



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE ANTICORPOS
POLICLONAIS ANTI-LDH DE *Plasmodium vivax* PARA O
DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA**

LUCIANA PEREIRA DE SOUSA

MANAUS-AMAZONAS

2012

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Sousa, Luciana Pereira de

725d Desenvolvimento e análise de anticorpos policlonais anti-
Idh de *Plasmodium vivax* para o diagnóstico de malária /
Luciana Pereira de Sousa. - Manaus: UFAM, 2012.
120 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Imunologia) — Universidade
Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

Orientador: Dr. Luís André Moraes Mariuba

Co-orientador: Dr. Paulo Afonso Nogueira

1. Malária - Diagnóstico 2. Epidemiologia 3. Proteína
recombinante - Análise I. Mariuba, Luís André Moraes(Orient.)
II. Nogueira, Paulo Afonso III. Universidade Federal do
Amazonas IV. Título

CDU (2007): 616.936(043.3)

LUCIANA PEREIRA DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE ANTICORPOS POLICLONAIS
ANTI-LDH DE *Plasmodium vivax* PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada da Universidade Federal
do Amazonas como parte do pré-requisito
para a obtenção do título de mestre em
Imunologia na área de concentração
“*Imunologia Básica e Aplicada*”.

APROVADA EM: _____

BANCA EXAMINADORA

Dr Luis Andre Moraes Mariuba, Presidente
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – FIOCRUZ AMAZÔNIA

Dra Maria Cristina Dos Santos, Membro
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, UFAM

Dra Sandriana dos Ramos Silva, Membro
INSTITUTO PAUSTER, SP

MANAUS – AMAZONAS

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Ata da defesa de Dissertação da aluna
Luciana Pereira de Sousa, em 12 de
novembro de 2012.

Aos doze dias do mês de novembro do ano de dois mil e doze, às nove horas, no auditório do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, a discente deste Programa, **Luciana Pereira de Sousa**, orientada pelo Professor Doutor Luís André Morais Mariúba (FIOCRUZ/AM) e co-orientada pelo Professor Doutor Paulo Afonso Nogueira (FIOCRUZ-AM), apresentou à banca examinadora sua dissertação intitulada "*Desenvolvimento e Análise de Anticorpos Policlonais Anti-LDH de Plasmodium vivax para o Diagnóstico de Malária*". A banca examinadora composta pelos seguintes membros: Professor Doutor Luís André Morais Mariúba (Orientador e Presidente), Professora Doutora Sandriana dos Ramos Silva (Instituto Pasteur-SP) e Professora Doutora Maria Cristina dos Santos (PPGIBA-UFAM), decidiu, após a apresentação e arguição, pela aprovação (X) ou não aprovação () de sua dissertação.

Professor Doutor Luís André Morais Mariúba (Presidente)

Professora Doutora Sandriana dos Ramos Silva (Membro)

Professora Doutora Maria Cristina dos Santos (Membro)

DEDICATÓRIA

Em memória do meu anjo amado e grande amigo pai **Nilomar Lopes de Sousa**.

À minha mãe **Laiz Sousa**, ao meu esposo **Rodrigo Vieira**, aos meus **familiares e amigos** que torceram e sempre torcerão pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à **Deus** por ter iluminado o meu caminho, cobrindo-me de muita persistência, perseverança e esperança ao longo de toda a jornada de estudos e experimentos para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu brilhante e ilustre Orientador, **Dr Luis Andre Moraes Mariuba**, pelo acompanhamento em todas as etapas do projeto, sempre com boa vontade, dedicação, paciência e competência.

Ao meu Co-Orientador, **Dr Paulo Afonso Nogueira**, pelo suporte para a realização da pesquisa.

Ao meu amado e querido esposo, **Rodrigo Vieira**, pela paciência e compreensão ao longo do desenvolvimento intelectual e experimental do projeto.

À minha amada mãe, **Laiz Pereira**, pelos conselhos e ombro amigo nas horas difíceis no decorrer do desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos e colegas do laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ - AMAZÔNIA), **Davi Borges, Leidiane Amorim, Edilene Martins, Yury Chaves e Karen Balieiro**, pelos momentos de descontração nos intervalos dos experimentos.

À **FIOCRUZ – AMAZÔNIA**, pelo suporte estrutural, de fundamental importância para a realização do projeto.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro ao longo do desenvolvimento do projeto.

***“Eu, o SENHOR, sou o Deus de
você e estarei sempre com você.”***

Lv 26.12

RESUMO

A malária é um dos mais sérios problemas de saúde pública do mundo, sendo responsável por elevada morbidade e mortalidade. O diagnóstico mais utilizado continua sendo a microscopia, contudo esta metodologia exige infraestrutura adequada e profissionais altamente qualificados para a realização dos exames, tornando-se inviável em áreas de difícil acesso. Testes para o diagnóstico rápido e simples de malária estão disponíveis no mercado, porém nenhum de origem nacional, dificultando a implantação pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Diante desta problemática, o presente estudo tem como principal objetivo a produção de Lactato Desidrogenase de *Plasmodium vivax* (pVLDH), visando o desenvolvimento de anticorpo os policlonais anti-LDH capazes de detectar o antígeno nativo em amostras sanguíneas de pacientes infectados com a pretensão de oferecer perspectivas para a elaboração de um teste diagnóstico rápido para a Malária. Para isto, a proteína pVLDH foi produzida pela tecnologia do DNA recombinante em células hospedeiras quimicamente competentes. Logo, a proteína foi purificada para a imunização de coelho e camundongos Balb/c. A resposta dos animais as inoculações assim como o desempenho dos anticorpos policlonais anti-LDH no reconhecimento do antígeno nativo foram avaliados por ensaios imunoenzimáticos ELISA indireto e em sistema sanduíche, respectivamente. Os animais demonstraram boa resposta de anticorpos anti-pVLDH após a terceira imunização de proteína recombinante, sendo a resposta de anticorpos do coelho superior a resposta dos camundongos, com valores de absorbância de até 2.600 e 2.100, respectivamente. Os anticorpos policlonais anti-pVLDH foram capazes de reconhecer a proteína LDH nativa em 131 amostras de 154 amostras positivas para malária e incapazes de reconhecer isoformas de LDH humana quando avaliados em relação a amostras negativas para malária, uma vez que das 24 amostras negativas avaliadas, todas se mantiveram também negativas nos ensaios. A proposta idealizada neste trabalho se mostrou extremamente viável e promissora. Os resultados obtidos neste estudo corresponderam às expectativas e forneceram perspectivas futuras no que diz respeito à utilização da pVLDH recombinante para a produção de anticorpos policlonais e monoclonais funcionais, em modelo murino, para a utilização em teste diagnóstico rápido (TDR) para a malária, na tentativa de oferecer alternativas ao diagnóstico no Brasil, ou para a utilização em imunoenensaio visando o monitoramento do curso da doença.

