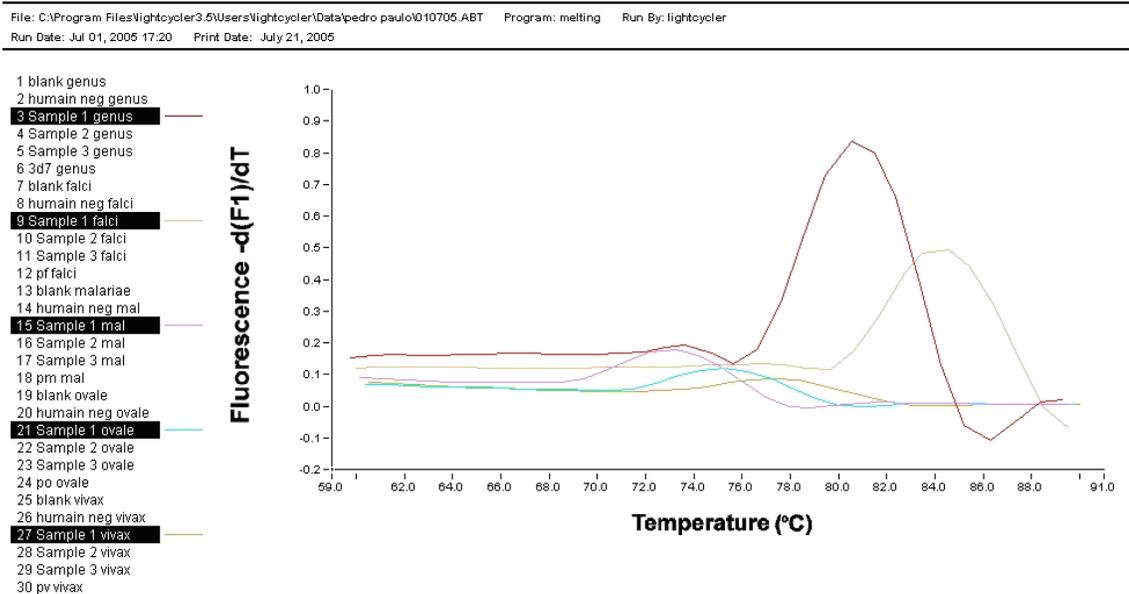


Figura 4: Gráfico da detecção (por fluorescência) de uma monoinfecção por *Plasmodium falciparum* em um aparelho de PCR em tempo real.

O uso da fluorescência na reação pode ocorrer de duas formas:

a) Usando um intercalante do DNA para fitas duplas, conhecido como SYBR[®] Green I (utilizado na reação da figura 4);

b) Usando sondas de detecção específicas para uma sequência, conhecidas comercialmente como sistema TaqMan[®], que permitem a detecção e quantificação de várias amostras ao mesmo tempo (multiplex) pela possibilidade de utilizarem sondas diferentes.

Existem vantagens e desvantagens em ambas as formas de se usar a fluorescência. O SYBR[®] Green I apresenta um custo mais baixo, porém, apresenta limitações quanto à especificidade da amplificação e, pelo fato de os intercalantes se ligarem a qualquer tipo de

DNA, não podem ser realizadas reações do tipo multiplex. Esse tipo de problema pode ser contornado fazendo-se uma boa otimização das condições da reação e escolhendo *primers* que não formem dímeros (BELL; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002).

Já o sistema TaqMan[®] permite ser realizadas reações do tipo multiplex, uma vez que, sua especificidade é determinada pela seqüência da sonda, porém, apresenta um custo mais elevado. Esse sistema utiliza a atividade exonucleásica 5'3' da DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação do DNA para liberar a fluorescência da sonda durante a reação (BELL ; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; KATAKAI et al., 2004; ROUGEMONT et al., 2004).

O método de diagnóstico para malária usando PCR em tempo real, baseada na tecnologia da TaqMan[®], com primers para SSUrRNA, demonstrou progresso no monitoramento de tratamentos anti-maláricos quando comparado à técnica microscópica. Ambos os testes podem ser usados para esse tipo de pesquisa, todavia, a sensibilidade desse método de PCR em tempo real foi maior (2×10^4 até 0,17 parasitas por μL), sendo, portanto, mais eficaz, especialmente em situações onde há indícios de resistência dos parasitas aos medicamentos (LEE et al., 2002). O avanço de automação pode ajudar na rotina de diagnóstico, sendo mais vantajoso para o acompanhamento do tratamento aos finais de semana e durante a noite, por diminuir gastos com a equipe de microscopistas (ROUGEMONT et al., 2004).

Um diagnóstico mais específico por meio de um multiplex quantitativo de PCR em tempo real foi desenvolvido com o intuito de resolver o problema da identificação e diferenciação das quatro espécies de *Plasmodium sp* em um mesmo experimento (ROUGEMONT et al., 2004). Nesse teste, a detecção da espécie ocorre em apenas três horas, sendo, portanto mais rápido que a nested PCR. Entretanto, por apresentar um elevado custo, esse tipo de teste não é indicado como primeira linha de diagnóstico, sendo indicado apenas

em casos com alta suspeitas para malária e com teste microscópicos negativos, por haver baixas parasitemias ou quando a identificação da espécie é difícil por haver alterações morfológicas inespecíficas.

Uma comparação da PCR em tempo real (SYBR Green I) para diagnóstico da malária com o PCR convencional foi realizada em 2004. Nesse caso, os primers utilizados para a identificação da espécie de *P. falciparum* eram semelhantes aos do gênero, por isso foi necessário a realização de duas reações sequenciais para diferenciação das espécies. A sensibilidade dos dois métodos diagnósticos foi igual, entretanto, o tempo gasto para o diagnóstico por PCR em tempo real foi menor (duas horas) e eliminava o risco de contaminação por haver menos manipulação das amostras. A técnica de PCR em tempo real também demonstrou ser mais sensível que os métodos ópticos e mais específicos que os métodos imunológicos (FABRE et al., 2004).

Com base nos experimentos de Monbrison e colaboradores (2003), que também utilizaram SYBR Green I na reação de PCR em tempo real para diagnóstico da malária, observou-se a existência de vantagens da reação de PCR em tempo real com relação a nested-PCR. O tempo gasto nesse caso foi de aproximadamente uma hora, enquanto que na reação de nested-PCR foram gastas cerca de oito horas. A sensibilidade encontrada também foi alta variando de 3 até 30 parasitas/ μL , enquanto que na nested-PCR foi de aproximadamente 10 parasitas/ μL (SNOUNOU et al., 1993b). Além disso, ainda existe menor risco de contaminações porque a amostra é manipulada uma única vez, enquanto que na nested-PCR são três manipulações.

1.5 Diagnóstico molecular - aplicação epidemiológica

Uma das estratégias para o controle da malária é a identificação rápida e precisa da infecção, que conseqüentemente pode levar a um tratamento mais apropriado e, quando realizado de forma correta, há uma diminuição do risco de transmissão da doença. Por esse motivo há muitas tentativas de se achar um método de diagnóstico que seja apropriado às condições específicas de cada local e modelo de estudo (ARCANJO, 2004; DI SANTI et al., 2004; MANSO, 2004).

Os primeiros dias da infecção por *Plasmodium* não costumam ser detectados pelos métodos convencionais de diagnóstico, visto que nesta fase o desenvolvimento dos parasitas ocorre no fígado. Além disso, o início do ciclo eritrocítico apresenta-se de forma assintomática (figura 5). Sendo assim, o provável paciente de malária só procura os serviços de saúde quando a doença se manifesta, ou seja, em sua fase sintomática. Nessa fase sintomática, o diagnóstico mais apropriado é o microscópico, com visualização dos parasitas existentes na circulação sanguínea. Por se tratar de um método barato e capaz de diferenciação das espécies visualmente, o teste microscópico da gota espessa é considerado o padrão-ouro para malária.

Por outro lado, existem outros métodos que têm se mostrado mais sensíveis, principalmente na detecção dos parasitas na fase assintomática da infecção, como os métodos imunológicos (paciente com imunidade) (ARCANJO, 2004) e moleculares (ALI, et al., 2005). A figura cinco mostra que a área de detecção do *Plasmodium* por essas suas metodologias é maior que a área de detecção pela microscopia, sendo mais sensíveis e, portanto, mais eficazes para estudos epidemiológicos.

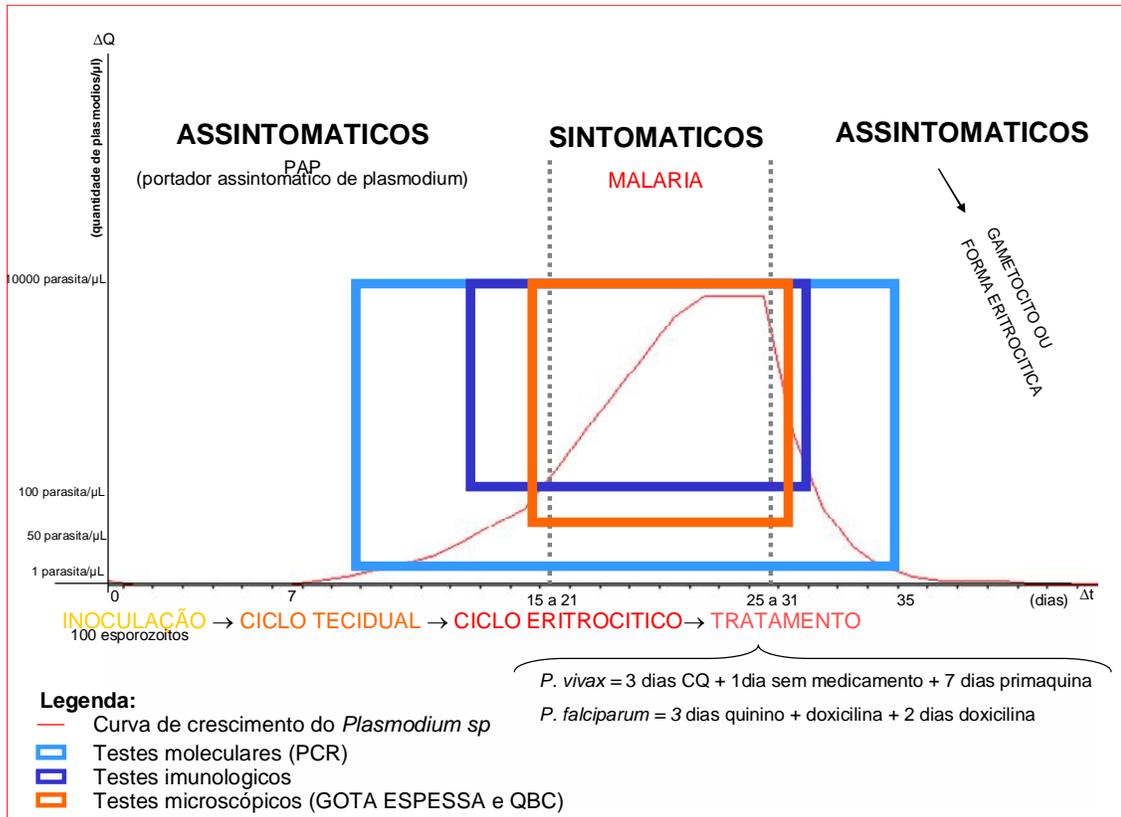


Figura 5: Gráfico da área de detecção da infecção por Plasmodio pelos testes mais utilizados no diagnóstico da malária.

A fase sintomática da doença pode ser adiada por tempo variado e só se tornar sintomática depois de muito tempo (AL SOROURI, et al., 2000). A fase assintomática da infecção foi medida em pacientes residentes em uma área endêmica com amostras colhidas com frequência de intervalo de três até 61 dias para cada paciente. Para o *P. falciparum* o período de replicação da espécie no estudo todo foi em média de 27 dias, sendo que a média de duração para crianças de quatro anos foi maior que 48 dias, e para crianças mais velhas e adultos a média ficou entre nove e quinze dias (o que é considerado padrão), demonstrando que o tempo necessário para entrar na fase sintomática depende da aquisição da imunidade individual de cada paciente. Esse trabalho também sugeriu que a imunidade é mais rápida para *P. vivax* do que para *P. falciparum* (BRUCE et al., 2000).

Além disso, o indivíduo pode permanecer infectado e nunca apresentar a sintomatologia da doença, sendo chamado de Portador Assintomático de Plasmódio (PAP) (BRUCE et al., 2000; NSOBYA et al., 2004; SEROURI et al., 2000). A alta prevalência de PAP na região Amazônica foi evidenciada, demonstrando que mudanças nas medidas de controle da doença nessa região devem ser tomadas (FABIANA et al., 2002).

Nesses casos de malária assintomática, a PCR tem demonstrado ser o melhor método de diagnóstico para detectar os parasitas, sendo cerca de três vezes mais eficiente, inclusive na identificação das infecções mistas, e capaz de diferenciar todas as espécies. As infecções assintomáticas, depois de vinte semanas, demonstram grande risco de se tornarem malária sintomática (NSOBYA et al., 2004).

Como foi demonstrado, vários fatores são responsáveis pela continuidade da transmissão da doença em área endêmica, por exemplo: atraso no diagnóstico e no tratamento da malária, o qual deve ser diferenciado de acordo com a espécie de parasita; falta de tratamento adequado; existência de pessoas que são portadores assintomáticos de Plasmódio (PAP). Sendo assim, novas medidas de controle devem ser adotadas em regiões endêmicas, como o Amazonas, para que a transmissão da malária diminua.

Os diagnósticos moleculares para a malária vêm demonstrando ser mais sensíveis e específicos em relação aos métodos microscópicos e imunológicos (HANSCHIED, 1999; HANSCHIED et al., 2002; KIMURA et al., 1997; MORASSIN et al., 2002; SNOUNOU et al., 1993 b; TIRASOPHON et al., 1994). Por esse motivo, a análise da utilização desse diagnóstico para finalidades epidemiológicas poderá contribuir com a formulação de novas medidas de controle da doença, envolvendo o uso desse diagnóstico na fase assintomática da infecção, principalmente em regiões endêmicas como o Amazonas.

Testes moleculares de diagnóstico por PCR em tempo real para malária demonstram maior rapidez e eficiência em relação a nested-PCR (ALI et al., 2005; DI SANTI et al., 2004

FABRE et al., 2004; LEE et al., 2002; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; NDAO et al., 2004; ROUGEMONT et al., 2004; WHILEY et al., 2004). Esses testes ainda não haviam sido testados em amostras de campo na região Amazônica e, por isso, a proposta deste trabalho é principalmente indicar algumas finalidades para os métodos avançados de diagnóstico molecular em malária.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar molecularmente a malária pelos métodos de nested-PCR e PCR em tempo real, enfocando sua utilização epidemiológica.

2.2 Específicos

2.2.1 Fazer o diagnóstico molecular de amostras de sangue criopreservado.

2.2.2 Comparar resultados de diagnósticos para malária através das técnicas de PCR em tempo real, Nested-PCR e Gota espessa.

2.2.3 Verificar a concordância dos testes moleculares e microscópicos, tendo como referência a gota espessa.

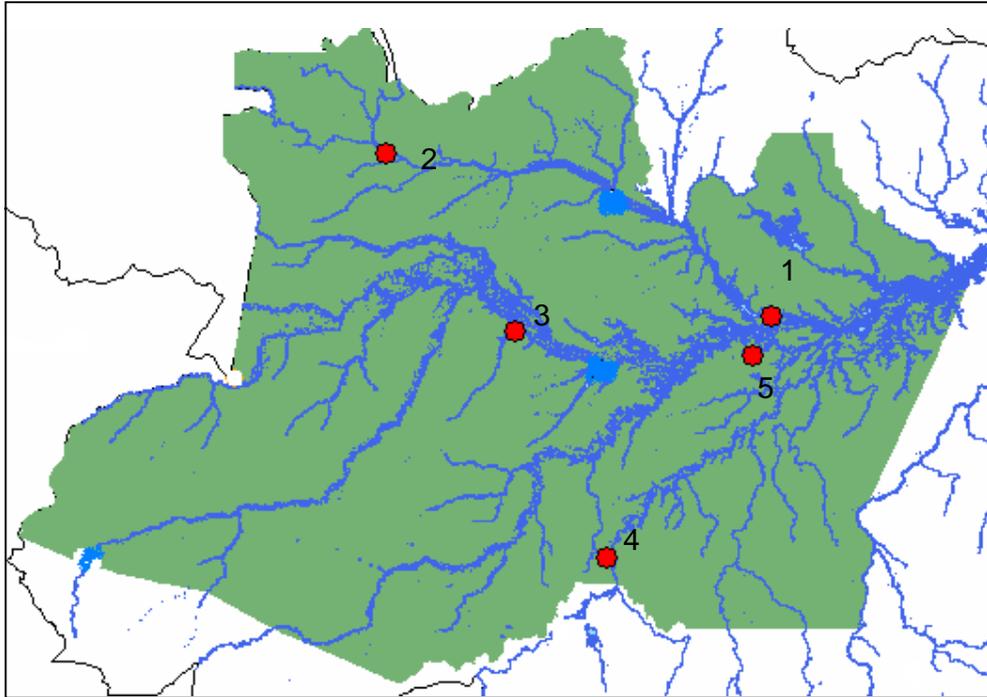
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem e Localidades

As amostras de sangue utilizadas neste projeto estavam criopreservadas, catalogadas e mantidas em um banco de patógenos na gerência de malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) e fazem parte dos projetos: “Caracterização molecular e fenotípica de isolados de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* de localidades endêmicas do Estado do Amazonas” e “Estudo sobre a metemoglobinemia e deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em pacientes com malária tratados com primaquina”.