Palavras chaves: Malária, Diagnóstico, Proteína Recombinante e Anticorpo.

ABSTRACT

Malaria is one of the most serious public health problems in the world, accounting for high morbidity and mortality. The diagnosis remains the most widely used microscopy, however this approach requires adequate infrastructure and highly skilled professionals for the exams, making it unfeasible in areas of difficult access. Tests for the rapid and simple diagnosis of malaria are commercially available, but none of national origin, complicating the deployment by the Unified Health System (SUS). Faced with this problem, this study has as main objective the production of Plasmodium vivax Lactate Dehydrogenase (pLDH), aiming at the development of polyclonal antibodies anti-LDH able to detect the native antigen in blood samples from patients infected with the intention of offering future perspectives for the development of a rapid diagnostic test for malaria. For this, pvLDH protein was produced by recombinant DNA technology in host cells chemically competent. Therefore, it was purified to inoculation into rabbits and mice Balb /c. The response of the inoculated animals as well as the performance of polyclonal antibodies anti-LDH in the recognition of native antigen were assessed by ELISA immunoassays and sandwich system, respectively. The animals showed good antibody titers anti-pLDH after the third inoculation of the recombinant protein pLDH, and the rabbit antibody response than the response of mice with absorbance values at dilution 1/100, 2,600 and 2,100, respectively. Polyclonal antibodies anti-pLDH were able to recognize the native protein pLDH 131 samples to 154 samples positive malaria and incapable of recognizing human isoforms of LDH when evaluated against malaria negative samples, since the 23 negative samples evaluated, all also remained negative during the tests. The proposal idealized in this study proved extremely viable and promising. The results of this study meet expectations and provided future prospects as regards the use of recombinant pvLDH for the development of polyclonal and monoclonal antibodies functional in murine model for use in rapid diagnostic test (RDT) for malaria in attempt to offer alternatives to diagnosis in Brazil, or for use in immunoassay targeting the monitoring of the disease course.

Keywords: Malaria, Diagnosis, Recombinant Protein and Antibody.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo Biológico do Parasita <i>Plasmodium Sp.</i>	20
Figura 2 - Áreas de transmissão de malária no mundo.....	22
Figura 3 - Áreas de transmissão de malária no Brasil.....	23
Figura 4 - Diagnóstico microscópico de malária.....	26
Figura 5 - Princípios do ELISA indireto (A) e sanduíche (B)	29
Figura 6 - Princípios do ensaio imunocromatográfico..	30
Figura 7 - Interpretação de ensaio imunocromatográfico.....	32
Figura 8 - Purificação da proteína pvLDH35-305aa..	36
Figura 9 - ELISA sanduíche da pvLDH35-305aa..	37
Figura 10 - Amplificação dos genes de interesse para a construção da pvLDH 1-43aa e pvLDH 35-305aa.	43
Figura 11 - Ciclo de temperaturas utilizadas da PCR.....	44
Figura 12 - Sequência e Mapa do Plasmídeo pGEM..	46
Figura 13 - Sequência e Mapa do Plasmídeo pRSET A.	47
Figura 14 - Modelos experimentais do ELISA Sanduíche.....	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Condições da PCR utilizada para a amplificação do gene pLDH... 44	
Quadro 2 - Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados para a clonagem e expressão de pLDH..... 45	
Quadro 3 - Condição utilizada para a ligação do fragmento pvLDH 1-43aa em vetor de clonagem pGEM..... 48	
Quadro 4 - Condição utilizada para a digestão do vetor de clonagem pGEM.. 50	
Quadro 5 - Condição utilizada para a subclonagem de pvLDH 1-43aa..... 50	
Quadro 6 - Condição utilizada para a digestão do pRSET A. 51	

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
ADA	Adenosina deaminase
ATP	Trifosfato de adenosina
CEPEM	Centro de Pesquisas em Medicina Tropical/RO
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GPI	Glicosefosfato isomerase
GST	Glutathiona-S-transferase
HRP-2	Proteína 2 Rica em Histidina
H₂O₂	Água Oxigenada
IPA	Incidência Parasitária Anual
IRS	Pulverização Residual
LDH	Lactato Desidrogenase
mL	Mililitro
MS	Ministério da saúde
MTI	Mosquiteiros Tratados com Inseticidas
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotideo
Nm	Nanômetro
PCR	Reação da Cadeia Polimerase
PEPE	Peptidase E
PGD	Fosfogliconato desidrogenase
<i>p</i>LDH	Lactato Desidrogenase de <i>Plasmodium</i>
<i>pv</i>LDH	Lactato Desidrogenase de <i>Plasmodium vivax</i>
<i>pf</i>LDH	Lactato Desidrogenase de <i>Plasmodium falciparum</i>
TDR	Teste Diagnóstico Rápido
SIVEP	Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	Tetrametilbenzidine
µl	Microlitro
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1	Aspectos gerais da malária.....	17
1.1.1	Agentes etiológicos, vetores e quadro clínico	17
1.1.2	Ciclo biológico do parasita	19
1.1.3	Epidemiologia da malária.....	22
1.2	Diagnóstico de malária.....	25
1.3	Método laboratorial padrão	26
1.3.1	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (elisa) indireto e sanduíche.....	27
1.3.2	Testes imunocromatográficos: diagnóstico rápido de malária.....	29
1.4	Uso da enzima lactato desidrogenase para o diagnóstico de malária	33
1.5	Retrospectiva de trabalhos anteriores	36
2	OBJETIVO	39
2.1	Objetivos específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1	Modelo de estudo	42
3.2	Aspectos éticos da pesquisa.....	42
3.3	Desenho da amplificação do gene de lactato desidrogenase de <i>Plasmodium</i> . 43	
3.4	Extração de Dna genômico de <i>Plasmodium vivax</i>	44
3.5	Reação em cadeia da polimerase (pcr)	44
3.6	Eletroforese em gel de agarose e purificação de Dna	45
3.7	Clonagem e subclonagem de <i>pvdh1-43aa</i>	45
3.7.1	Plasmídeo de clonagem: pgem [®] -t easy vector.....	46
3.7.2	Plasmídeo de expressão – pRSET A.....	47
3.7.3	Ligação do fragmento pVLDH 1-43aa em vetor de clonagem pGEM 48	
3.7.4	Preparação de célula competente para a inserção do plasmídeo recombinante – transformação.....	48
3.7.5	Transformação de célula quimicamente competente	48
3.7.6	Lise de bactérias transformantes	49
3.7.7	Triagem das colônias por pcr usando primer sense e antisense 49	
3.7.8	Extração plasmidial	49
3.7.9	Digestão do vetor de clonagem com enzima de restrição EcoRI 50	