Essas amostras foram coletadas após a assinatura dos termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos 1 e 2). A coleta de sangue dos pacientes foi por via endovenosa em tubo com o anticoagulante etileno diamino tetracético (EDTA). Após a retirada do sangue infectado, o mesmo foi centrifugado a 800g/10min, para retirada do plasma e do creme leucocitário. Todo o procedimento foi realizado de forma asséptica, em câmara de fluxo laminar. A papa de hemácias foi aliquotada em volumes de 500µl e, quando necessário, adicionados 500µl de solução criopreservadora (Glicerolaty). Essas amostras foram armazenadas em freezer -70°C para subseqüentes análises moleculares (VIEIRA et al, 2001).

Selecionaram-se 200 amostras de sangue de pacientes do banco de amostras criopreservada, com diagnóstico pela técnica microscópica da gota espessa no dia do início do tratamento (D0). Sendo no total, 176 amostras de Manaus; nove de São Gabriel da Cachoeira; quatro de Humaitá; oito de Tefé e três de Careiro. O diagnóstico molecular por nested-PCR foi então realizado para confirmação dos resultados obtidos pela técnica microscópica da gota espessa (Anexo 3), realizados pelos técnicos da FMTAM e dos postos da FUNASA, espalhados pelo interior do Amazonas (Figura 6).



Legenda: 1-Manaus (10 amostras); 2- São Gabriel da Cachoeira (9 amostras); 3- Tefé (8 amostras); 4- Humaitá (4 amostras); 5- Careiro Várzea (3 amostras)

Figura 6: Locais de coleta das amostras de sangue criopreservado.

Foram selecionadas também 100 amostras de sangue de pacientes em tratamento para malária vivax não-grave, tratadas no esquema terapêutico adotado pela FMTAM (Anexo 4). A coleta do sangue para o diagnóstico molecular dessas amostras foi realizada no sétimo dia de tratamento (D7).

3.2 Diagnóstico molecular da doença

Para realização do diagnóstico molecular, foi necessária previamente a extração do DNA dos plasmódios das amostras de sangue criopreservadas. O diagnóstico molecular por nested-PCR para a malária foi realizado nas 200 amostras e o resultado foi analisado em dois grupos distintos (amostras coletadas no D0 e amostras coletadas no D7). Primeiramente foi

realizado o diagnóstico molecular das 200 amostras coletas no D0. Em 34 das 200 amostras foi realizado, além do diagnóstico por nested-PCR, outra técnica alternativa de diagnóstico molecular por PCR em tempo real. Posteriormente foram analisados os resultados dos testes moleculares de diagnóstico realizados nas amostras coletadas durante o tratamento (D7).

3.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA plasmodial foi realizada a partir de alíquotas de hemácias infectadas e criopreservadas, conforme protocolos padronizados pelo laboratório de malária da FMTAM. A realização da extração do DNA foi realizada tanto da papa de hemácia armazenada diretamente nos criotubos (armazenadas em freezer -70°C), com o uso de kits de extração comercialmente disponíveis (QIAamp mini-kits e UltraClean - MO BIO Laboratories)(ANEXO 5), como do sangue infectado armazenado em papel de filtro, baseado na utilização da resina Chelex[®]-100 (Bio Rad) a 10% (ANEXO 6).

3.2.2 Nested-PCR

Após a extração do DNA, foi realizada uma técnica de reação em cadeia da polimerase aninhado (Nested-PCR), para identificação de possíveis infecções mistas não detectadas pelo diagnóstico parasitológico da gota espessa. A técnica consiste na utilização de oligonucleotídeos iniciadores que reconhecem o gene codificante da sub-unidade menor do RNA ribossomal (ssrRNA) do *Plasmodium* (SNOUNOU et al., 1993 a, b).

A reação primária amplifica seqüências gênero-específicas utilizando os primers PLU5 (5' CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3') e PLU6 (5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAA 3'), com amplicoms de 1200pb. Os volumes dos reagentes usados para um volume de reação de 50 μL são: 29,1 μL de água miliQ; 5 μL de tampão (PCR buffer 10X); 3,6 μL de MgCl_2 (50 mM) ; 1 μL de dNTPs (2,5 μM) e 1 μL de

cada primer (PLU5 e PLU6) na concentração de 10 µM e 0,3 µL de *Taq* polimerase (5U). A reação primária foi conduzida nas seguintes condições de termociclagem: 95°C por 5 minutos para desnaturação, seguido por 29 ciclos (55°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos, 94°C por 1 minuto) e extensão final 72°C por 5 minutos.

Na reação secundária são utilizados simultaneamente iniciadores que reconhecem seqüências nucleotídicas espécie-específicas do *P. falciparum*, FAL1 (5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3') e FAL2 (5' ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC 3') com amplicons de 205 pb; e do *P. vivax*, VIV1 (5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3') e VIV2 (5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3') com amplicons de 120 pb. Os volumes dos reagentes usados para um volume de reação de 20 µL em cada teste, tanto para *P. vivax*, quanto para *P. falciparum*, são: 7,9 µL de água miliQ®; 2 µL de tampão (PCR buffer 10X); 0,8 µL de MgCl₂ (50mM); 1µL de dNTPs (2,5 µM) e 3 µL de cada primer (VIV1 e VIV2 ou FAL1 e FAL2) na concentração de 10 µM e 0,3 µL de *Taq* polimerase (5U). A reação secundária foi realizada nas mesmas condições de termociclagem da primária.

A observação do resultado da amplificação foi realizada pela visualização das bandas correspondentes aos produtos de PCR em transiluminador ultravioleta após eletroforese (80V) dos mesmos em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 µg/µL).

3.2.3 PCR em tempo real

O diagnóstico molecular por PCR em tempo real foi realizado no Laboratório de Parasitologia da Universidade Claude Bernard Lyon I, na França. As amostras de sangue foram transportadas em papel de filtro.

A reação de amplificação em tempo real foi realizada no LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), usando o SYBR Green I como corante fluorescente da reação. Para cada reação foi usado o DNA de humano como controle negativo, o DNA de amostras em cultivo (3d7 para controle de *P. falciparum*) ou o DNA de uma amostra conhecida (no caso de *P. vivax*), foram utilizados como controles positivos.

Para cada reação o volume final foi de 20 µL, sendo que os volumes de reagentes eram diferentes. Na reação de amplificação do gênero *Plasmodium* foi usado 5 µL de DNA, 8,6 µL de água, 2,4 µL MgCl₂, 1µL de cada primer e 2 µL de master (tampão de reação, enzima FastStar Tad DNA pol, dNTPs, MgCl₂). Para a reação das espécies: *P. falciparum*- 5 µL de DNA, 9,8 µL de água, 2,4 µL MgCl₂, 0,4 µL de cada primer e 2 µL de master; *P. vivax*:- 5 µL de DNA, 9 µL de água, 2,4 µL MgCl₂, 0,8 µL de cada primer e 2 µL de master.

Os primers utilizados para a reação do PCR em tempo real foram: Psp1 5' AGT TAC GAT TAA TAG GAG TAG 3' e Psp2 5' CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT 3' para amplificar as sequências gênero-específicas do *Plasmodium sp* (CICERON et al., 1999). Os primers para as regiões espécie-específicas foram: PfaIF 5'AGT GTG TAT CAA TCG AGT TTC 3' e PfaIR 5'AGT TCC CCT AGA ATA GTT ACA 3' para *P. falciparum* ; Pv1 5'CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC 3' e Pv2 5'ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TAA 3' para *P. vivax*; Pm1 5'ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC 3' e Pm2 5'AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA 3' para *P. malariae* (SNOUNOU et al., 1993b e RUBIO et al., 1999).

A programação no LightCycler foi realizada em quatro etapas. A primeira etapa com apenas 1 ciclo a temperatura de 95°C por 10 minutos para uma pré-incubação da amostra. A segunda etapa correspondeu a amplificação do DNA com 35 ciclos em 3 diferentes temperaturas. Para a desnaturação de cada ciclo foi usada a temperatura de 95°C, com tempo de incubação de 10 segundos. Para o anelamento a temperatura foi de 58°C e tempo de

incubação de 10 segundos. E para a extensão foi usada a temperatura de 72°C, tempo de incubação de 30 segundos, sendo a fluorescência medida no final da amplificação para cada amostra de forma individual.

A terceira etapa corresponde à confirmação da amplificação correta do produto de PCR, através da curva de dissociação (Melting Curve), com apenas 1 ciclo em 3 temperaturas diferentes. Começando com 95°C com tempo de incubação de 2 minutos. Depois foi usada a temperatura de 55°C e tempo de incubação de 20 segundos. E no final novamente a temperatura de 95°C sem tempo de incubação. A fluorescência foi medida durante toda etapa. A quarta etapa correspondia ao resfriamento das amostras, sendo realizada com apenas um ciclo a temperatura de 35°C e tempo de incubação de 30 segundos, sem medição de fluorescência.

A análise dos resultados do diagnóstico no LightCycler[®] foi realizada através das curvas de dissociação, fornecidas pelo próprio aparelho. Para a quantificação do DNA a análise é realizada com a amplificação dos primers Psp1 e PSp2, por comparação com uma cepa padrão 3D7 de *P. falciparum* cultivada *in vitro*. O ciclo de referência (threshold cycle – Ct), que significa limite onde a fluorescência se torna diferente do sinal inicial é determinado para cada amostra. Quando há amplificação, a quantidade de DNA é calculada a partir da seus Ct, comparado com a curva padrão (MONBRISON et al., 2003).

3.3 Análise Comparativa dos Testes de Diagnósticos

A comparação dos resultados foi realizada nas 34/200 amostras, verificando a co-positividade e co-negatividade dos testes moleculares com a Gota Espessa, considerando a gota espessa como padrão-ouro para o diagnóstico da malária. Para avaliar a concordância dos testes foi usado o coeficiente Kappa (Tabela 1: PERREIRA, 2002).

Tabela 1: Interpretação da concordância dos testes de acordo com os possíveis valores do índice kappa.

Kappa	Concordância
<0,00	Ruim
0,00-0,20	Fraca
0,21-0,40	Sofrível
0,41-0,60	Regular
0,61-0,80	Boa
0,81-0,99	Ótima
1,00	Perfeita

4 RESULTADOS

4.1 Diagnóstico molecular – amostras coletas em D0

Foi realizada a detecção de DNA plasmodial para realização do diagnóstico molecular por nested-PCR nas 200 amostras de sangue parasitado e criopreservado no banco de patógenos da Gerência de Malária da FMTAM. As amostras foram coletadas com finalidade de realização de análises moleculares no D0 (dia em que foi realizado o diagnóstico da gota espessa com resultado positivo para infecção malárica). A figura 7 ilustra o resultado obtido nas amostras coletadas em D0 (Anexo 7).

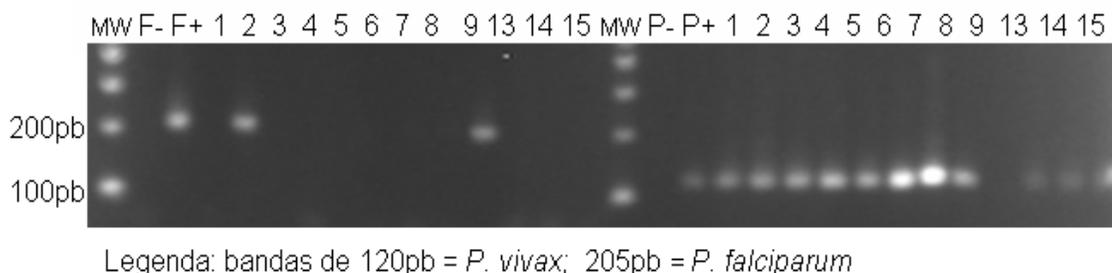


Figura 7: Foto do gel do diagnóstico por nested-PCR em amostras coletadas no D0.

Do total de amostras estudadas, 88% (176/200) são provenientes de pacientes habitantes da cidade de Manaus, e 91% (174/200) apresentaram diagnóstico microscópico de infecção pelo *P. vivax* (Tabela 2).

Após aplicação da metodologia molecular de diagnóstico, foi confirmada a presença do *P. vivax* em 100% (174/174) das amostras diagnosticadas pela gota espessa. Adicionalmente, foram observadas infecções mistas, co-infecção de *P. falciparum* e *P. vivax*, em 17,8% (31/174) destas amostras.

Tabela 2: Diagnóstico Laboratorial das amostras coletadas em D0.

Sítios de Coleta	No. Amostras	Gota espessa			PCR Diagnóstico		
		<i>P. vivax</i> (%)	<i>P. falciparum</i> (%)	I.M. * (%)	<i>P. vivax</i> (%)	<i>P. falciparum</i> (%)	I.M. * (%)
Manaus	176	174 (98,9)	02 (1,1)	0	143(81,1)	02 (1,1)	31 (17,8)
Interior **	24	8 (33,4)	16 (66,6)	0	05 (20,8)	12 (50)	07 (29,2)
Total	200	182 (91)	18 (9)	0	148 (74)	14 (7)	38 (19)

* - Infecções Mistas; ** - São Gabriel da Cachoeira, Tefé, Humaitá e Careiro – AM.

Obs: A proporção entre espécies plasmódios presentes no banco de amostras da FMTAM não representa necessariamente a incidência das mesmas nas diferentes áreas malarígenas do Estado do Amazonas.

As demais 24 amostras incluídas neste estudo (12%), também são integrantes do supracitado criobanco de patógenos da gerência de malária da FMTAM, sendo provenientes de localidades do interior do Estado do Amazonas (como mostrado na figura 5). As mesmas foram obtidas com o apoio da FUNASA e das Secretarias Municipais de Saúde (SEMSA) dos municípios de São Gabriel da Cachoeira (09), Tefé (08), Humaitá (04) e Careiro (03). A figura 8 mostra o percentual de todas as amostras testadas em cada método.

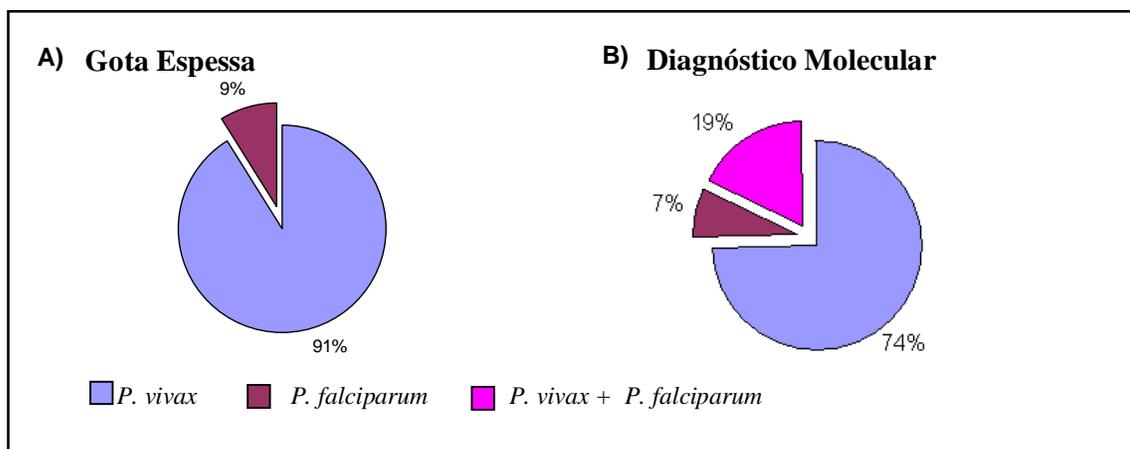


Figura 8: Percentual de detecção laboratorial em duas técnicas de diagnóstico da malária humana.

A comparação entre o resultado do diagnóstico molecular e microscópico mostra claramente que a maior sensibilidade da técnica de amplificação genômica permite a

observação epidemiologicamente significativa de um maior número de infecções mistas (03 em São Gabriel da Cachoeira, 02 em Tefé e 02 em Humaitá).

4.1.1 Técnica alternativa de Diagnóstico Molecular

Adicionalmente aos métodos previamente mencionados, foi realizado o diagnóstico para malária utilizando metodologia descrita por Mombrison (2003), baseada em metodologia de PCR em tempo real (Lightcycler, Roche®) em 17% (34/200) das amostras coletadas no D0. O resultado desses experimentos (ANEXO 8) está demonstrado na tabela 3 e ilustrado na figura 9. Além da avaliação da possível introdução desta metodologia na rotina de pesquisa da Gerência de Malária da FMTAM, realizamos uma comparação e análise da concordância dos resultados dos dois testes moleculares em comparação com a técnica microscópica da gota espessa.