3.7.10	Subclonagem: ligação de fragmento pVLDH1-34aa em vetor de expressão pRSET A e transformação	50
3.7.11	Pcr de colônias transformantes e extração plasmidial (miniprep)	51
3.7.12	Digestão com enzima de restrição EcoRI E BamHI	51
3.7.13	Sequenciamento	52
3.7.14	Preparação de células eletrocompetentes	52
3.7.15	Transformação de células eletrocompetentes.....	52
3.8	Cultivo e indução de proteína pVLDH1-43aa recombinante.....	53
3.9	Análise de proteína	53
3.10	Purificação de proteína recombinante.....	54
3.11	Produção de anticorpos	54
3.12	ELISA indireto	54
3.13	Purificação de anticorpos e ELISA sanduíche	55
3.14	Análise dos dados	57
4	RESULTADOS.....	58
5	REFERÊNCIAS	73
6	APÊNDICE 1.....	81
6.1	Equipe Científica.....	81
7	ANEXO 1	82
7.1	Resultados não inclusos no artigo	82
8	ANEXO 2	87
8.1	Parecer do comitê de ética em experimentação animal	87
9	ANEXO 3	88
9.1	Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos	88
10	ANEXO 4	89
10.1	Artigo de revisão	89



Revisão da Literatura

1.1 Aspectos gerais da malária

1.1.1 Agentes etiológicos, vetores e quadro clínico

As doenças infecciosas têm seu destaque na história da humanidade por constituírem grandes problemas de saúde pública. A malária, primeiramente, descrita em 1880 pelo médico francês Charles Louis Alphonse Laveran, é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium Sp.* e uma das principais endemias mundiais que afligem o homem. Provavelmente, a sua origem foi na África há milhões de anos e acredita-se que a doença tenha se espalhado para regiões tropicais e subtropicais do mundo através de migrações, exploradores, missionários e escravos (Cox, 2002).

A Malária humana é uma doença infecciosa prevalente em áreas tropicais e subtropicais do mundo, é causada por protozoários pertencentes ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoa*, ordem *Coccidiida*, subordem *Haemosporidiidae*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*. Existem muitas espécies de Plasmódios capazes de infectar répteis, aves e mamíferos, mas apenas cinco espécies infectam o homem: o *P. malarie* (Laveran, 1881), *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welth, 1887), *P. ovale* (Stephens, 1922), o qual ocorre apenas em regiões restritas da África (MS, 2010), e *P. knowlesi*, recentemente descoberto em seres humanos, provavelmente, originado a partir do *P. malariae* (Singh et al., 2003) e ocorre somente em algumas áreas florestais do sudeste da Ásia (WHO, 2011).

Os insetos vetores são os responsáveis pela transmissão e manutenção da doença e pertencem à Classe *Insecta*; Ordem *Diptera*; Família *Culicidae*; Sub-família *Culicinae*; Tribo *Anophelini*. São distribuídos em dois gêneros *Chagasia* e

Anopheles, sendo este subdividido em sete subgêneros: *Anopheles*, *Stethomyia*, *Nyssorhynchus*, *Arribalzagia*, *Kertezia*, *Myzorhynchellae* *Lophopodomysia* (Lozovei, 2001). No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles (Nyssorhynchus) darling*, cujos criadouros preferências são ambientes com água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo, características estas muito frequentes na Amazônia brasileira (MS, 2010).

Os protozoários do gênero *Plasmodium* são parasitas intracelulares obrigatórios que infectam e destroem células durante a fase assexuada. O período de incubação da malária varia de 7 a 14 dias, podendo, contudo, chegar a vários meses, porém em condições especiais, após aparente cura da doença, no caso de *P. vivax* e *P. ovale* (Ashley et al, 2006). O quadro clínico de malária pode ser caracterizado como leve, moderado e grave dependendo da espécie do parasita, da quantidade de parasitas circulantes, do tempo da doença e do tipo de imunidade adquirida naturalmente pelo paciente em virtude de vários episódios maláricos ocorridos. É caracterizada por febres periódicas, denominadas febre terçã ou quartã, dependendo do agente etiológico causador da doença, e pode cursar com temperatura igual ou superior a 40°C. Em geral, esse evento é acompanhado por episódios de calafrios, sudorese, cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos. Após os primeiros eventos, a febre pode passar a ser intermitente (MS, 2010).

O *Plasmodium falciparum* ocasiona a forma mais grave de malária humana, pois possui a capacidade de infectar os eritrócitos em qualquer etapa maturativa, produzindo, conseqüentemente, alta parasitemia que pode ocasionar estados clínicos graves da doença (Gilles, 1993; Souza et al., 2002), além de eventos de sequestração de parasitas, podendo ocasionar a denominada malária cerebral (Idro, 2010). O *P. malariae* infecta as hemácias maduras, ocasionando a denominada

malária benigna. O *P. vivax* e o *P. ovale* parasitam preferencialmente os reticulócitos (Souza et al., 2002). Embora quadros clínicos graves de malária por *P. vivax* não sejam uma constante, devido às características próprias desta espécie em invadir, preferencialmente, os reticulócitos, limitando a parasitemia, nas últimas décadas, tem-se registrado manifestações clínicas graves de malária por essa espécie, caracterizadas por estados graves de anemia, plaquetopenia e outros, acarretando muitas vezes a internação ou até mesmo óbito de pacientes (Ventura, 2010).

As gestantes, as crianças e os primoinfectados estão sujeitos a maior gravidade, principalmente por infecções pelo *P. falciparum*, que podem ser letais. Assim, o diagnóstico precoce e o tratamento correto e oportuno são os meios mais adequados para reduzir a gravidade e a letalidade por malária (MS, 2010).

1.1.2 Ciclo biológico do parasita

Os parasitas do gênero *Plasmodium* possuem ciclo de vida dividido em duas fases: a fase assexuada e a fase sexuada (Figura 1). A fase assexuada ou esquizogônica é exógena e caracteriza-se pela multiplicação dos protozoários no hospedeiro intermediário vertebrado, podendo ser réptil, ave, primata, roedor e seres humanos. A fase sexuada ou esporogônica é edógena e caracterizada pela multiplicação dos protozoários no hospedeiro definitivo invertebrado (Gilles, 1993; Souza et al., 2002). No hospedeiro intermediário ocorrem duas fases: pré-eritrocítica que ocorre nos hepatócitos e eritrocítica que ocorre nas hemácias (Hviid, 1998; Miller et al., 2002) (Figura 1).

A transmissão da malária ao hospedeiro intermediário ocorre através do repasto sanguíneo do mosquito anofelino fêmea, o qual inocula formas infectantes (esporozoítos), pela saliva, no tecido subcutâneo ou diretamente na corrente

sanguínea de seres humanos, dando início à etapa pré-eritrocítica (Miller et al., 2002). Após alguns minutos a forma infectante é transportada através da corrente sanguínea até o fígado onde penetram nos hepatócitos e encontram boas condições para fazer a esquizogonia. Vale ressaltar que, nesse estágio, os esporozoítas de *Plasmodium vivax* e *P. ovale* podem permanecer latentes no interior dos hepatócitos por vários meses e ou mesmo anos, mantendo-se como hipnozoítas resistentes, ocasionado as recaídas quando despertam tardiamente e migram para a circulação sanguínea (Krotoski, 1985; Ashley et al, 2006). Após a penetração dos esporozoítas nos hepatócitos ocorre a sua diferenciação originando os esquizontes hepáticos, processo conhecido como esquizogonia exoeritrocítica, originando os esquizontes teciduais primários que após o amadurecimento rompem os hepatócitos, ocasionado a liberação de merozoítos nos capilares intra-hepáticos que alcançam a corrente sanguínea invadindo as hemácias (Krotoski, 1985; Farid et al., 1993). Vale ressaltar que, o número de merozoítos originados nos hepatócitos e o período para a ruptura e liberação destes variam de acordo com a espécie, podendo ser de 6 a 15 dias (Mota & Rodriguez, 2001; Moore et al, 2002).

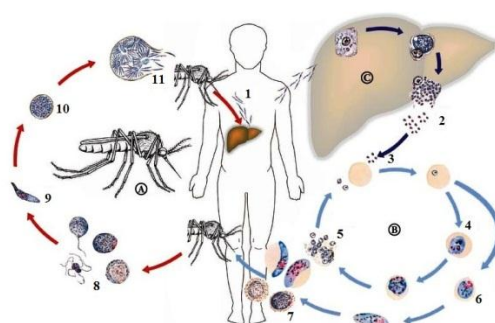


Figura 1 - Ciclo Biológico do Parasita *Plasmodium Sp.* A) Fase sexuada; B) Fase assexuada eritrocítica e C) Fase assexuada pré-eritrocítica. 1) Esporozoítas migrando para o fígado; 2) Rompimento dos hepatócitos e liberação de merozoítas; 3) Diferenciação de merozoítas na hemácias; 4) Desenvolvimento de formas aneladas (trofozoítas); 5) Rompimento de hemácias por esquizontes; 6) Desenvolvimento de macrogametócitos e microgametócitos; 7) Fecundação 8) Formação de oocineto 9) Oocisto; 10) Transformação de esporozoítas; 11) Liberação de esporozoítas para as glândulas salivares do mosquito. Fonte: <http://www.atlas-malaria.com/eng/ciclobio.php>. Acesso: 08/11.

Após a saída dos merozoítos dos hepatócitos ocorre a invasão nos eritrócitos, onde há a replicação dos merozoítos, dando origem às formas aneladas denominadas trofozoítos que utilizam a hemoglobina das hemácias para o seu metabolismo. Posteriormente, haverá a divisão nuclear originando os esquizontes, os quais se diferenciam em merozoítas eritrocíticos que, em seguida, rompem os eritrócitos e passam a parasitar outros eritrócitos, repetindo o ciclo eritrocítico do parasita (Botero & Restrepo, 1998; Hviid, 1998).

Uma pequena parte da população de merozoítos diferencia-se em macrogametócitos (gametócitos femininos) e em microgametócitos (gametócitos masculinos), os quais são as formas infectantes para o vetor, onde ocorre a fase sexuada do ciclo biológico do parasita (Bruce et al., 1990; Krettli, 1994; Souza & Riler, 2002). As hemácias contendo os gametócitos são rompidas após terem sido ingeridas pelo vetor durante o repasto sanguíneo. O gametócito masculino origina os microgametas pela exflagelação, estes, por sua vez, fecundam os gametócitos femininos formando o zigoto ou oocineto, o qual migra através das células epiteliais do estômago do mosquito, onde ocorre a sua transformação em oocisto que se fixa na membrana basal do intestino médio do vetor, sofrendo mudanças na sua estrutura, transformando-se em esporozoítas. Após a ruptura do oocisto maduro, os esporozoítas são passados da hemolinfa para as glândulas salivares do mosquito. O ciclo pode durar de sete a quatorze dias após a infecção, dependendo do tipo de plasmódio. E, após esses eventos, o mosquito torna-se capaz de infectar o hospedeiro intermediário dando continuidade ao ciclo do parasita (Bruce et al., 1990; Moore et al, 2002).

1.1.3 Epidemiologia da malária

A malária é uma parasitose endêmica em 106 países e continua a ter um enorme impacto na saúde global, sendo, predominantemente, objeto de preocupação de autoridades governamentais de muitos países da África, Ásia e América (WHO, 2011). É a terceira doença infecciosa mais prevalente no mundo, perdendo apenas para a AIDS e a Tuberculose (WHO, 2010). Estima-se que 3,3 bilhões de pessoas encontraram-se sob o risco de contrair malária, em 2010 e cerca de 216 milhões de episódios de malária foram registrados, em 2010, principalmente, na África e Ásia (WHO, 2011). Essa parasitose além de ser responsável por elevada morbidade, é também responsável por uma elevada mortalidade, principalmente, de crianças africanas (WHO, 2011). Acredita-se que houve cerca de 655 000 mortes por malária em 2010, dos quais 91% ocorreram na região Africana. Desses, aproximadamente 86%, refere-se a crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2011).