Tabela 3: Sítios de coleta e diagnóstico para malária nas três metodologias

Origem	Nº de amostras	Técnicas de diagnóstico para malária								
		G.E.			nested – PCR			PCR em tempo real		
		<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	<i>I.M.</i>	<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	<i>I.M.</i>	<i>P.f</i>	<i>P.v</i>	<i>I.M.</i>
Manaus	10	02	08	0	02	06	02	02	07	01
Humaitá	04	04	0	0	02	0	02	03	01	0
São Gabriel da Cachoeira	09	03	06	0	03	05	01	06	03	0
Tefé	08	02	06	0	05	01	02	07	01	0
Careiro	03	03	0	0	03	0	0	03	0	0
Total	34	14	20	0	15	12	07	21	12	01

Obs: n = 34, *P.f.* – *Plasmodium falciparum*; *P.v.*- *Plasmodium vivax*; *I.M.*-*Infecção mista*

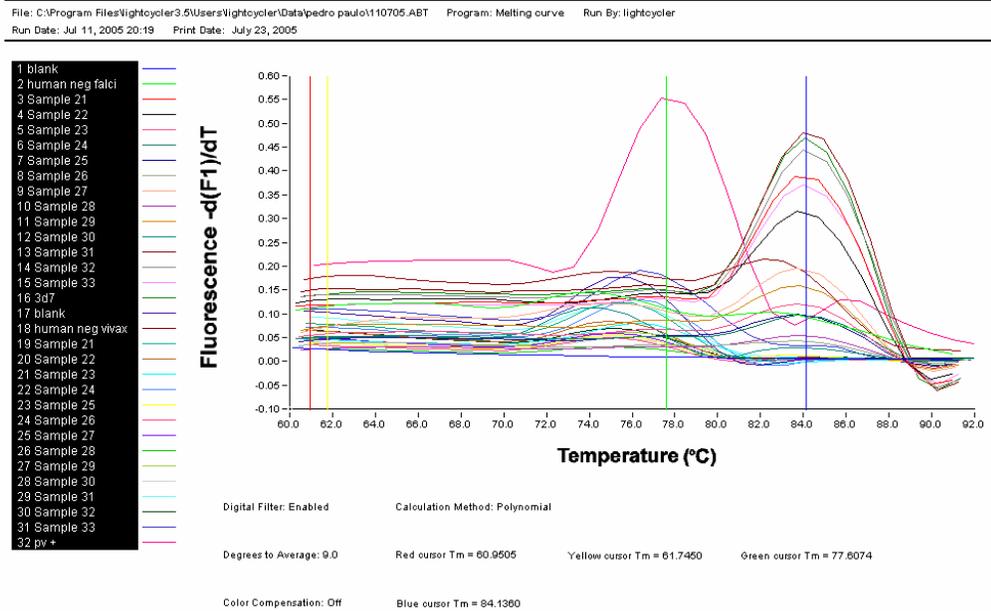


Figura 9: Gráfico do diagnóstico por PCR em tempo real de algumas amostras coletadas no D0.

Tabela 4: Comparação do diagnóstico da malária por PCR em tempo real x Gota Espessa

PCR em tempo real	Gota Espessa		Total
	<i>P. vivax</i> (%)	<i>P. falciparum</i> (%)	
<i>P. vivax</i>	11 (32%)	1(3%)	12 (35%)
<i>P. falciparum</i>	4 (12%)	17 (50%)	21 (62%)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	1 (3%)	0	1 (3%)
Total	16 (47%)	18 (53%)	34 (100%)

A co-positividade (Sensibilidade) desses dois testes para o diagnóstico da infecção causada pelo *P. vivax* foi de 69% enquanto a co-negatividade (Especificidade) foi de 95%. Para o *P. falciparum* a co-positividade (Sensibilidade) dos testes foi de 95% enquanto a co-negatividade (Especificidade) foi de 75%. O índice Kappa encontrado foi de 0,65 sendo regular a concordância entre os testes.

Tabela 5: Comparação do diagnóstico da malária por nested-PCR x gota espessa

Nested-PCR	Gota Espessa		Total
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	
<i>P. vivax</i>	11 (32%)	1 (3%)	12 (35%)
<i>P. falciparum</i>	1 (3%)	14 (42%)	15 (44%)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	4(12%)	3 (8%)	7 (21%)
Total	16 (47%)	18(53%)	34 (100%)

A co-positividade (Sensibilidade) dos testes para *P. vivax* foi de 69% enquanto a co-negatividade (Especificidade) foi de 95%. A co-positividade (Sensibilidade) dos testes para *P. falciparum* foi de 78% enquanto a co-negatividade (Especificidade) foi de 94%. O índice Kappa encontrado foi de 0,56 e a concordância entre os testes foi regular.

Tabela 6: Comparação do diagnóstico da malária por PCR em tempo real x nested-PCR

PCR em tempo real	Nested-PCR			Total
	<i>P. vivax</i> (%)	<i>P. falciparum</i> (%)	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> (%)	
<i>P. vivax</i>	9(27%)	0	3 (8,8%)	12 35%)
<i>P. falciparum</i>	3 (9%)	15 (44%)	3 (8,8%)	21(62%)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	0	0	1 (2,9%)	1 (3%)
Total	12 (36%)	15 (44%)	7 (20%)	34 (100%)

A co-positividade (Sensibilidade) dos testes para *P. vivax* foi de 75% enquanto a co-negatividade (Especificidade) foi de 86%. A co-positividade (Sensibilidade) dos testes para *P. falciparum* foi de 100% enquanto a co-negatividade (Especificidade) foi de 68%. O índice Kappa encontrado foi de 0,56 e a concordância dos dois testes moleculares foi regular.

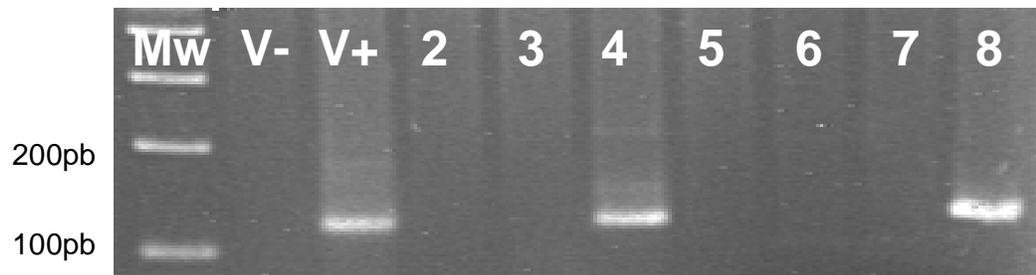
4.2 Diagnóstico molecular – amostras coletas em D7

Para fins de avaliação epidemiológica e da sensibilidade do diagnóstico molecular, incluímos neste estudo a análise feita em 100 amostras de sangue obtidas de pacientes ao longo do tratamento para malária causada pelo *P. vivax*. O processamento dessas amostras para análises moleculares de detecção de DNA plasmodial foi realizado no sétimo dia de tratamento (D7). Como resultados (Anexo 9), foram diagnosticadas positivamente 21% (20/100) das amostras (Tabela 7).

Tabela 7: Diagnóstico molecular positivo em D7.

Amostras	Gota Espessa		Detecção molecular por PCR	
	D0	D7	D7 (<i>P. vivax</i>)	D7 (<i>P. falciparum</i>)
<i>P. vivax</i>	97	0	20	0
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	3	0	0	1
Total	100	0	20	1

A quase totalidade das amostras (97%) apresentaram diagnóstico microscópico para malária como monoinfecção pelo *P. vivax* em D0, com exceção de 3 amostras com possíveis infecções mistas nos testes microscópicos de diagnóstico em D0, nestes casos, a avaliação molecular confirmou a presença de DNA de *P. falciparum* em uma delas.



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*

Figura 10: Foto do gel do diagnóstico por Nested-PCR em amostras coletadas no D7.

5 DISCUSSÃO

No Brasil, a principal técnica de diagnóstico para malária tem sido a microscópica da gota espessa, que é realizada principalmente na fase sintomática da doença (figura 5). O limite de detecção dos parasitas por essa técnica é de 10-20 parasitas por μl , proporcionando um diagnóstico diferencial das espécies, sendo rápido o resultado do diagnóstico uma amostra individualmente. Por esses motivos ela é considerada a mais apropriada para regiões endêmicas, como o Amazonas, além de apresentar baixo custo para realização dos exames, quando comparada a técnicas moleculares. Entretanto, a qualificação dos profissionais que realizam os testes microscópicos tem estimado valor para a qualidade dos resultados.

Nesse trabalho, foram realizados testes de diagnóstico molecular para malária, por nested-PCR, em 200 amostras coletadas no DO da infecção para uma confirmação do diagnóstico microscópico da gota espessa. O resultado da nested-PCR confirmou a presença dos parasitas em todas as amostras testadas. Adicionalmente, foi encontrado grande quantidade de infecções mistas (38/200), cerca de 19%. Apenas uma amostra (0,5%) obteve diagnóstico molecular diferente do que foi realizado pela microscopia. Não houve análise molecular em nenhuma amostra negativa pelo diagnóstico microscópico.

Das 200 amostras, 176 (88%) eram provenientes de sangue de pacientes de Manaus. O diagnóstico por microscopia da gota espessa dessas amostras foi realizado por técnicos da FMTAM. Somente duas amostras das 176 foram diagnosticadas como sendo malária por monoinfecção por *P.falciparum*, a quase totalidade (174/176) era malária causada por *P. vivax*. Nenhuma amostra mista foi encontrada pela microscopia. Foram encontrados 145 resultados concordantes entre os dois testes, sendo o diagnóstico positivo para malária vivax em ambas as técnicas. Amostras mistas, infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*, foram encontradas em 31 amostras de acordo com resultados pela técnica molecular de nested-PCR.

As duas amostras de malária falciparum foram confirmadas pela nested-PCR como monoinfecções.

As outras 24 amostras (12%) foram provenientes de localidades do interior do Amazonas. Essas amostras não representam a proporção de notificações dos casos de malária nessas áreas malarígenas do Estado. Entre as 24 amostras, oito foram diagnosticadas microscopicamente como malária causada por monoinfecção por *P. vivax*, sendo apenas cinco delas confirmadas como monoinfecção pela nested-PCR, 4/6 de São Gabriel da Cachoeira e 1/2 de Tefé. As outras 16 amostras foram diagnosticadas como sendo infecção por *P. falciparum* microscopicamente, sendo apenas 12 amostras confirmadas como monoinfecção por *P. falciparum* pela nested-PCR, 5/6 de Tefé, 2/4 de Humaitá, 2/3 de São Gabriel da Cachoeira e 3/3 de Careiro. O restante das amostras teve resultados de infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* sendo: uma de São Gabriel da Cachoeira, duas de Tefé e duas de Humaitá.

Resultados positivos na nested-PCR para determinar a espécie, e negativos na microscopia, devem ser considerados como verdadeiros positivos uma vez que essa técnica é mais sensível que a microscópica (LASERSON, et al., 1994). Os resultados da detecção de 19% de infecções mistas demonstram que elas têm sido subestimadas pelo teste diagnóstico microscópico da gota espessa, confirmando outras pesquisas já realizadas na gerência de malária da FMTAM, onde cerca de 11% de infecções mistas foram encontradas em monoinfecções de malária vivax ou malaria falciparum (MANSO, 2004).

Em regiões endêmicas como o Amazonas é possível que haja erros de diagnóstico microscópicos devido ao grande volume de exames que é realizado diariamente nos postos de saúde. A FMTAM, com cerca de 25% do total casos de malária em Manaus, realiza cerca de 500 exames por dia, e vem sendo o centro de referência para diagnóstico de malária no Amazonas, apresentando um quadro amplo de profissionais especializados para o exame da

gota espessa que é realizado com cerca de 20 minutos para análise de cada lâmina, a entrega do resultado ao paciente ocorre com cerca de 40 minutos (desde o cadastro até a entrega) (FMTAM, 2006).

A eficácia de testes microscópicos foi realizado na Tailândia em um estudo comparando a análise por cinco minutos com a de 20 minutos. Esse estudo demonstrou que existe uma variação na detecção microscópica em baixas parasitemias, >500 parasitas/ μL , em análise da lâmina de forma rápida (COLEMAN et al., 2002). A questão do tempo insuficiente para a análise microscópica dos resultados obtidos em nosso trabalho deve ser descartada, visto que todas as lâminas analisadas pelo diagnóstico microscópico foram analisadas em tempo suficiente e por profissionais especializados. Além disso, houve posteriormente a revisão dessas lâminas por um profissional mais experiente que faz parte do controle de qualidade da gerência de malária da FMTAM, uma vez que essas amostras faziam parte de outros projetos dessa gerência.

Os resultados que encontramos neste trabalho demonstram essa maior sensibilidade da técnica molecular na detecção da presença de espécies que não tenham sido diagnosticadas pela microscopia. Tirasophon e colaboradores (1994), utilizando a técnica molecular por PCR para pesquisa de parasitas da malária no sangue, mostraram a melhor sensibilidade do método sobre a gota espessa. O tempo gasto para realização da PCR em 48 amostras, foi de aproximadamente quatro horas, bem menor que o tempo gasto pela microscopia. Os resultados desse teste mostraram uma sensibilidade de 89% para o *P. falciparum* e 91% para o *P. vivax* e especificidade de 94%. Outra vantagem da PCR foi que no exame pela gota espessa foram detectadas apenas monoinfecções, enquanto que na PCR, foram encontradas infecções mistas.

A melhor sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos para malária por técnicas moleculares de amplificação por PCR em relação a microscopia vem sendo

argumentada desde 1993, sendo usada principalmente para fins epidemiológicos (SNOUNOU et al., 1993 a,b; TIRASOPHON et al., 1994; KIMURA et al., 1995, 1997; HANSCHEID, 1999; HANSCHEID et al., 2002; MORASSIN et al., 2002). Entretanto, para fins de diagnóstico na rotina de áreas endêmicas essa técnica não é aconselhada devido ao seu alto custo e a necessidade de infra-estrutura e mão de obra mais especializada.

Além disso, um resultado positivo pelo método molecular não significa necessariamente que a pessoa esteja com a doença, podendo o paciente estar infectado e ser apenas um portador assintomático. Como foi observado neste trabalho, uma vez que os pacientes com infecções mistas, diagnosticadas pela técnica molecular, apresentavam sintomas clínicos para apenas uma espécie. Entretanto, não se pode afirmar que houvesse uma nova infecção subsequente ao tratamento, proveniente do desenvolvimento da espécie que estava em menor parasitemia e por isso não tinha sido diagnosticada pela microscopia.

Essas infecções mistas subestimada pela microscopia mostram que em regiões endêmicas, pacientes com malária por infecções mistas de *P. vivax* e *P. falciparum* são comuns. Entretanto, o diagnóstico desse tipo de infecção não é uma tarefa fácil pela técnica microscópica. Isso ocorre principalmente porque a quantidade de uma espécie de parasita costuma ser bem menor que a outra, sendo, portanto quase imperceptível até mesmo para bons microscopistas. Mudanças na morfologia de alguns parasitas também podem levar a similaridades entre alguns estágios de evolução das espécies, tornando o diagnóstico diferencial dessas espécies ainda mais difícil (WARHURST; WILLIAMS, 1996).

Acredita-se que o principal problema da falha na detecção dessas infecções mistas tenha sido devido aos baixos níveis de parasitemias de uma espécie em relação a outra, o que na maioria das vezes não gera a sintomatologia da doença da espécie que está em menor quantidade, mas o indivíduo é um portador assintomático dessa espécie e se não for tratado de forma eficaz na eliminação de ambas as espécies, a que estiver em menor quantidade poderá

se manifestar posteriormente. Casos onde o crescimento de uma espécie de parasita pode inibir a manifestação clínica da outra são chamados de infecções criptônicas.

Um exemplo de identificação de infecção criptônica, com coinfeção de *P. falciparum* em pacientes diagnosticados microscopicamente por monoinfecção de *P. vivax*, foi realizada em um estudo na Tailândia com a simples utilização de teste rápido imunológico. Dos 238 pacientes tratados para malária vivax, cerca de 10% (23 pacientes) retornaram subsequentemente após a negatificação de *P. vivax*, com malária falciparum, sem risco de haver uma reinfeção. Desses, 19 pacientes (74%) apresentaram teste imunológico positivo para *P. falciparum* na admissão, mas não foram visíveis na microscopia. Esses testes foram confirmados por PCR onde 12 (52%) foram positivos, não havendo diferença estatística entre os testes. Esse estudo demonstrou que testes rápidos são melhores que testes microscópicos para detectar infecções criptônicas de *P. falciparum* em pacientes com malária vivax (MAYXAY et al., 2001).

Estudos semelhantes a este ainda não tem sido realizados na Amazônia. Nesse trabalho não foi possível fazer o acompanhamento do retorno do paciente porque as amostras estavam criopreservadas desde 2004 e o sistema de acompanhamento do paciente na FMTAM, pelo SIVEP é atualizado seis meses depois da última notificação (retorno) do paciente.

Outro estudo na Tailândia, região endêmica que apresenta as duas espécies de malária assim como na região Amazônica, estudos tem demonstrado o subsequente aparecimento de infecção por *P. vivax* quando se trata a malária causada por *P. falciparum*, o reverso acontecendo em menor proporção. A provável explicação encontrada para tal fato é que nos casos de infecção por *P. vivax*, mas havendo espécie de *P. falciparum* não detectada pela microscopia, o uso da primaquina que pode eliminar as formas pré-eritrocíticas do *P. falciparum* que ainda não tenham se desenvolvido, entretanto, as formas hipnozoíticas de *P.*

vivax não detectada pela microscopia em infecções por *P. falciparum* poderiam levar a recaídas posteriores os tratamento de malária falciparum (TASANOR et al., 2006).

Além do problema das infecções criptônicas, algumas infecções por *Plasmodium sp* podem permanecer assintomáticas por um período de tempo maior do que o esperado, principalmente crianças e primoinfectadas, que ainda não apresentam nenhuma imunidade para doença (BRUCE et al., 2000; AL SEROURI et al., 2000; NSOBYA et al., 2004). Em um estudo de avaliação da prevalência da parasitemia de assintomáticos de uma área urbana mesoendêmica na Uganda, a microscopia identificou 17% (55/316 casos apenas de *P. falciparum*) enquanto que a PCR detectou 47% sendo, 36% de *P. falciparum*, 21% de infecção mista, 10% de *P. ovale*, 7% de *P. vivax*, 4% de *P. ovale*. A sensibilidade e a especificidade da PCR para identificar infecções assintomáticas foi de 44% e 98% respectivamente. Depois do acompanhamento durante 20 semanas, o risco de desenvolver malária sintomática foi de 82% nos casos de microscopia positivos e 39% nos casos de PCR positivos e microscopias negativos (NSOBYA et al., 2004).

A possibilidade de haver infecções assintomáticas e criptônicas por parte do *Plasmodium sp*, poderia explicar os 19% de infecções mistas. Nesse caso, a parasitemia diferenciada entre as espécies, é o principal problema que leva a falhas do diagnóstico microscópico para a malária, podendo também, levar a erros na avaliação dos dados epidemiológicos para a malária em regiões endêmicas.

A quantidade infecção mista encontrada (19%) pelo método molecular gerou dúvidas se a positividade dos resultados desses testes moleculares não poderia ser devido a presença de DNA livre circulante, provenientes de infecções anteriores. Entretanto, os parasitas mortos são destruídos por mecanismos de resposta imune do organismo ou por tratamento devido a ação de drogas, sendo retirados da circulação sanguínea por fagócitos rapidamente. Além

disso, Jarra e Snounou (1998) demonstraram que apenas parasitas viáveis são detectados por nested PCR.

Sendo assim, os resultados obtidos pela nested-PCR no diagnóstico de malária mista eram realmente devido a presença das duas espécies de parasitas viáveis, com potencial de desenvolverem a doença, mas que por algum motivo apenas uma espécie manifestou a sintomatologia clínica da doença, ficando a outra de forma criptônica. Por esse motivo é que o diagnóstico molecular para malária, apesar da melhor sensibilidade em relação a gota, não é recomendado como método de diagnóstico da rotina, para fins de tratamento. Os resultados laboratoriais nem sempre são semelhantes aos relatos clínicos, entretanto, esses métodos são ótimas ferramentas de pesquisas epidemiológicas e podem ser usados para avaliação dos tratamentos e triagem de pacientes assintomáticos em regiões endêmicas como o Amazonas (MANSO, 2004; DI SANTI et al., 2004).

Um dos problemas enfrentados pela técnica molecular de diagnóstico utilizada da FMTAM é o fato dos métodos baseados na amplificação do DNA por nested-PCR envolverem múltiplas etapas (extração do DNA, primeira PCR, segunda PCR) e não serem simples como os métodos microscópicos e imunológicos, necessitando de mão de obra mais especializada. Além disso, os custos para manutenção de um laboratório molecular equipado são elevados, assim como os reagentes necessário para os testes. Sendo assim, ainda não é possível que se substitua a microscopia por técnicas moleculares na rotina de diagnóstico para malária em áreas endêmicas, onde o fluxo de exames é elevado (SINGH, 1997).

Testes comparativos entre os resultados obtidos pela nested-PCR, com resultados de outro teste molecular alternativo de PCR em tempo real, foram também realizados para validar o uso desse novo método molecular de para diagnóstico de malária de forma mais rápida e precisa. Essa nova técnica já vem sendo usada com finalidades epidemiológicas e no auxílio de casos negativos da microscopia, devido a presença de uma baixa parasitemia (LEE

et al, 2002; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; FABRE et al., 2004; GINOCCHIO, 2004; ROUGEMONT et al., 2004; ANDREWS et al., 2005; WILSON et al., 2005; FARCAS et al., 2006).

Na análise do diagnóstico de 34/200 amostras testadas pelas três técnicas (microscópica, nested-PCR e PCR em tempo real) houve divergência de resultados entre os testes moleculares e microscópico. Entretanto, o número de amostras foi baixo e os testes estatísticos demonstraram boa sensibilidade e especificidade para os métodos moleculares. A co-positividade (sensibilidade) dos testes para *P. vivax* foi em média 71% e a co-negatividade (especificidade) foi em média 92%. Já para *P. falciparum* a co-positividade foi em média 91% e a co-negatividade foi em média 79%. A concordância entre os testes foi regular.

Um estudo, realizado na Amazônia Venezuelana com diagnóstico molecular por nested-PCR, demonstrou que a reprodutibilidade desse teste pode variar, mas continua tendo boa sensibilidade (78%) e especificidade (97%) na detecção de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Entretanto, a pouca reprodutibilidade do teste pode ser devido a problemas de contaminações durante as manipulações (LASERSON et al., 1994). O método de PCR em tempo real poderia diminuir essa possibilidade de contaminações durante o processo, uma vez que as amostras são menos manipuladas durante a execução do teste diagnóstico.

Nos estudos que realizamos nesse trabalho não havia nenhuma amostra mista diagnosticada pela microscopia, enquanto que pela nested-PCR foram diagnosticadas 7 amostras (20%) e pela PCR em tempo real foram diagnosticada apenas uma amostra (aproximadamente 3%). Esse resultado demonstra que problemas de contaminação durante a nested-PCR podem ter acontecido, ou a quantidade de DNA na amostra utilizada na reação de PCR em tempo real foi insuficiente para detecção de parasitas que estavam em baixa parasitemia, uma vez que pouca quantidade dessas amostras foram armazenadas em papel de

filtro e transportadas para a França, local onde foi realizado o experimentos em PCR em tempo real.

Apesar de ser um método cheio de interferências, caro e que exige pessoas mais qualificadas para a sua realização, é indiscutível a melhor sensibilidade e especificidade da PCR sobre a gota espessa. Por esta razão, no caso de infecções não detectadas pela microscopia, mas com indícios de infecção pelo parasita da malária, é prudente viabilizar a aplicabilidade do método molecular, a fim de diagnosticar corretamente a doença, sendo sua principal vantagem o diagnóstico de infecções mistas e nos casos de baixas parasitemias. Entretanto, na maioria dos casos clínicos, onde é necessário o acompanhamento do declínio dos sintomas e o tempo de negatização dos parasitas no sangue, é mais recomendado o exame microscópico, a fim de obter a real incidência de cada espécie do parasita na amostra testada. A PCR em tempo real é capaz de fazer essa quantificação (LEE et al, 2002; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002; ROUGEMONT et al., 2004; FABRE et al., 2004).

O primeiro sistema comercial de diagnóstico para malária por real time PCR, utilizando como instrumento o LightCycler[®], nomeado como RealArt Malária LC, foi testado em 2004 por Farcas e colaboradores. O teste obteve 99,5% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparado a nested PCR, além de demonstrar eficiência quanto ao tempo de execução, <45 minutos, sendo portanto, considerado bom para detectar parasitas em pacientes febris. Entretanto, a incapacidade de diferenciar as quatro espécies foi uma limitação do teste, assim como a necessidade de confirmação dessa eficiência em regiões com menor prevalência do que a do local estudado (15%).

Em nosso trabalho, os testes diagnósticos das 34 amostras também foram realizados no LightCycler[®] para a análise da amplificação do DNA das espécies em tempo real, sendo gasto 1 hora, para a amplificação e análise dos resultados para o diagnóstico da malária. Entretanto, a estratégia que nós utilizamos possibilitava a diferenciação da espécie

responsável pela infecção, por usar *primers* específicos para cada espécie. Na comparação desse teste molecular com o diagnóstico microscópico, a PCR em tempo real apresentou uma sensibilidade de 61% para infecções por *P. vivax* e 99% para *P. falciparum* e uma especificidade de 94% para o *P. vivax* e de 66% para o *P. falciparum*.

Em 2002, Lee e colaboradores desenvolveram um método rápido, sensível e específico para diagnóstico da malária com PCR em tempo real baseada na utilização da fluorescência emitida pela 5' nuclease através da tecnologia da TaqMan[®], com primers e sondas específicas para o gene da subunidade menor do RNA ribossomal. Esse método foi utilizado para monitorar o progresso dos tratamentos com antimaláricos, demonstrando ser mais sensível para detectar menor número de parasitas por μL de sangue (sensibilidade de 0,002 pg de DNA de *P. falciparum* que equivale a 0,1 parasita). Entretanto, esse tipo de PCR em tempo real apresenta custos mais elevados que experimentos realizados no LightCycler[®] (BELL ; RANFORD-CARTWRIGHT, 2002)

Com base nesses resultados e em outros trabalhos, ambos os testes, microscópicos e moleculares, são considerados bons não só para o diagnóstico, como também para monitoramento do tratamento, porém, a sensibilidade do método de PCR em tempo real é maior, cerca de 30 até 3 parasitas/ μL (LEE et al, 2002; MONBRISON et al., 2003) podem ser detectados em relação a microscopia, onde apenas 50 parasitas/ μL podem ser visualizados por um bom microscopista (WARHURST; WILLIAMS, 1996). Portanto, o diagnóstico molecular por real time demonstra ser mais eficaz que o microscópico, especialmente em situações especiais de baixa parasitemia.

As vantagens dos aparelhos de PCR em tempo real em relação a PCR convencional são com relação a rapidez da análise dos resultados e a ausência de contaminações, que é muito freqüente na nested-PCR (LEE et al, 2002). Os níveis de sensibilidade e especificidade do diagnóstico por real time PCR em relação a nested-PCR foram de 66% e 71% para

infecções *P. vivax* e 100% e 62% para infecções por *P. falciparum*. A baixa co-positividade para os dois testes, mesmo sendo ambos baseados na técnica de amplificação de DNA, pode estar relacionada ao índice mínimo de detecção diferenciado dos dois testes, sendo de 30 até 3 parasitas/ μ L no real time (MONBRISON et al., 2003) e de aproximadamente 10 parasitas/ μ L na nested-PCR (SNOUNOU et al., 1993b).

Em experimentos realizados por Rougemont et al. (2004), com PCR em tempo real, houve alta sensibilidade do teste em comparação com a microscopia (detecção de 6 amostras positivas que tinham resultado negativo na microscopia). Entretanto, esse ensaio não demonstrou muita eficiência para detectar infecções mistas, ilustrando a dificuldade de identificação dessas infecções por essa técnicas.

Portanto, a maior vantagem da PCR em tempo real para diagnóstico da malária, é com relação ao tempo do diagnóstico, sendo 1 hora por PCR em tempo real comparada as 8 horas para o exame realizado por nested-PCR. Não podendo afirmar, entretanto, que as divergências entre os dois testes foi devido a baixas parasitemias da amostra ou a contaminações nos testes por nested-PCR, uma vez que a quantidade e qualidade da amostra analisada pela PCR em tempo real não foi equivalente a realizada por nested-PCR.

Outra finalidade do teste diagnóstico molecular para malária é o acompanhamento da negatização da parasitemia durante o período de tratamento. O uso de um diagnóstico mais sensível, como o diagnóstico molecular pela nested-PCR, demonstra a realidade do tempo de permanência desses parasitas no sangue após o tratamento. Alertando sobre a eficácia dos antimaláricos em relação ao tempo de permanência de estágios de vida dos parasitas (gametócitos) que não causam sintomas, mas que são responsáveis pela transmissão da doença. Esses novos dados epidemiológicos contribuem para um melhor controle da transmissão da doença em áreas endêmicas, como por exemplo, o Amazonas.

A principal droga antimalárica utilizada para tratamento da malária vivax pela FMTAM é a cloroquina. Essa droga vem sendo muito usada no tratamento da malária desde quando foi introduzida em 1940, principalmente, porque apresenta baixa toxicidade, e baixo custo em relação a outras drogas. Apesar da existência da resistência de alguns parasitas a essa droga, ela ainda é muito utilizada nos tratamentos não complicados de malária, principalmente no caso de malária *vivax* (FUNASA, 2001; HYDE, 2005). Essa droga apresenta atividade esquizontocida e gametocitocida em altas concentrações (SMALLEY et al., 1977; CHUTMONGKONKUL et al., 1992), mas não apresenta ação contra as formas maduras do gametócitos, que levam 10 dias para se desenvolverem (SMALLEY et al., 1977), nem contra as formas hepáticas (FUNASA, 2001).

Para combater as formas parasitárias que ficam em latência no fígado é indicado o uso da cloroquina juntamente com outra droga, a primaquina (8 aminoquinolines), que além de eliminar a forma hepática, ainda é um ótimo gametocitocida e esporontocida (CHOMCHARN et al., 1980). Entretanto, o uso da primaquina deve ser moderadamente controlado, visto que essa droga pode induzir hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD, cuja prevalência é maior na população masculina (FUNASA, 2001; KATSURAGAWA et al., 2004). Nos casos de malária causada por *P. falciparum*, foi demonstrado que uma simples dose de 45mg de primaquina tem sido eficiente para eliminar gametócitos de possíveis cepas resistentes de *P. falciparum* (CHOMCHARN et al., 1980).

A investigação da resposta clínica *in vivo* e da sensibilidade *in vitro* do *P. vivax* a cloroquina e a cloroquina + primaquina foi realizada em um estudo na Tailândia. Os resultados demonstraram que a sensibilidade a cloroquina é aumentada duas vezes na presença de primaquina (TASANOR et al., 2006). Outra recente publicação tem mostrado que a primaquina tem ação de reverter a resistência a cloroquina de *P. falciparum in vitro* (BRAY et al., 2005; EGAN, 2006).

Na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, centro de referência para malária nessa região, o tratamento adotado para os casos de malária vivax não grave tem sido cloroquina por três dias, com descanso no quarto dia e com mais 7 dias de uso da primaquina para eliminar os hipnozoítos, havendo diferenças nas concentrações das drogas para adultos e crianças. Na malária falciparum, o tratamento recomendado para os casos não complicados (parasitemia igual ou menor que duas cruzes) tem sido a combinação por 3 dias de quinino com a doxicilina e mais 2 dias da doxicilina sozinha para pacientes adultos. Para crianças e gestantes, e como segunda alternativa dos casos de adultos resistentes, é recomendada a mefloquina (FMTAM, 2006).

Nesse trabalho foi realizado o diagnóstico molecular para a confirmação do diagnóstico microscópico de 100 amostras negativas após o tratamento por 7 dias para malária vivax, sendo a cloroquina usada nos três primeiros dias e os últimos dias usada a primaquina. Foram encontradas 20 amostras positivas pela nested-PCR para espécie *P. vivax*, sendo negativas para *P. falciparum*. Das 100 amostras, três haviam sido diagnosticadas como sendo infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* no diagnóstico antes do tratamento. Das três amostras mistas, apenas uma foi positiva na nested-PCR para *P. falciparum* depois do tratamento, sendo negativas para *P. vivax*. Todas essas amostras foram negativas pelo exame microscópico da gota espessa e não há indícios de retorno clínico após o tratamento.

Pacientes tratados com cloroquina, que não demonstravam mais sintomas da doença e nem trofozoítos na gota espessa, ainda podem apresentar gametócitos, não sendo considerados fracassos terapêuticos. Entretanto, esses gametócitos são capazes de infectar mosquitos e contribuir para continuidade da transmissão da doença. Estudos de avaliação dos efeitos das drogas anti-maláricas na transmissão de parasitas resistentes tem sido realizados com *P. falciparum* em Gâmbia, demonstrando que os gametócitos que emergem após o tratamento com cloroquina tem selecionado alelos associados a resistência (SUTHERLAND et al., 2002).

A resistência aos antimaláricos envolve vários genes, sendo que alguns deles já foram caracterizados como marcadores de resistência a determinadas drogas. Alguns exemplos de genes de resistência podem ser citados: *mdr* (multidroga resistente) em relação ao quinino (QN) e a cloroquina (CQ), *crt* (transportador de resistência a cloroquina), *dhps* (diidrofolato redutase) e *dhfr* (diidropteroa sintetase) em relação à associação Sulfadoxina-Pirimetamina (SP) (HYDE, 2005). O gene *pfcr* é um desses genes associado a resistência a cloroquina em *P. falciparum* sendo o principal marcadores moleculares já estudado para essa espécie (FIDOCK, 2000).