Figura 2 - Áreas de transmissão de malária no mundo (WHO, 2010).

Nas Américas, o Brasil apresenta o maior número de casos de malária, dos quais 99,9 % são oriundos da Região Amazônica (Figura 3), sendo o *Plasmodium vivax* o agente etiológico mais prevalente nessa região, e responsável por cerca de 90% dos casos registrados da doença. Estima-se que cerca de 49 milhões de pessoas vivam em áreas de risco no Brasil, distribuídas entre moradores de áreas endêmicas e viajantes (MS, 2011). Em 2010, foram registrados em torno de 330.000 casos de malária, 5.000 hospitalizações, sendo 13% referente a crianças menores de 5 anos, e 75 óbitos (MS, 2011).

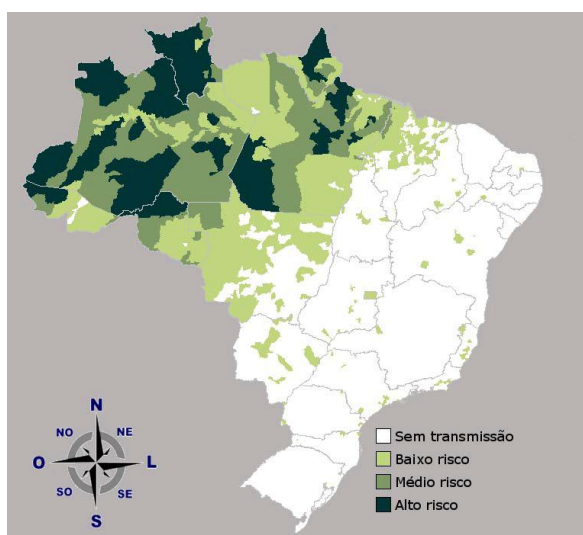


Figura 3 - Áreas de transmissão de malária no Brasil (Ministério da Saúde, 2011).

A Amazônia, por se tratar de uma região de floresta tropical úmida predominante, composta por uma complexa via hidrográfica, pluviosidade e temperatura anual elevadas, possui todas as características geográficas e ecológicas favoráveis ao desenvolvimento e interação do mosquito anofelino com o parasita do gênero *Plasmodium* (Penhalbel et al, 2005). Logo, a área endêmica no Brasil é, em sua maior parte, representada pela região Norte do país. Segundo o Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS (2011), nove estados

são considerados endêmicos e áreas sem transmissão com risco de reintrodução de malária (Figura 3). O Estado do Pará é responsável pelo maior número dos casos, seguido do Estado do Amazonas e Rondônia (MS, 2011).

Vale ressaltar que, no século XX, a malária estava sob controle no território brasileiro, inclusive quase erradicada em algumas regiões consideradas áreas endêmicas. Porém, no final da década de 60 e princípio da década de 70, a parasitose voltou a ser motivo de preocupação. O número de casos de malária voltou a elevar-se, principalmente, devido às alterações no ecossistema em virtude da implantação de projetos de integração da Amazônia com o restante do país, pela construção de novas rodovias, colonização e expansão de áreas de garimpo, o que ocasionou um fluxo migratório intenso de pessoas susceptíveis advindas do Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país para a Amazônia (Machado et al., 2003). Além disso, a região periférica das cidades tem assumido participação importante no aumento do número de casos de Malária em decorrência do êxodo rural que ocasiona a deterioração das estruturas urbanas e disseminação da doença (Machado et al, 2003).

Embora tenha havido inúmeros esforços e incentivos por parte de autoridades governamentais e não governamentais no controle da doença nas últimas décadas, alguns aspectos parecem contribuir, também, para o aumento do número de casos da parasitose e manutenção do parasita em alguns países, inclusive no Brasil. Estes incluem: o atraso e ou erro de diagnóstico; o surgimento de resistência dos plasmódios aos antimaláricos, além do turismo para locais onde a malária é endêmica (Wellems & Miller, 2003).

Neste contexto, a malária é uma doença evitável e tratável, desde que as intervenções atualmente recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (2011)

sejam adequadamente implantadas. Estes incluem (i) o controle do vetor pela utilização de mosquiteiros tratados com inseticida (MTI), pulverização residual (IRS) e, em alguns casos específicos, o controle larval; (ii) quimioprevenção para as populações mais vulneráveis, especialmente as mulheres grávidas e crianças; (iii) a confirmação breve do diagnóstico de malária por meio de microscopia ou testes de diagnóstico rápido (TDR) para cada caso suspeito, e (iv) o tratamento em tempo, com medicamentos anti-palúdicos apropriados, ou seja, de acordo com as espécies de parasitas e resistência a droga documentada.

1.2 Diagnóstico de malária

O diagnóstico confirmatório de infecções por plasmódios pode ser realizado por diferentes técnicas que englobam aspectos microscópicos, imunológicos e moleculares, sendo as principais: 1) gota espessa, diagnóstico laboratorial considerado padrão ouro por apresentar custo operacional relativamente baixo e alta especificidade e sensibilidade, sendo o meio mais utilizado mesmo diante aos avanços de técnicas para o diagnóstico de malária nas últimas décadas; 2) o diagnóstico molecular detecta ácido nucléico do parasita, pela tecnologia de amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual é extremamente eficiente, porém menos utilizada, sendo restrita a grandes laboratórios em virtude do custo elevado de reagentes necessários para a reação e alta complexidade da técnica, além de ser inviável em campo; 3) os testes para diagnósticos Imunológicos, tais como ELISA e Imunofluorescência, também são pouco utilizados para diagnóstico de malária não só em decorrência do elevado custo, mas também em virtude de incertezas ao diagnóstico, pois a presença de anticorpos no soro de pacientes não significa necessariamente a presença de

infecção ativa, tendo em vista que anticorpos podem permanecer algum tempo no organismo após a cura da doença (Fadul, 2007). Já os testes imunocromatográficos, recentemente elaborados, proporcionam simplicidade, rapidez e eficiência ao diagnóstico, porém apresentam inviabilidade no Brasil, devido ao elevado custo operacional por serem todos de origem internacional (Oliveira, 2010).