A resistência a cloroquina (CQR) pelo *P. vivax* foi pela primeira vez estudada em Papua Nova Guiné em 1989 e Indonésia em 1991. Em pesquisas de campo no Papua houve recidiva em alguns de pacientes com o *P. vivax* depois tratamento com o CQ. Entretanto, há diferenças básicas nos mecanismos genéticos e moleculares de resistência a cloroquina (CQR) no *P. falciparum* e *P. vivax*. Pesquisas nessa área mostraram que mutações no gene do *pfcr* são centrais no fenótipo CQR de *P. falciparum* mas nenhuma mutação pode ser associada com o CQR no gene *pvcg10*, encontrado no *P. vivax* e ortólogo de *pfcr*. Porém, há possibilidade de mutações no *pvcg10* afetarem no nível de expressão de proteínas, tendo o produto um papel potencial em CQR no *P. vivax* (NOMURA et al.,2001).

No Gâmbia, foi realizado um estudo para demonstrar a ação da cloroquina na seleção de parasitas resistentes de *P. falciparum*. Quando há fracasso terapêutico e uma nova infecção ocorre é provável que esta seja devido à presença de uma subpopulação parasitas resistentes não detectados na avaliação do final do tratamento, a cloroquina removeria então os parasitas sensíveis e a baixa densidade de parasitas resistentes expandiria posteriormente. Para demonstrar isso, a presença de alelos de resistência (*pfmdr-186* e *pfcr-76*) na população de *P. falciparum* foi avaliada antes e após o tratamento. Os resultados demonstraram que após o tratamento havia maior distribuição de genótipos relacionados a resistência, sugerindo que o

tratamento com cloroquina tinha selecionado esse tipo de genótipo. A existência desses dois alelos de resistência também foi detectada nos gametócitos persistentes (SUTHERLAND et al., 2002).

O interessante desse resultado é que apenas parasitas viáveis são detectados por nested PCR (JAARA ; SNOUNOU, 1998). Somado a isso, o limite de detecção do DNA dos parasitas por nested-PCR foi de 4 dias no sangue do hospedeiro vertebrado (FABIAN, et al., 2004), não sendo possível a positividade do teste diagnóstico ser devido a DNA circulante do parasita. Como a análise dos prontuários desses pacientes também não demonstrou nenhuma recaída por parte desses pacientes, existe grande possibilidade de que a positividade pela técnica molecular seja proveniente da presença de gametócitos na circulação sanguínea.

A nested-PCR apresenta um limite de detecção de gametócitos melhor do que pela microscopia, aproximadamente 3,7parasitas/ μ l. Estudos mais específicos, com transcrição reversa de proteínas expressas por gametócitos, vêm apresentando bom limite de detecção de genes estágio-específicas, com 27 gametócitos/ μ l em análises realizadas com PCR em tempo real. De 424 amostras examinadas, 161(38%) foram positivas para presença de gametócitos pela nested-PCR, enquanto que somente 97(23%) foi positivas na microscopia. Entretanto, nesse estudo, 14 amostras (3.3%) foram detectadas pela microscopia mas não pela PCR por se tratar genes específicos desse estágio (WARGO et al., 2006).

O efeito de uma dose de 45mg de primaquina (Pr) como um gametocida foi investigado em 218 pacientes com *P. falciparum*, tratados com sulfadoxina-pirimetamine (SP) em combinação com a Pr. Em 87 casos tratados somente com SP não houve nenhuma diferença na quantidade de gametócitos do segundo dia para o sétimo. Em 131 casos tratados com SP + Pr, não houve diferença na quantidade de gametócitos encontrados no segundo dia, mas houve significativa redução no sétimo dia, sendo que continuava positivo por duas

semanas. O uso da SP + Pr reduz a gametocitogênese de 77% no dia zero para 30% no dia 7 e com isso diminui o risco de transmissão da malária (KANEKO et al., 1989).

Sabe-se que apenas uma dose de 45mg de primaquina já apresenta atividade gametocida, com negatificação completa no dia 15 de tratamento (GOGTAY et al., 1999). Em um estudo com uso da cloroquina, como esquizotônica, em conjunto com uma dose de 45mg da primaquina, como gametocida foram encontradas 23% de gametócitos no dia 29 de tratamento. Entretanto, o aumento de 45mg para 60mg de primaquina poderia melhorar a eficácia da negatificação com necessidade de mais estudos para comprovar o tempo certo para negatificação (GOGTAY et al., 2006).

Em um estudo da avaliação da persistência de parasitas (microscopia e PCR) e gametócitos (RT-PCR) em pacientes com malária por *P. falciparum*, tratados com cloroquina (concentração de 25mg/kg) por 3 dias ou sulfadoxina (25mg/kg)-pirimetamina (0,25mg/kg) em dose única, parasitas resistentes (visualização de mutações nos genes *pfprt*, *pfmdr1* e *dhfr*) as essas drogas tinham uma frequência aumentada, com evidências de aumento da prevalência de gametócitos em pacientes infectados com esses parasitas resistentes. A maior densidade de gametócitos implicaria em maior chance de infectar mosquitos e com isso aumentar a transmissão de parasitas resistentes (ALI et al, 2006).

Em um estudo recente sobre a prevalência de gametócitos em pacientes, com malária falciparum não complicada, tratados com artemisinina, a média da negatificação dos gametócitos na lâmina foi de 6-7 dias de tratamento (PIYAPHANEE et al., 2006). Outro estudo utilizando uma amplificação quantitativa baseada na amplificação de segmentos de ácidos nucleicos (QT-NASBA) de mRNA, demonstrou que técnicas moleculares são mais sensíveis (20-100 gametócitos por mL de sangue) que a microscopia (16.000 gametócitos por mL de sangue) para avaliar a permanência de gametócitos durante o tratamento, revelando a

alta prevalência de níveis submicroscópicos de gametócitos durante o seguimento dos 28 dias de tratamento (SCHNEIDER et al., 2006).

Esse resultado vem demonstrar a finalidade do diagnóstico por PCR nos estudos epidemiológicos, para melhor avaliação das populações de parasitas circulantes e com isso tentar diminuir a transmissão de gametócitos persistentes em casos não detectados pela microscopia. Uma vez que a microscopia pela gota espessa já é considerada como padrão ouro para malária em fase sintomática, os métodos moleculares de diagnóstico da doença, que são mais sensíveis, como mostra a figura 5, podem e devem ser utilizados para esse tipo de avaliação da negatificação das amostras em acompanhamento de tratamento dos pacientes em área endêmica.

Sendo assim, a ciência evolui e novas ferramentas vão surgindo para dar suporte às pesquisas voltadas para criação de novas drogas, vacinas e métodos de diagnóstico para as doenças. Mas é preciso questionar qual a verdadeira vantagem dessas ferramentas e onde elas possam ser usadas para acrescentar informações coerentes. Esse trabalho demonstrou o uso das ferramentas moleculares de diagnóstico não só para a fase sintomática da doença, indicando outras maneiras de se utilizar as ferramentas moleculares para contribuir com descobertas de mais informações sobre a dinâmica das infecções malarígenas e com isso aumentar a precisão dos resultados de estudos epidemiológicos desenvolvidos na região Amazônica.

CONCLUSÕES

Os testes estatísticos demonstraram boa sensibilidade e especificidade dos métodos moleculares para detecção das duas espécies. A co-positividade (sensibilidade) dos três testes para *P. vivax* foi em média 71% e a co-negatividade (especificidade) foi em média 92%. Para *P. falciparum* a co-positividade foi em média 91% e a co-negatividade foi em média 79%. Além disso, a concordância entre os testes foi regular.

Os métodos moleculares de diagnóstico são mais sensíveis que o microscópico e por isso poderiam contribuir mais com estudos epidemiológicos, diagnóstico de pacientes com baixas parasitemias, portadores assintomáticos, infecções criptônicas e na avaliação da negatização da parasitemia no monitoramento terapêutico. Entretanto não são indicados para rotina de diagnóstico de malária uma vez que os resultados positivos por essa técnica não significam necessariamente que o paciente desenvolva a doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALECRIM, M. G. C. *Estudo da resistência do Plasmodium falciparum as drogas anti-maláricas in vivo e in vitro na Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 1981.

ALECRIM, M. G. C. *Estudo clínico, resistência e polimorfismo parasitário na malária pelo Plasmodium vivax, em Manaus-AM*. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, 2000.

ALECRIM, M. G. C.; CARVALHO, L.M.; FERNANDES, M.C.; ANDRADE, S.D.; LOUREIRO, A.C.; ARCANJO, A.R.L.; ALECRIM, W.D. Tratamento da malária com artesunate (retocaps[®]) em crianças da Amazônia brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33, n.2, p.163-168, 2000.

ALEXANDRE, A. M. *Estudo clínico e epidemiológico da malária grave em pacientes atendido na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas. 2004.

ALI, M.S.; YOUSIF, A.G.; MUSTAFA, M.S.; IBRAHIM, M.H. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. *Clinical Laboratory Science*. v.18, n.2, p.69-73, 2005.

ALI, E.; MACKINNON, M.J.; ABDEL-MUHSIN, A.A.; AHMED, S.; WALLIKER, D.; BABIKER, H.A. Increased density but not prevalence of gametocytes following drug treatment of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.100, p.176-183, 2006.

AL SEROURI, A.W.; GRANTHAM-MACGREGOR, S.M.; GREENWOOD, B.; COSTELLO, A. Impact of asymptomatic malaria parasitaemia on cognitive function and school achievement of schoolchildren in the Yemem Republic. *Parasitology*. v.121, p.337-345, 2000.

ALVES, F.P.; DURLACHER, R.R.; MENESES, M.J.; KRIEGER, H.; SILVA, L.H.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.66, n.6, p.641-148, 2002.

ANDREWS, L.; ANDERSEN, R.F.; WEBSTER, D.; DUNACHIE, S.; WALTHER, R.M.; BEJON, P.; HUNT-COOKE, A.; BERGSON, G.; SANDERSON, F.; HILL, A.V.; GILBERT, S.C. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.73, n.1, p.191-198, 2005.

ARCANJO, A.R. *Métodos imunocromatográficos em malária: aplicabilidade como diagnóstico em localidades rurais do Estado do Amazonas*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Estado do Amazonas. 2004.

BABIKER, H.A.; ABDEL-WAHAB, A.; AHMED, S.; SULEIMAN, S.; RANFORD-CARTWRIGHT, L.; CARTER, R.; WALLIKER, D. Detection of low level *Plasmodium falciparum* gametocytes using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 99, p.143-148, 1999.

BARKER, R.H.JR.; SUEBSAENG, L.; ROONEY, W.; ALECRIM, G.C.; DOURADO, H.V.; WIRTH, D.F. Specific DNA probe for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Science*, v.231, n.4744, p.1434-1436, 1986.

BELL, A.S. & RANFORD- CARTWRIGHT, L.C. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, v.18, n.8, p.337-342, 2002.

BERRY, A.; FABRE, R.; BENOIT- VICAL, F.; CASSAING, S.; MAGNAVAL, J.F. Contribution of PCR- based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Medicine Tropical*, v.65, n.2, p.176-183, 2005.

BRANCH, O.; CASAPIA, W.M.; GAMBOA, D.V.; HERNANDEZ, J.N.; ALAVA, F.F.; RONCAL, N.; ALVAREZ, E.; PEREZ, E.J.; GOTUZZO, E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal*, v.4, n.27, 2005.

BRAY, P.G.; DEED, S.; FOX, E.; KALKANIDIS, M.; MUNGTHIN, M.; DEADY, L.W.; TILLEY, L. Primaquine synergises the activity of chloroquine against chloroquine-resistant *P. falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, v.70, p.1158-1166, 2005

BRUCE, M.C.; DONNELLY, C.A.; PACKER, M.; LAGOG, M.; GIBSON, N.; NARARA, A.; WALLIKER, D.; ALPERS, M.P.; DAY, K.P. Age- and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology*, v.121, n.3, p.247-256, 2000.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. Disponível em: <www.cdc.gov/malaria/biology/life_cycle.htm. Acesso em 10.nov.2005.

CHEESMAN, S.J.; ROODE, J.C.; READ, A.F.; CARTER, R. Real-time quantitative PCR for analysis of genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. *Molecular & Biochemical Parasitology*, n.131, p.83-91, 2003.

CHOMCHARN, Y.; SURATHIN, K.; BUNNAG, D.; SUCHARIT, S.; HARINASUTA, T. Effect of a single dose of primaquine on a Thai strain of *Plasmodium falciparum*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.11, n.3, p.408-412, 1980.

CHUTMONGKONKUL, M.; MAIER, W.A.; SEITZ, H.M. *Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for anopheles stephensi mosquitoes. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.86, n.2, p.103-10, 1992.

CICERON, L.; JAUREGUIBERRY, G.; GAY, F.; DANIS, M. Development of a Plasmodium PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, n.1, p.35-38, 1999.

CIVES - Centro de Informação de Saúde para viajantes/Malária. Disponível em: <<http://www.cives.ufrj.br/informacao/malaria/mal-iv.html>>. Acesso em 30/06/2006.

COLEMAN, R.E.; MANEECHAI, N.; RACHAPHAEW, N.; KUMPITAK, C.; MILLER, R.S.; SOYSENG, V.; THIMASARN, K; SATTABONGKOT, J. Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in western Thailand. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 67, n. 2, p. 141-144, 2002.

DEANE, L.M. A malária no Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Debates, v.1, p.86-94, 1985.

DI SANTI, S.M.; KIRCHGATTER, K.; BRUNIALTI, K.C.S.; OLIVEIRA, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; BOULOS, M. PCR based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.46, n.4, p.183-187, 2004.

FABIAN, M.M.; TOMA, H.; ARAKAWA, T.; SATO, Y. Malaria parasite developmental analyses by the nested polymerase chain reaction method: an implication for the evaluation of mosquito infection rates in epidemiological studies. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.35, n.4, p.820-827, 2004.

FABRE, R.; BERRY, A.; MORASSIN, B.; MAGNAVAL, J.F. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitology*, n.128, p.15-21, 2004.

FARCAS, G.A.; ZHONG, K.J.Y.; MAZZULLI, T.; KAIN, K.C. Evaluation of the realart malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.2, Feb, p.636-638, 2004.

FERREIRA, Marcelo S.; Malária. In: Veronesi R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu; p. 1260-1264, 2004.

FIDOCK, D.A.; NOMURA, T.; TALLEY, A.K.; COOPER, R.A.; DZEKUNOV, M.S.; FERDIG, M.T.; URSOS, L.B.; SIDHU, A.; NAUDE, B.; DELTSCH, K.W.; SU, X.S.; WOOTTON, J.C.; ROEPE, P.D.; WELLEMS, T.E. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Molecular Cellular*, v.6, p.861-871, 2000.

FUNASA - FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Sistema de Informação do Programa de Controle da Malária (SISMAL): relatório resumo epidemiológico, 2001*. Brasília: FUNASA. 2002.

GINOCCHIO, C. C. Life beyond PCR: alternative target amplification technologies for the diagnosis of infectious diseases, part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, v.26, n.16, p.121 a 128, 2004.

GOGTAY, N.J.; CHOGLE, A.R.; SORABJEE, J.S.; MARATHE, S.N.; KSHIRSAGAR, N.A.; Poor gametocytocidal activity of 45mg primaquine in chloroquine-treated patients with acute, uncomplicated, plasmodium falciparum malaria in Mumbai (Bombay): an issue of

public-health importance. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.93, n.8, p.813-813,1999.

GOGTAY, N.J.; KAMTEKAR, K.D.; DALVI, S.S.; MEHTA, S.S.; CHOGLA, A.R.; AIGAL, U.; KSHIRSAGAR, N.A. A randomized, parallel study of the safety and efficacy of 45mg primaquine versus 75mg bulaquine as gametocytocidal agents in adults with blood schizonticide-responsive uncomplicated falciparum malaria [ISCRTN50134587]. *BMC Infectious Diseases*, v.6, n.16, 2006.

HANSCHEID, T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical Laboratory Haematology*, n.21, p.235-245, 1999.

HANSCHEID, T.; VALADAS, E.; GROBUSCH, M.P. Polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria: safe and useful? *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.8, p.872, 2002.

HYDE, J.E. Drug-resistant malaria. *Trends in Parasitology*, v.21, n.11, p.494-498, 2005.

JARRA, W. & SNOUNOU, G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infection and Immunity*, v.66, n.8, p.3783-3787, 1998.

KANEKO, A.; KAMEI, K.; SUZUKI, T.; ISHII, A.; SIAGIAN, R.; PANJAITAN, W. Gametocytocidal effect of primaquine in a chemotherapeutic malaria control trial in North Sumatra, Indonesia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.20, n.3, p.351-359, 1989.

KATAKAY, Y.; CHIABCHALARD, R.; KOMAKI-YASUDA, K.; KAWAZU, S.; SINGHASIVANON, P.; KRUDSOOD, S.; LOOAREESUWAN, S.; KANO, S. Application of real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis for detection and discrimination of malaria parasite species in Thai patients. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.35, suppl 2, p.10-14, 2004.

KAZEMI, B.; NAJARI, M.; SANEIMOGHADDAM, E.; BANDEHPOUR, M.; SEYED, N.; SHARIFI, K. Detection of *Plasmodium* parasites in healthy blood donors using polymerase chain reaction. *Archives of Iranian Medicine*, v.8, n.2, p.135-138, 2005.

KIMURA, M.; KANEDO, O.; INOUE, A.; ISHII, A.; TANABE, K. Amplification by polymerase chain reaction of *Plasmodium falciparum* DNA from giemsa-stained thin blood smears. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, n.70, p.193-197, 1995.

KIMURA, M.; KANEDO, O.; LIU, Q.; ZHOU, M.; KAWAMOTO, F.; WATAYA, Y.; OTANI, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANABE, K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitology International*, n.46, p.91-95, 1997.

KISZEWSKI, A.E. & TEKLEHAIMANOT, A. A review of the clinical and epidemiologic burdens of epidemic malaria. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.71, suppl. 2, p.128-135, 2004.

KROTOSKI, W.A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.79, n.1, p.1-11, 1985.

LACERDA, M.V.G., ALEXANDRE, M.A.A.; SANTOS, P.D.; ARCANJO, A.R.L.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C. Idiopathic thrombocytopenic purpura due to vivax malária in the Brazilian Amazon. *Acta Tropica*, v.90, p.187-190, 2004.

LANAR, D.E.; MCLAUGHLIN, G.L.; WIRTH, D.F.; BARKER, R.J.; ZOLG, J.W.; CHULAY, J.D. Comparasion of thick films, in vitro culture and DNA hybridization probes for detecting Plasmodium falciparum malaria. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.40, n.1, p.3-6, 1989.

LASERSON, K.F.; PATRALANDA, I.; HAMLIN, D.M.; ALMERA, R.; FUENTES, M.; CARRASQUEL, A.; BARKER, R.H.JR. Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.50, n.2, p.169-180, 1994.

LEE, M.A.; TAN, C.H.; AW, L.T.; TANG, C.S.; SINGH, M.; LEE, S.H.; CHIA, H.P.; YAP, E.P.H. Real-time fluorecence-based PCR for detection of malaria parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.11, p.4343-4345, 2002.

LUZ, F.C.O. *Manual de Treinamento em Diagnóstico Laboratorial de Malária* (Apostila), Brasília - DF, 1997.

MANGOLD, K.A.; MANSON, R.U.; KOAY, E.S.C.; STEPHENS, L.; REGNER, M.; THOMSON, R.B.; PETERSON, L.R.;KAUL, K.L. Real-Time PCR for detection and identification of Plasmodium sp. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.5, p.2435-2440, 2005.

MANSO, M.R.F.C. *Aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da malária*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 2004.

MAYXAY, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; CHOTIVANICH, K.; IMWONG, M.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J. Identification of cryptic coinfection with Plasmodium falciparum in patients presenting with vivax malaria. *The American Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v.65, n.5, p.588-592, 2001.

MAYXAY, M.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; NEWTON P.N.; WHITE N.J. Mixed-species malaria infections in humans. *Trends in Parasitology*, v.20, n.5, 2004.

MARQUES, A.C.; GUTIERREZ, H.C. Combate a malária no Brasil, situação atual e perspectiva. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.27, p.91-108, 1994.

MCNAMARA, D.T.; KASEHAGEN, L.J.; GRIMBERG, B.T.; COLE-TOBIAN, J.; COLLINS, W.E.; ZIMMERMAN, P.A. Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.73, n.3, p.413-421, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE – FUNASA. *Manual de Terapêutica da Malária*. Brasília-DF, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Programa nacional de controle da malária - PNCM*. Brasília-DF, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAÚDE. *Situação epidemiológica da malária no Brasil*. Brasília-DF, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: SIVEP-MALARIA - Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp>. Acesso em 01 julho 2006.

MENDIS, K.; SINA, B.J.; MARCHESINI, P.; CARTER, B. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 64, n.1-2 Suppl, p.97-106, Jan-Fev. 2001.

MILNE, L.M.; KYI, M.S.; CHIODINI, P.L.; WARHURST, D.C. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *Journal of Clinical Pathology*, v.47, p.740-742, 1994.

MONBRISON, F.; ANGEI, C.; STAAL, A.; KAISER, K.; PICOT, S. Simultaneous identification of the four *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v.97, p.1-4, 2003.

MOODY, A. Rapid diagnostic test for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.1, p.66-78, 2002.

MORASSIN, B.; FABRE, R.; BERRY, A.; MAGNAVAL, J.F. One year's experience with polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.66, n.5, p.503-508, 2002.

MURRAY, C.K.; BELL, D.; GASSER, R.A.; WONGSRICHANALAI, C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Tropical Medicine and International Health*, v.8, n.10, Oct, p. 876-883, 2003.

NEVES, Davi P. *Parasitologia humana*. 9ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

NDAO, M.; BANDYAYERA, E.; KOKOSKIN, E.; GYORKOS, T.W.; MACLEAN, J.D.; WARD, B.J. Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.6, p.2694-2700, 2004.

NSOBYA, S.L.; PARIKH, S.; KIRONDE, F.; LUBEGA, G.; KAMYA, M.R.; ROSENTHAL, P.J.; DORSEY, G. Molecular evaluation of the natural history of asymptomatic parasitemia in Ugandan children. *The Journal of Infectious Diseases*, v.189, p.2220-2226, 2004.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OPAS/OMS). *Situación de los programas de malaria en las Americas*, XLIII, informe. CD38/ INF/ 2: p.1-15, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v.94 Suppl 1, p.S1-90, 2000.

PERANDIN, F.; MANCA, N.; CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GALATI, L.; RICCI, L.; MEDICI, M.C.; ARCANGELETTI, M.C.; SNOUNOU, G.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. Development of a Real-Time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.3, p.1214-1219, 2004.

PEREIRA, M.G. *Epidemiologia – Teoria e Prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 596p.

PIYAPHANEE, W.; KRUDSOOD, S.; TANGPUKDEE, N.; THANACHARTWET, W.; SILACHAMROON, U.; PHOPHAK, N.; DUANGDEE, C.; HAOHARN, O.; FAITHONG, S.; WILAIRATANA, P.; LEOWATTANA, W.; LOOAREESUWAN, S. Emergence and clearance of gametocytes in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.74, n.3, p.432-435, 2006.

ROLL BACK MALARIA. Disponível em: <<http://rbm.who.int>>. Acesso em 10.out.2005.

ROUGEMONT, M.; SAANEN, M.V.; SAHLI, R.; HINRIKSON, H.P.; BILLE, J.; JATON, K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.12, p.5636-5643, 2004.

SCHNEIDER, P.; BOUSEMA, T.; OMAR, S.; GOUAGNA, L.; SAWA, P.; SCHALLIG, H.; SAUERWEIN, R. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *International Journal of Parasitology*, v.36, n.4, p.403-408, 2006.

SCHNEIDER, P.; WOLTERS, L.; SCHOONE, G.; SCHALLIG, H.; SILLEKENS, P.; HERMSEN, R.; SAUERWEIN, R. Real-Time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.1, p.402-405, 2005.

SCOPEL, K.K.G.; FONTES, C.J.F.; NUNES, A.C.; HORTA, M.F.; BRAGA, E.M. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malaria Journal*, v.3, n.8, 2004.

SHERMAN, I.W. *Malaria: parasite biology, pathogenesis, and protection*. American Society for Microbiology: Washington D.C., 1998.

SIRIBAL, S.; NAKASIRI, S.; LOOAREESUWAN, S.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P. Identification of human malaria parasites and detection of mixed infection in

Thai patients by nested PCR. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.35, suppl 2, p.5-9, 2004.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology*, v.27, n.10, p.1135-1145, 1997.

SMALLEY, M.E. Plasmodium falciparum gametocytes: The effect of chloroquine on their development. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v.71, n.6, p.526-529, 1977.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, n.58, p.283-292, 1993a.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; ZHU, X.P.; JARRA, W.; PINHEIRO, L.; ROSARIO, V.E.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, n.61, p.315-320, 1993b.

SUH, K.N.; KAIN, K.C.; KEYSTONE, J.S. Malaria. *Canadian Medical Association Journal*, v.170, n.11, p.1693-1702, 2004.

SUTHERLAND, C.J.; ALLOUECHE, A.; CURTIS, J.; DRAKELEY, C.J.; ORD, R.; DURASINGH, M.; GREENWOOD, B.M.; PINDER, M.; WARHURST, D.; TARGETT, G.A.T. Gambia children successfully treated with chloroquine can harbor and transmit *Plasmodium falciparum* gametocytes carrying resistance genes. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.67, n.6, p.578-585, 2002.

SWAN, H.; SLOAN, L.; MUYOMBWE, A.; CHAVALITSHEWINKOON-PETMITR, P.; KRUDSOOD, S.; LEOWATTANA, W.; WILAIRATANA, P.; LOOAREESUWAN, S.; ROSENBLASS, J. Evaluation of real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.73, n.5, p.850-854, 2005.

TADEI, W.P. & DUTARY-THATCHER, B. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.42, n.2, p.87-94, 2000.

TALMAN, A.M.; DOMARLE, O.; MCKENZIE, F.E.; ARIEL, F.; ROBERT, V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, v.3, n.24, 2004.

TASANOR, O.; RUENGWEERAYUT, R.; SIRICHAISINTHOP, J.; CONGPUONG, K.; WERNSDORFER, W.H.; NA-BANGCHANG, K. Clinical-parasitological response and in-vitro sensitivity of *Plasmodium vivax* to chloroquine and quinine on the western border of Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v.100, p.410-418, 2006.

TORRES, K.L.; FIGUEIREDO, D.V.; ZALIS, M.G.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; ALECRIM, W.; FERREIRA-DA-CRUZ, M.F. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. *Parasitology Research*, v.98, n.6, p.519-524, 2006.

TIRASOPHON, W.; RAJKULCHAI, P.; PONGLIKITMONGKOL, M.; WILAIRAT, P.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S. A highly sensitive, rapid, and simple polymerase chain reaction-based method to detect human malaria (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*) in blood samples. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v.51, n.3, p.308-313, 1994.

VIEIRA, P.P.; ALECRIM, M.G.C.; SILVA, L.H.P.; GONZÁLEZ-JMÉNEZ, I.; ZALIS, M.G. Analysis of the PFCRT K 76T mutation in *Plasmodium falciparum* isolates from brazilian amazon. *Journal of Infectious Diseases*, v.183, n.12, 2001.

WARGO, A.R.; RANDLE, N.; CHAN, B.H.K.; THOMPSON, J.; READ, A.F.; BABIKER, H.A. *Plasmodium chabaudi*: reverse transcription PCR for the detection and quantification of transmission stage malaria parasites. *Experimental Parasitology*, v.112, p.13-20, 2006.

WHILEY, D.M.; LE-CORNEC, G.M.;BADDELEY, A.; SAVILL, J.; SYRMIS, M.W.; MACKAY, I.M.; SIEBERT, D.J.; BURNS, D.; NISSEN, M.; SLOOTS, T.P. Detection and differentiation of *Plasmodium* species by polymerase chain reaction and colorimetric detection in blood samples of patients with suspected malaria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.49, p.25-29, 2004.

WARHURST, D.C.; WILLIAMS, J.E. Laboratory diagnosis of malaria. *Journal of Clinical Pathology*, v.49, p.533-538, 1996.

WILSON, P.E.; ALKER, A.P.; MESHNICK, S.R. Real-time PCR methods for monitoring antimalarial drug resistance. *Trends in Parasitology*, v.21, n.6, p.278-283, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 - TCLE- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Caracterização molecular e fenotípica de isolados de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* de localidades endêmicas do Estado do Amazonas.

Patrocinador: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

Equipe responsável: Dr. Pedro Paulo Vieira

Dra. Mônica Regina Costa Manso

Dra. Maria das Graças Costa Alecrim

Cynthia de Oliveira Ferreira

Descrição e objetivo do estudo

Trata-se de um estudo laboratorial, descritivo, prospectivo, em amostras de sangue total de pacientes, oriundos da demanda natural, que procuram a FMTAM para diagnóstico da malária e de pacientes residentes em diferentes regiões malarígenas no estado do Amazonas. Este estudo tem por objetivo a caracterização genética de diferentes populações de plasmódios e análise da presença de genes de resistência aos antimaláricos em isolados de parasitas provenientes de diferentes localidades endêmicas do estado do Amazonas.

Riscos associados ao estudo

Retirada de amostra de sangue: o meu maior desconforto é no momento em que a pele for ferida por uma agulha.

Benefícios

Participando neste estudo, nem eu/ou meu filho obteremos qualquer benefício adicional, mas estaremos contribuindo para o conhecimento de quantas pessoas são afetadas por este tipo de doença.

Confidencialidade e avaliação dos registros

Minha participação (ou de meu filho) neste estudo será confidencial e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados apenas a representantes da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, bem como a autoridades normativas

nacionais ou internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisas clínicas ou para fins normativos. Minha identidade (de meu filho) permanecerá sempre em confidencialidade.

Direito à retirada do estudo

Eu tenho direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos para mim/meu filho durante minha (dele/dela) participação neste estudo.

Eu tenho direito de retirar minha participação/ de meu filho neste estudo a qualquer momento.

Participação voluntária

A minha participação/ de meu filho neste estudo é voluntária. Se eu (ele/ela) recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que eu / meu filho tenha direito.

Eu tenho direito de manter uma cópia assinada deste documento.

Em caso de necessidade poderei entrar em contato com o Dr. Pedro Paulo Vieira ou a Dra. Mônica Regina Costa Manso pelo telefone 238-1711 ramal 219 (Gerência de Malária).

Consentimento Pós-informação

E, por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, expresse meu consentimento para minha inclusão, como sujeito, nesta pesquisa.

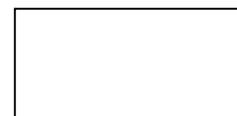
Paciente ou representante legal

Data

Pesquisador responsável

Data

Impressão dactiloscópica (p/ analfabeto)



ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - FMTAM



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

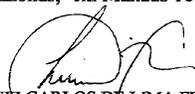
IDENTIFICAÇÃO

Número do Processo: 2637/2003-FMTAM
Título do Projeto: Caracterização molecular e fenotípica de isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* de localidades endêmicas do Estado do Amazonas.
Coordenador (a): Mônica Regina Costa Manso
Relator (a) do Processo: Dra. Marilaine Martins
Dia da Sessão: 18/12/2003

DECISÃO

Nesta data, acatando, por unanimidade, o voto do relator, a plenária do Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** plenamente o projeto intitulado "Caracterização molecular e fenotípica de isolados de *P. falciparum* e *P. vivax* de localidades endêmicas do Estado do Amazonas".

Plenária do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, em Manaus 18 de dezembro de 2003.


DR. LUIZ CARLOS DE LIMA FERREIRA
Coordenador de Ética em Pesquisa

ANEXO 3 - Diagnóstico microscópico pela gota espessa

Diagnóstico laboratorial mais utilizado para a detecção de plasmodio na rotina de exames para malária no Brasil. Consiste na visualização do plasmódio nos estágios encontrados no sangue, permitindo tanto a identificação da espécie, quanto especificar o estágio de desenvolvimento do parasita, fornecendo informações sobre sua a viabilidade e quantificação (Neves et al, 1998).

Esse teste é realizado pelos técnicos da FMTAM, e por funcionários dos postos de saúde (FUNASA), espalhados pelo interior do estado, quando o paciente procura o serviço de assistência médica com sintomas clínicos da doença.

A coleta do material para esse tipo de exame é realizada por punção digital de aproximadamente 0,25µl de sangue em lâmina de vidro, segundo as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS). A secagem da lâmina pode ser em estufa a 37°C ou em temperatura ambiente. A coloração da lâmina é com Giemsa diluído em pH de 7,2, onde o núcleo cora de vermelho e o citoplasma cora de azul, baseado no método de coloração de Walker. A visualização da lâmina é em microscópio óptico com objetiva de 100x e ocular de 10x. A leitura é feita em 100 campos e quando há duvida do resultado, é realizada uma revisão em 500 campos (Anexo 2).

O limite de detecção dos parasitas pelos técnicos é de 10-20 parasitas por µl de sangue, que corresponde a 0,004% da parasitemia. O resultado do diagnóstico é expresso em cruces após exame de 100 campos microscópicos, onde:

Meia cruz: Até 40 parasitas nos 100 campos

+ : 41 – 100 parasitas nos 100 campos, corresponde a 1 parasita por campo

++ : 2 – 20 parasita por campo

+++ : 21 – 200 parasitas por campo

++++: > 201 parasitas por campo

ANEXO 4 - Esquema de tratamento para a malária utilizado na FMTAM

MALÁRIA NÃO-GRAVE (PARASITEMIA MENOR OU IGUAL A ++) PELO *P. vivax*

ADULTOS											
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Cloroquina (VO) 150mg	4 comp	3 comp	3 comp	-	-	-	-	-	-	-	-
Primaquina (VO) 15mg	-	-	-	-	2 comp						
CRIANÇAS											
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Cloroquina (VO) 150mg	10 mg/kg	7,5 mg/kg	7,5 mg/kg	-	1 ou 2 comp						

MALÁRIA NÃO-GRAVE PELO *P. falciparum*

1ª ESCOLHA: ADULTOS					
	D0	D1	D2	D3	D4
Quinino (VO) 500mg	1 comp. 8/8h	1 comp. 8/8h	1 comp. 8/8h	-	-
Doxicilina (VO) 100mg	1 comp. 12/12h				

O esquema com uso de doxicilina é prescrito para pacientes abaixo de 12 anos e pacientes gestantes.