1.3 Método laboratorial padrão

Tradicionalmente, o exame microscópico do sangue é realizado pela técnica desenvolvida por Ross em 1903 (Gotijo, 1995), chamado esfregaço delgado (distendido) ou espesso (gota espessa) (Figura 4), sendo a gota espessa o exame mais utilizado na detecção de parasitos no sangue de pacientes, uma vez que a concentração de sangue por campo microscópico facilita o encontro de protozoários (MS, 2010). A técnica de diagnóstico de Malária por gota espessa consiste na coleta de sangue periférico de pacientes com manifestações clínicas de malária para a preparação de lâminas coradas com Giemsa, na proporção de uma gota de corante para 1 ml de H₂O, por cerca de 20 a 30 minutos para visualização em campo microscópico com óleo de imersão visando a identificação das espécies e contagem do número de parasitas por campo, para a obtenção da parasitemia (MS, 2010).

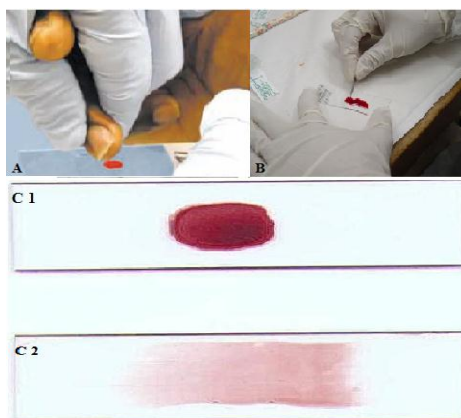


Figura 4 - Diagnóstico microscópico de malária. A) Punção digital; B) Preparação de lâminas; C1) Gota espessa e C2) Esfregaço sanguíneo. Fonte: www.rph.wa.gov.au/malaria/diagnosis.

O exame da gota espessa permite a detecção da densidade mínima de parasitas, cerca de 5-10 parasitas por μl de sangue, desde que o examinador seja bastante experiente. Todavia, em condições de campo, normalmente, a capacidade de detecção salta para 100 parasitos por μl de sangue. A técnica permite o diagnóstico em cerca de 60 minutos entre a coleta do sangue, a análise microscópica para a identificação de espécies, a mensuração da parasitemia e a entrega do resultado (MS, 2010).

Embora a técnica permita a identificação quantitativa e qualitativa de parasitas e seja um método eficaz e de custo relativamente baixo, esta metodologia possui algumas limitações na preparação de lâminas e, conseqüentemente, viés na interpretação dos resultados, tais como: material biológico mal fixado, possível lise de hemácias e má preservação da morfologia dos parasitas, podendo acarretar erro de diagnóstico e, conseqüentemente, erro na administração de antimaláricos, favorecendo, assim a disseminação de *Plasmodium* (WHO, 2010). Além disso, a técnica exige infraestrutura adequada e profissionais extremamente qualificados para a realização dos exames (WHO, 2011).

1.3.1 Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (elisa) indireto e sanduíche

O ELISA foi desenvolvido independentemente e simultaneamente pelos grupos liderados pelos pesquisadores de Peter Perlmann e Eva Engvall da Universidade Stockholm na Suécia, e por Anton Schuurs e Bauke van Weemen, na Holanda, em 1971. Hoje, instrumentos totalmente automatizados em laboratórios pelo mundo usam o princípio deste imunoensaio tendo uma enzima como marcadora para mensurar inúmeros analitos em amostras de pacientes (Lequin,

2005), na medida em que a técnica é sensível, permite a execução de múltiplos testes simultaneamente e pode ser facilmente adaptada às exigências de laboratórios individuais. Um exemplo de um imunoenensaio é o teste DELI, o qual é baseado na detecção de Lactato Desidrogenase plasmodial (pLDH), este teste foi adaptado para o monitoramento da doença ocasionada por *P. vivax* e *P. falciparum* e é extremamente eficiente nos estudos epidemiológicos da resistência dos parasitas às drogas antimaláricas (Druilhe, et al. 2001; Druilhe et al., 2007).

Os ensaios imunoenzimáticos apresentam alta sensibilidade e especificidade. São utilizados para a detecção de anticorpos ou antígenos presentes em amostras sanguíneas de pacientes (Gretch, 1997). Basicamente, no ELISA indireto, os antígenos purificados são ligados à superfície interna de cada poço das microplacas. Durante a incubação inicial, os anticorpos presentes no soro do paciente se ligam especificamente ao antígeno imobilizado e assim permanecem após a primeira lavagem. Um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase, que reconhece as regiões constantes de cadeias leves e pesadas da IgG, liga-se aos anticorpos do paciente presentes após a primeira incubação. Nas cavidades em que o conjugado permanece ligado, a enzima peroxidase catalisa uma reação colorimétrica no substrato cromógeno que pode ser, por exemplo, o tetrametilbenzidina (TMB) atuando em seu substrato, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Após o bloqueio da reação enzimática, a coloração é lida fotometricamente.

Em resumo, no ELISA indireto são utilizados dois anticorpos, um anticorpo primário e outro anticorpo secundário conjugado a peroxidase. No ELISA em sistema sanduíche ocorrem todas as etapas descritas acima, sendo que são utilizados três anticorpos, de espécies diferentes, um anticorpo de captura do antígeno alvo (na sensibilização da placa de ELISA), um anticorpo primário (após a

adição do antígeno alvo) e um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Gonçales e Gonçales jr, 2004) (Figura 5).

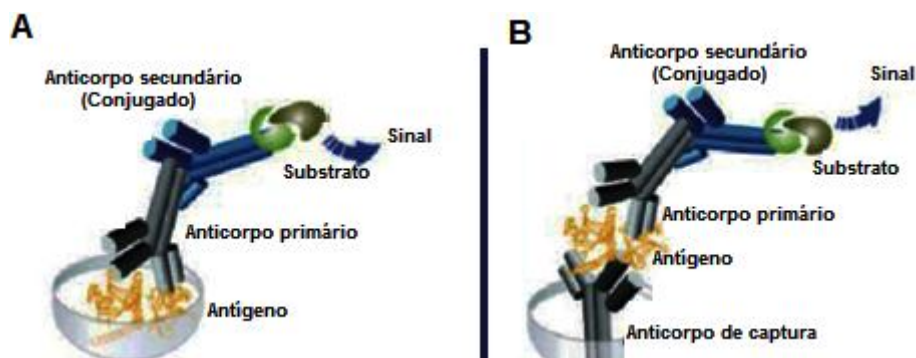


Figura 5 - Princípios do ELISA indireto (A) e sanduíche (B)