1ª ESCOLHA: GESTANTES E CRIANÇAS (2ª ESCOLHA PARA ADULTOS)						
	D0	D1	D2	D3	D4	
Mefloquina (VO) 250mg 20mg/kg	4 comp. (2 comp+2 comp após 6 horas)	-	-	-	-	

Nos pacientes com malária mista (concomitância da infecção pelo *P. falciparum* e *P. vivax*), o tratamento será realizado como se fora para malária *falciparum* (seguir a mesma rotina de acordo com a parasitemia e a gravidade clínica), associando-se, ao final, a mesma dosagem de primaquina preconizada para o tratamento da malária *vivax*.

ANEXO 5 - Protocolo de extração de DNA

Kit UltraClean — MO BIO Laboratories

Componentes	Quantidade	Descrição
Proteinase K	31.25 mg	Proteinase K
Solução Bi	55 ml	Guanidina HCl/Tween
Solução B2	55 ml	100% etanol
Solução B3	137.5 ml	Etanol/Guanidina HCl
Solução 84	160 ml	Etanol, Tris-HCl
Solução B5	55 ml	10 mM Tris-HCl
Filtros/colunas	250	Coluna/tubo 2.0 ml
Tubos de 2.0 ml	750	Tubos de microcentrífuga

Obs. Adicionar 5.5 ml de água destilada à Proteinase K liofilizada.

Proteinase K reconstituída é estável por 02 meses acondicionada à 4°C. Em alíquotas e armazenadas à - 20°C, validade prolongada.

Soluções B2,B3 e B4 são inflamáveis.

Utilizar luvas durante todo o processo de extração.

1. Em tubo de 1,5 ml (ependorf- não fornecido no kit) colocar 20 de Proteinase K, adicionar 200µL de sangue total
Opcional: Rnase A pode ser adicionada a esta etapa. Usar 2itL de 20mg/ml
2. Adicionar 200 µL de solução B1
3. Vortex por 15 segundos
4. Incubar a 65°C por 10 minutos
5. Centrifugar brevemente para remover gotas da tampa
6. Adicionar 200µL de solução B2
7. Vortex por 15 segundos
8. Centrifugar brevemente para remover gotas da tampa
9. Transferir toda mistura para uma coluna
10. Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos
11. Transferir a coluna para um tubo limpo/novo
12. Adicionar 500µL de solução B3 à coluna
13. Centrifugar a 11000 rpm por 1 minuto
14. Remover a coluna, desprezar o filtrado, recolocar a coluna
15. Adicionar 500µL de solução B4 à coluna
16. Centrifugar a 11000 rpm por 1 minuto
17. Remover a coluna, desprezar o filtrado, recolocar a coluna
18. Centrifugar novamente a 11000 rpm por 1 minuto
19. Remover a coluna para um tubo limpo/novo identificado com identificação e data das amostras
20. Adicionar 200 µL de solução B5 à coluna
21. Incubar a 65°C por 5 minutos
22. Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos
23. Remover a coluna. Armazenar o extrato a — 20°C

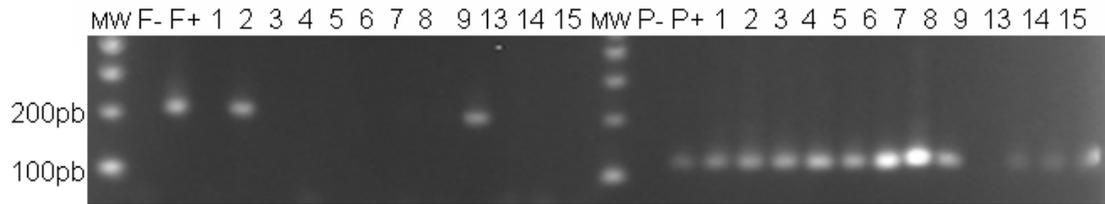
ANEXO 6 - Protocolo de Extração de DNA - CHELEX 10%

1. Colocar 1mL de água em tubo de 1,5 ml
 2. Adicionar a amostra (papel de filtro)
- Obs:** Dobrar o papel de filtro com sangue e retirar 1 bolinha de 1mm
3. Homogeneizar levemente e incubar em temperatura ambiente por 30 minutos
 4. Centrifugar por 3 minutos a 14.000 rpm
 5. Retirar o sobrenadante (cerca de 920 μ L). Deixar o papel.
 6. Adicionar 150 μ L de Chelex 10%
 7. Incubar a 56°C por 30 minutos
 8. Vortex por 10 segundos
 9. Incubar a 100°C por 10 minutos
 10. Vortex por 10 segundos
 11. Centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm
 12. Armazenar em freezer

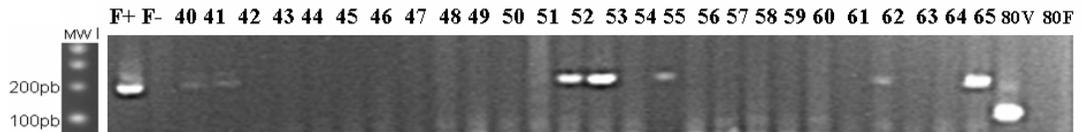
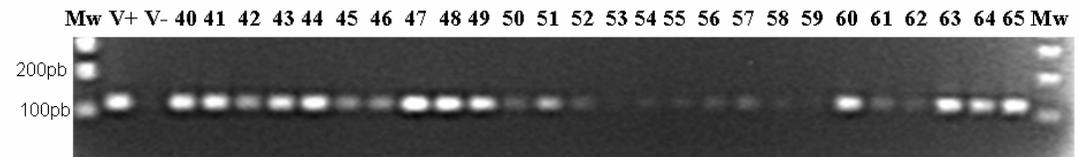
OBS.: Quando utilizar o extrato de DNA: vortex, centrifugar por 3 minutos a 14000 rpm

Chelex 10% - autoclavar a solução e durante o uso manter em agitação com magnético.

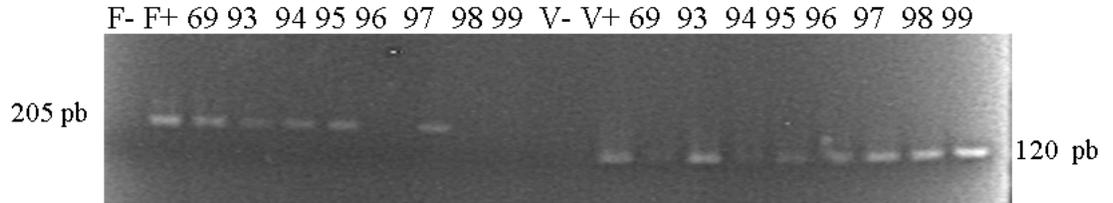
ANEXO 7 - Géis do diagnóstico molecular em D0



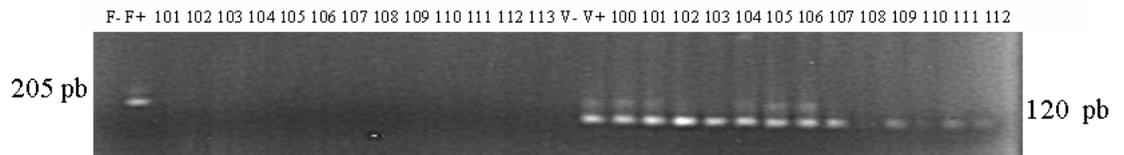
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*



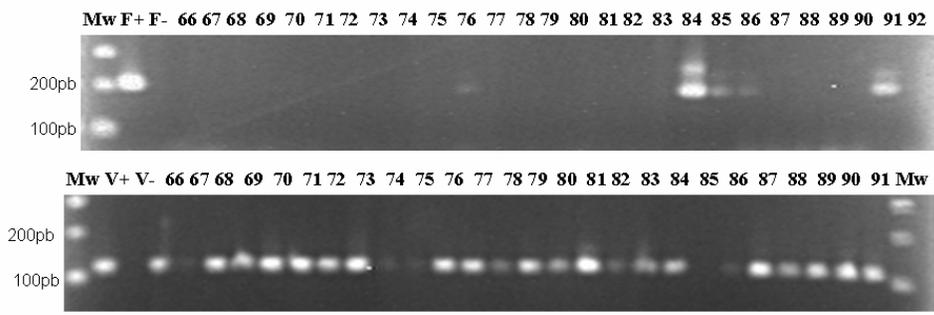
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*



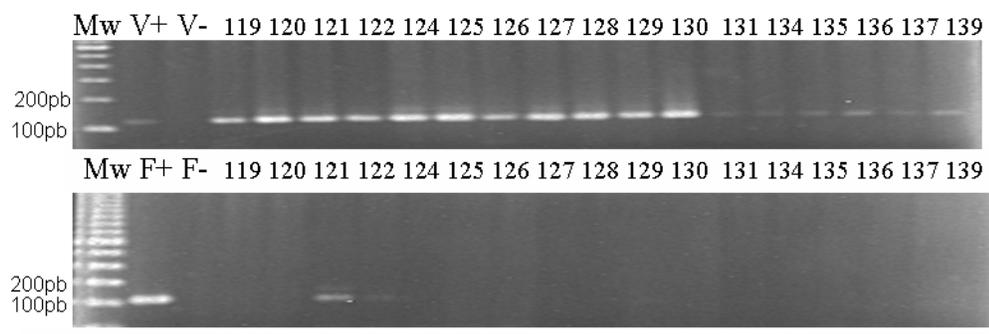
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*



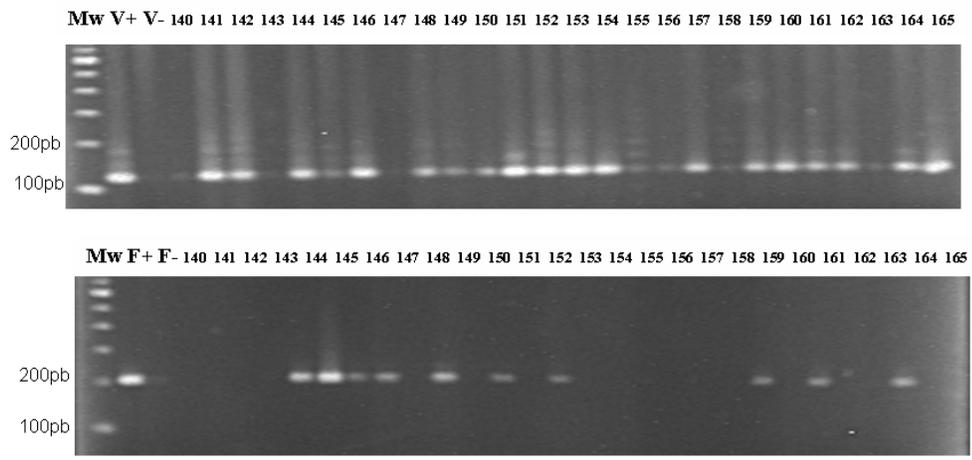
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*

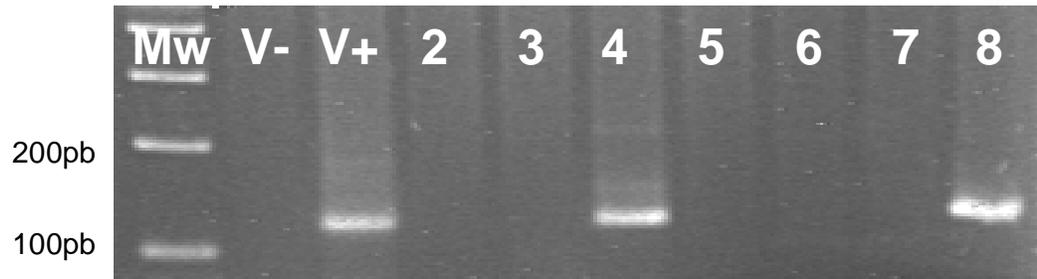


Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*

ANEXO 8 - Géis do diagnóstico molecular para *P. vivax* em D7



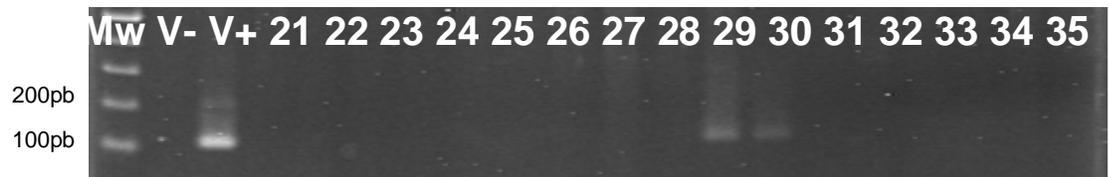
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*; 205pb = *P. falciparum*



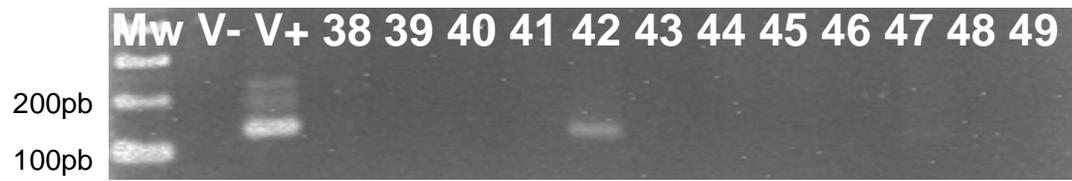
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



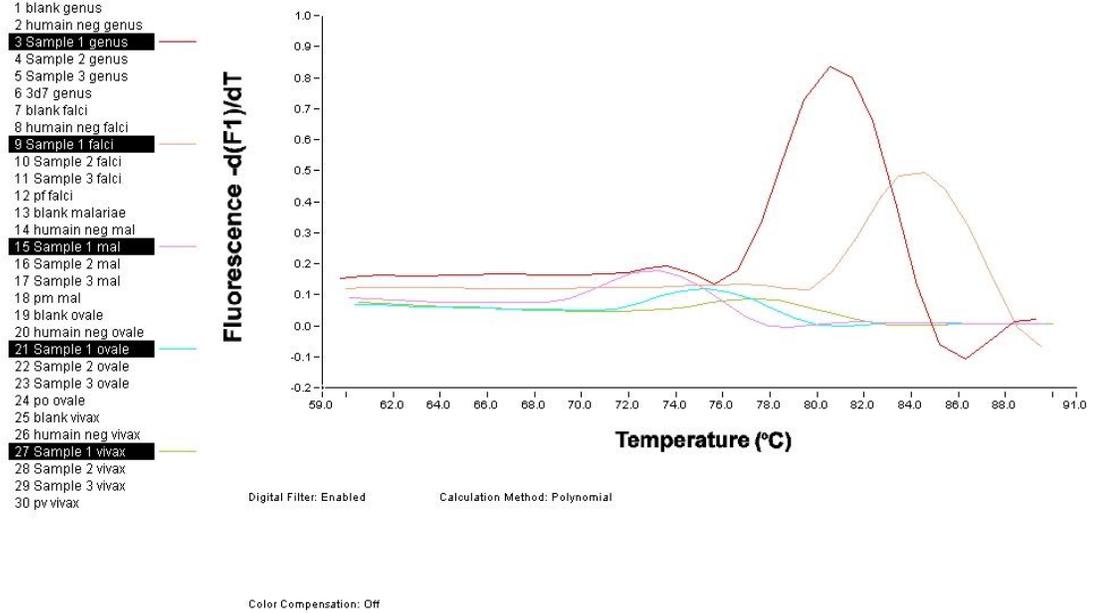
Legenda: bandas de 120pb = *P. vivax*



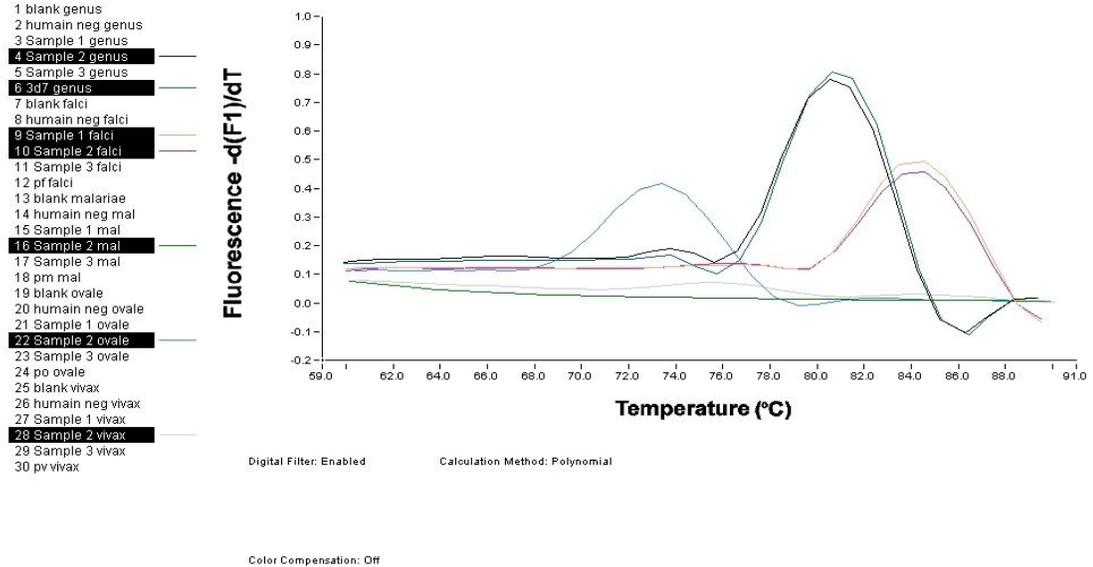
Legenda: bandas de 205pb = *P. falciparum*