1.3.2 Testes imunocromatográficos: diagnóstico rápido de malária

Os testes imunocromatográficos para diagnóstico rápido de Malária, os TDR, baseiam-se na captura de derivados protéicos maláricos (antígenos alvos) por anticorpos monoclonais reativos a tais antígenos encontrados no sangue periférico infectado por protozoários do gênero *Plasmodium*. Basicamente, a imunocromatografia ocorre pela migração da fase líquida de sangue periférico infectado, sob anticorpos monoclonais (contra determinados antígenos) sensibilizados em uma membrana de nitrocelulose e acoplados a partículas de ouro em fase móvel. A fase fixa é determinada por um anticorpo secundário de captura aplicado a fita de nitrocelulose. Assim, a migração do complexo antígeno-anticorpo da fase móvel ao longo da fita possibilita a identificação do antígeno capturado pelo anticorpo da fase fixa, produzindo uma linha colorida visível. Para assegurar o correto processo de migração sobre a membrana de nitrocelulose, é necessária a adição de um anticorpo anticamundongo como controle positivo do sistema (Figura 6) (Piper et al. 1999).

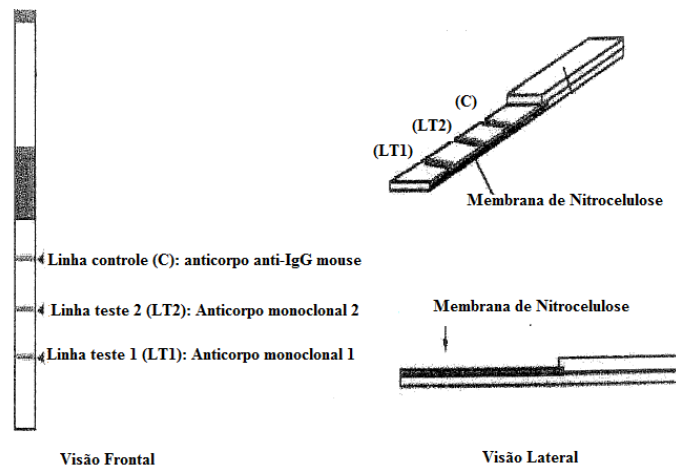


Figura 6 - Princípios do ensaio imunocromatográfico. Ensaio imunocromatográfico utilizando membrana de nitrocelulose para diagnóstico rápido de malária. O controle positivo da reação (C) é representado por anticorpo anti-IgG de camundongo. As linhas 1 e 2 (LT1 e LT2) representam os anticorpos monoclonais contra antígenos alvos do parasita *Plasmodium Sp.* (Figura modificada de Chong, 2009).

Existem vários testes de diagnóstico rápido para malária disponíveis comercialmente em forma de “Kits”, estes permitem diagnósticos entre 10 a 20 minutos. Normalmente, os antígenos mais utilizados como alvos são: HRP-2 (“Proteína 2” Rica em Histidina), LDH (Lactato Desidrogenase) e Aldolases. A HRP-2 é utilizada para a detecção exclusiva de *Plasmodium falciparum* (pfHRP-2). Esta proteína é solúvel e somente expressa por esta espécie de parasita durante o estágio sanguíneo assexuado e estágio de gametócitos jovens (Ávila et al., 2002; Moody, 2002). Embora tenha sido o primeiro antígeno a ser utilizado em teste de diagnóstico rápido, vale ressaltar que, este, possui algumas limitações, como a sua persistência no organismo, por alguns dias, após a cura da doença podendo acarretar resultados falsos-positivos e, conseqüentemente, administração desnecessária de antimaláricos (Iqbal, 2004). A enzima LDH (Lactato Desidrogenase) é utilizada para a detecção de espécies de *Plasmodium* (pLDH) que infectam o homem (Cooke et al., 1999; Piper, 2011). Esta enzima faz parte do metabolismo do parasita, especificamente, encontrada na via glicolítica, sendo

produzida tanto na fase sexuada quanto assexuada (Moody, 2002), tornando-se um bom indicador de infecção ativa, já que é produzida somente por parasitas vivos (Palmer, 1998; Iqbal, 2004). Outras enzimas, denominadas Aldolases, têm sido sugeridas também como antígenos alvos para a detecção de espécies de *Plasmodium Sp.* (Moody, 2002).

Os testes imunocromatográficos para o diagnóstico rápido de Malária devem ser tão precisos quanto os resultados derivados da microscopia executada por um técnico em condições de campo. A sensibilidade deve ser superior a 95% quando comparada com a microscopia, e a detecção da parasitemia, em níveis de 100 parasitos/ μ l (0,002% parasitemia) deve ser detectada confiantemente com uma sensibilidade de 100%. Informações quantitativas ou semiquantitativas sobre as densidades parasitárias circulantes no sangue são essenciais. Outros critérios essenciais sugeridos são a habilidade para distinguir parasitos viáveis de produtos de parasitas como antígenos ou ácidos nucleicos associados com organismos não viáveis e também indicar o prognóstico de resultados de tratamento ou resistência a drogas antimaláricas (WHO, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2010) existem 68 testes diagnósticos rápidos de malária disponíveis no mercado, porém nenhum de origem nacional, assim o elevado custo individual é um dos maiores impedimentos para a implantação em larga escala no Brasil. Os testes são subdivididos em 6 categorias de acordo com a detecção de *Plasmodium* em amostras sanguíneas: (1) somente *P. falciparum*; (2) *P. falciparum* e Pan reativo; (3) *P. falciparum* e *P. vivax*; (4) *P. falciparum*, *P. vivax* e Pan reativo; (5) somente Pan reativo e (6) somente *P. vivax*. A leitura dos testes é baseada na figura 7.



Figura 7 - Interpretação de ensaio imunocromatográfico. A) Diagnóstico negativo para malária: reação somente da linha controle; B) Exame positivo para *Plasmodium vivax* ou outras espécies de parasitas que infectam o homem; C) Exame positivo para *P. falciparum*; D) Diagnóstico de infecção mista; E, F e G) Diagnóstico inválido devido à inatividade do controle positivo da reação. Fonte: Revista Human do Brasil, 07/08.

Um dos TDR registrados e validados no Brasil é o OptiMAL-IT[®]. O teste foi adquirido em 2006 pelo Ministério da Saúde, para uso na rede do Sistema Único de Saúde (SUS), porém não é utilizado em larga escala (MS, 2010). O teste é baseado na detecção das isoformas de LDH de *P. falciparum* e LDH Pan reativo para a detecção das demais espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (Pipper, 1999).