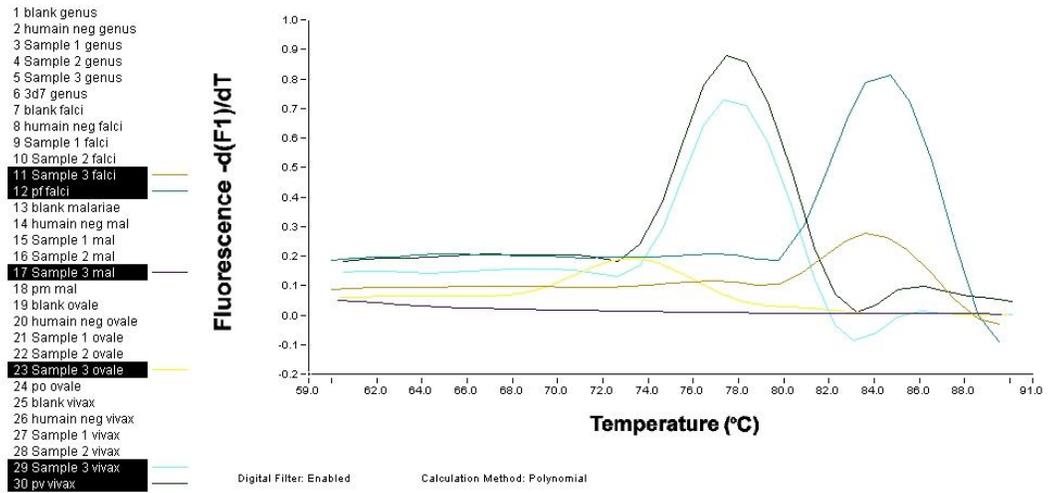
ANEXO 9 - Gráficos de diagnóstico por PCR em tempo real

File: C:\Program Files\lightcycler3.5\Users\lightcycler\Data\pedro paulo\010705.ABT Program: melting Run By: lightcycler
Run Date: Jul 01, 2005 17:20 Print Date: July 21, 2005

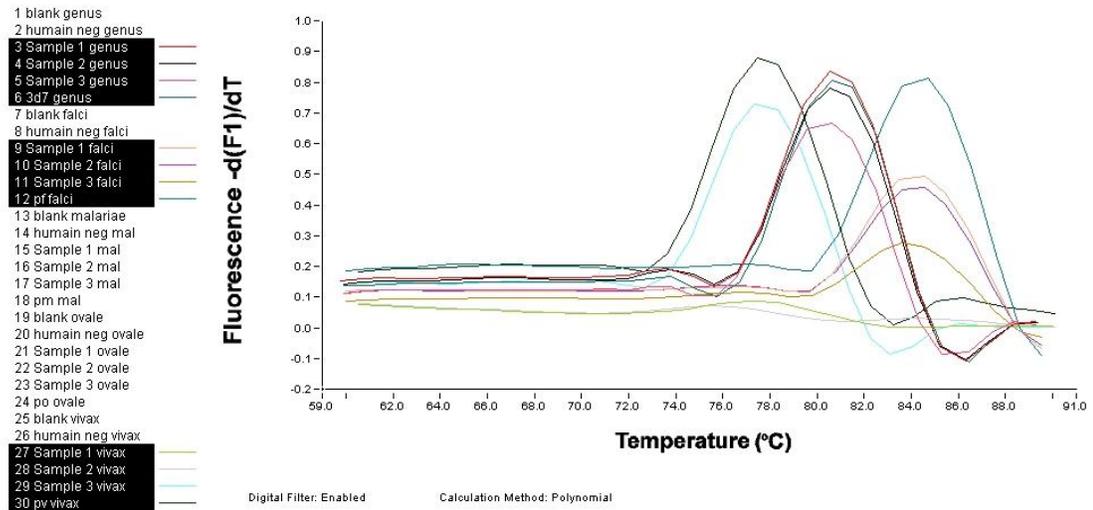


File: C:\Program Files\lightcycler3.5\Users\lightcycler\Data\pedro paulo\010705.ABT Program: melting Run By: lightcycler
Run Date: Jul 01, 2005 17:20 Print Date: July 21, 2005



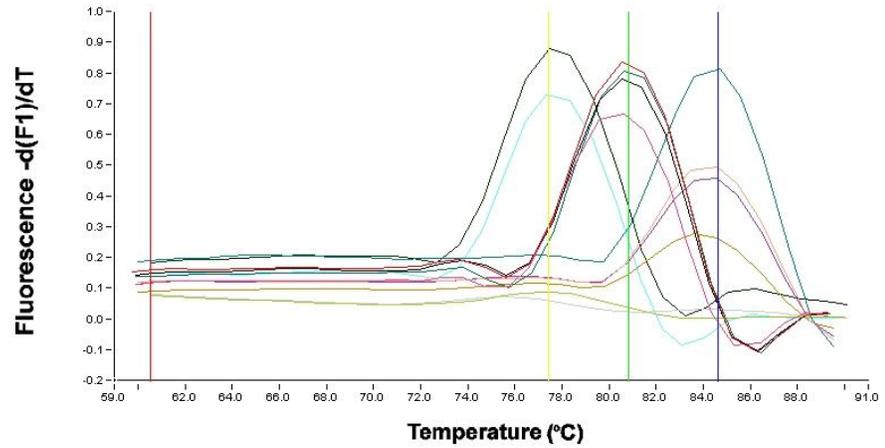


Color Compensation: Off



Color Compensation: Off

- 1 blank genus
- 2 humain neg genus
- 3 Sample 1 genus
- 4 Sample 2 genus
- 5 Sample 3 genus
- 6 3d7 genus
- 7 blank falci
- 8 humain neg falci
- 9 Sample 1 falci
- 10 Sample 2 falci
- 11 Sample 3 falci
- 12 pf falci
- 13 blank malariae
- 14 humain neg mal
- 15 Sample 1 mal
- 16 Sample 2 mal
- 17 Sample 3 mal
- 18 pm mal
- 19 blank ovale
- 20 humain neg ovale
- 21 Sample 1 ovale
- 22 Sample 2 ovale
- 23 Sample 3 ovale
- 24 po ovale
- 25 blank vivax
- 26 humain neg vivax
- 27 Sample 1 vivax
- 28 Sample 2 vivax
- 29 Sample 3 vivax
- 30 pv vivax

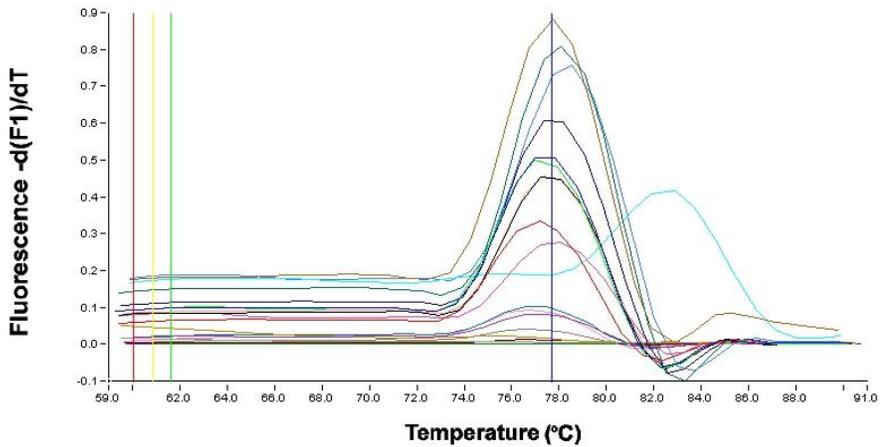


Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 8.4 Red cursor Tm = 60.5388 Yellow cursor Tm = 77.4436 Green cursor Tm = 80.8068

Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 84.6430

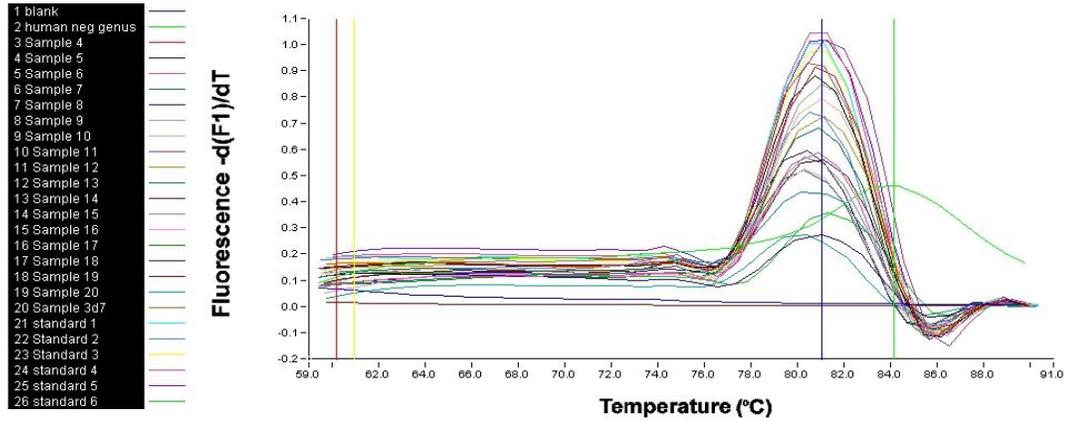
- 1 Sample 4
- 2 Sample 5
- 3 Sample 6
- 4 Sample 7
- 5 Sample 8
- 6 Sample 9
- 7 Sample 10
- 8 Sample 11
- 9 Sample 12
- 10 Sample 13
- 11 Sample 14
- 12 Sample 15
- 13 Sample 16
- 14 Sample 17
- 15 Sample 18
- 16 Sample 19
- 17 Sample 20
- 18 Sample 23
- 19 Sample 37
- 20 Pv+
- 21 human neg vivax
- 22 blank



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 7.6 Red cursor Tm = 60.0669 Yellow cursor Tm = 60.8529 Green cursor Tm = 61.6388

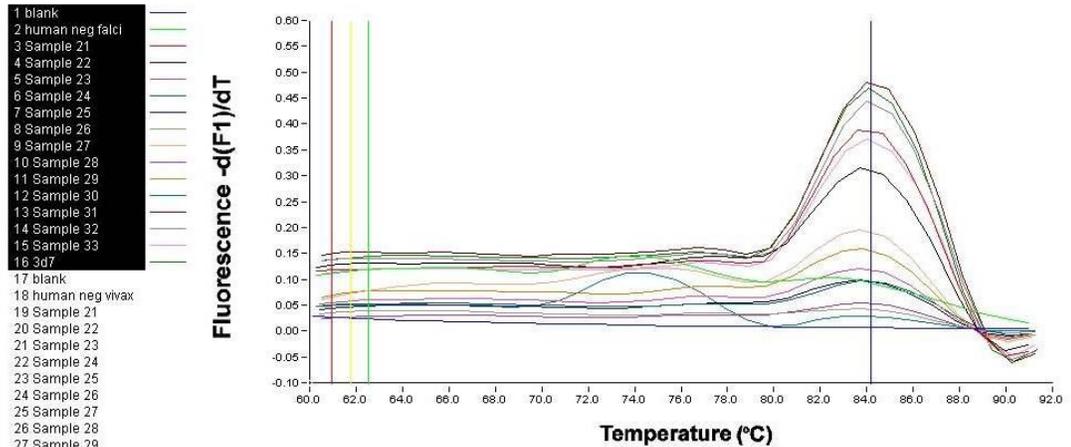
Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 77.7063



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 7.7 Red cursor Tm = 60.1795 Yellow cursor Tm = 60.9529 Green cursor Tm = 84.1378

Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 81.0658

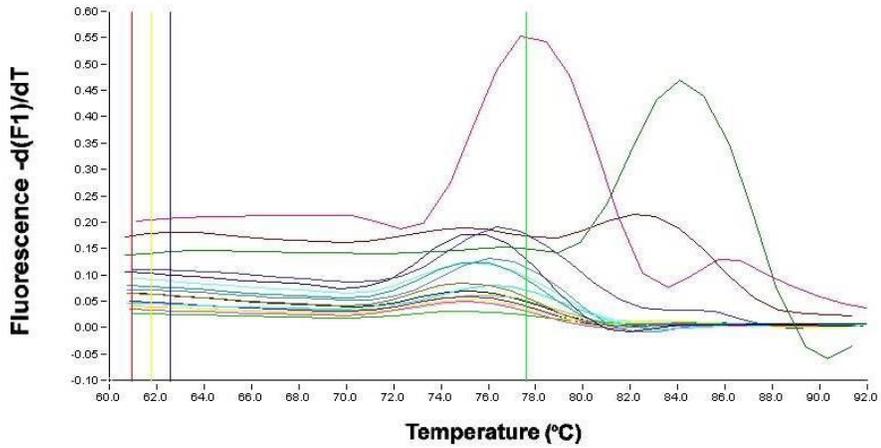


Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 9.0 Red cursor Tm = 60.9505 Yellow cursor Tm = 61.7451 Green cursor Tm = 62.5396

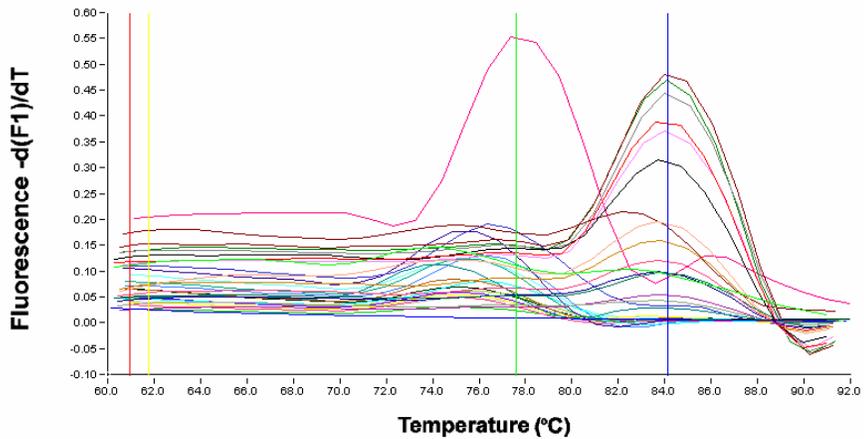
Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 84.1855

- 1 blank
- 2 human neg falci
- 3 Sample 21
- 4 Sample 22
- 5 Sample 23
- 6 Sample 24
- 7 Sample 25
- 8 Sample 26
- 9 Sample 27
- 10 Sample 28
- 11 Sample 29
- 12 Sample 30
- 13 Sample 31
- 14 Sample 32
- 15 Sample 33
- 16 3d7
- 17 blank
- 18 human neg vivax
- 19 Sample 21
- 20 Sample 22
- 21 Sample 23
- 22 Sample 24
- 23 Sample 25
- 24 Sample 26
- 25 Sample 27
- 26 Sample 28
- 27 Sample 29
- 28 Sample 30
- 29 Sample 31
- 30 Sample 32
- 31 Sample 33
- 32 pv +



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial
 Degrees to Average: 9.0 Red cursor Tm = 60.9505 Yellow cursor Tm = 61.7450 Green cursor Tm = 77.6074
 Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 62.5719

- 1 blank
- 2 human neg falci
- 3 Sample 21
- 4 Sample 22
- 5 Sample 23
- 6 Sample 24
- 7 Sample 25
- 8 Sample 26
- 9 Sample 27
- 10 Sample 28
- 11 Sample 29
- 12 Sample 30
- 13 Sample 31
- 14 Sample 32
- 15 Sample 33
- 16 3d7
- 17 blank
- 18 human neg vivax
- 19 Sample 21
- 20 Sample 22
- 21 Sample 23
- 22 Sample 24
- 23 Sample 25
- 24 Sample 26
- 25 Sample 27
- 26 Sample 28
- 27 Sample 29
- 28 Sample 30
- 29 Sample 31
- 30 Sample 32
- 31 Sample 33
- 32 pv +



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial
 Degrees to Average: 9.0 Red cursor Tm = 60.9505 Yellow cursor Tm = 61.7450 Green cursor Tm = 77.6074
 Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 84.1380