Há vários estudos de avaliação dos TDR publicados na literatura, sendo que muitos relatam a comparação do desempenho do teste diagnóstico rápido OptiMAL-IT[®] ao método mais tradicional em vários contextos epidemiológicos, além das condições ambientais de armazenamento e custo benefício do mesmo. Há estudos realizados com diferentes populações do mundo, residentes de áreas endêmicas e indenes, viajantes, sintomáticos, assintomáticos e co-infectados (Fadul, 2007). Logo, uma revisão que aborde o desempenho do OptiMAL-IT[®] é muito relevante, principalmente, para estudos futuros que visam a utilização deste teste diagnóstico como alvo. Nesse contexto, uma revisão da literatura foi elaborada, como parte integrante do presente trabalho, comparando o desempenho deste teste rápido ao método tradicional de diagnóstico de malária em várias partes do mundo (Anexo 2).

Vale ressaltar que o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, específicos e sensíveis para identificar indivíduos infectados com malária é de suma importância na tentativa de contribuir para o controle do impacto da doença na saúde pública (Palmer, 1998). No entanto, existem algumas limitações para os testes rápidos, embora esta metodologia não demande infraestrutura adequada e nem profissionais altamente qualificados e treinados. Estas limitações incluem, por exemplo, a diminuição da sensibilidade, cerca de 70%, em níveis parasitários de 50 parasitas/ μ l de sangue e a ocorrência de reações falso-positivas em pacientes contaminados por *P. falciparum*, devido à persistência do antígeno alvo no sangue periférico, em até 28 dias após a terapia contra a malária (Humar et. al, 2007; Shiff et al, 1994), além de, ainda, ser considerada uma metodologia de custo elevado para muitos países onde a malária é endêmica (Oliveira, 2010; Piper, 2011) e não estimar a densidade parasitária, discriminando, apenas, como positivo ou negativo para malária (WHO, 2011).

1.4 Uso da enzima lactato desidrogenase para o diagnóstico de malária

As enzimas possuem valor em particular nos estudos de Genética e Imunologia básica, pois, geralmente, apresentam-se estáveis ao longo das gerações. Estas são de suma importância, por estarem correlacionadas algumas vezes a determinadas doenças e distúrbios no organismo. Um exemplo disto é a relação entre o infarto renal, infarto do miocárdio, hemólises e diversos tipos de câncer aos altos níveis séricos de LDH humana, tornando-as um dos fatores determinantes no monitoramento do progresso ou regresso de determinadas doenças (Garba 2005).

Em parasitas do gênero *Plasmodium Sp.* as enzimas mais estudadas são: glicosefosfato isomerase (GPI), 6-fosfogliconato desidrogenase (PGD), NAD-P dependente de glutamato desidrogenase (GDH), adenosina deaminase (ADA), peptidase E (PEPE) e Lactato Desidrogenase (LDH) (Walliker, 1982).

A enzima LDH de *Plasmodium Sp.* é tetramérica, contém 316 aminoácidos e é expressa em ambos os estágios, sexual e assexual do ciclo biológico do parasita (Avila et al., 2002), principalmente no ciclo eritrocítico, durante o estágio de esquizonte (Piper et al, 1999). Para crescimento e desenvolvimento intracelular do parasita, a via glicolítica é a principal fonte de ATP, pois não são capazes de armazenar glicogênio e nem outros tipos de polissacarídeos de reserva, aumentando assim, significativamente, o consumo de glicose em hemácias parasitadas, atingindo o consumo de 50 a 100 vezes maior em relação a hemácias não infectadas (Podlasek & McPherson, 1989). Na geração de energia, a LDH participa da última reação da via glicolítica, convertendo o lactato em piruvato, que, por sua vez, deve ser convertido em lactado pela LDH para formar NAD^+ dando prosseguimento a glicólise anaeróbica (Berwal et al, 2006). Como os parasitas do gênero *Plasmodium Sp.* realizam glicólise anaeróbica, em razão de seu ciclo biológico no interior de eritrócitos, o metabolismo da glicose proporciona a energia necessária ao crescimento intracelular.

A LDH é expressa por todas as espécies de parasitas que infectam o homem e apresenta diferenças em relação à LDH humana em aspectos estruturais, imunológicos e em níveis de expressão, embora as isoformas enzimáticas exerçam a mesma função biológica nos organismos (Wiwanitkit, 2006). Um dos primeiros estudos em relação ao isolamento e purificação da enzima LDH foi em 1981 por Vander e colaboradores, os quais conseguiram purificar parcialmente a LDH de

Plasmodium falciparum, por uma técnica denominada Cromatografia Líquida de Alta Resolução, e compará-la cineticamente as duas isoformas de LDH humana, LDH-M₄ e LDH-H₄.

Segundo Balik e colaboradores (2004) as isoformas de LDH de *Plasmodium Sp.* mostraram-se bem conservadas, implicando em um alto grau de similaridade quando comparadas entre si, por exemplo, a LDH de *P. vivax* com homologia de 80% quando comparada as sequências de aminoácidos da LDH de *P. falciparum*. Todavia, o nível de identidade da seqüência de aminoácidos da LDH de *P. vivax* quando comparada a duas isoformas de LDH humana, LDH-M₄ e a LDH-H₄, é relativamente baixa, sendo 26% e 25% respectivamente. Assim, a LDH de *Plasmodium Sp.* pode ser distinguida das isoformas da LDH humana com base em epítomos exclusivos por toda a extensão da seqüência de aminoácidos, como também por características enzimáticas distintas, pois o sítio catalítico da enzima LDH das quatro espécies de *Plasmodium* diferem das isoformas de LDH humana (Brown et al., 2004).

Makler e Gibnins (1992) relataram que infecções maláricas poderiam ser diagnosticadas eficientemente usando a LDH plasmodial, e desde então a enzima tornou-se alvo de muitos imunodiagnósticos e, atualmente, é o antígeno alvo mais utilizado para o diagnóstico de malária e isto se deve as características próprias da enzima (Co et al, 2010). Em razão de ser a chave na produção de energia para o crescimento e proliferação das espécies de *Plasmodium Sp.*, tornando-a diretamente proporcional ao crescimento e desenvolvimento do parasita durante o ciclo sanguíneo, combinada com a característica de conservação estrutural da maioria das regiões entre as espécies de parasitas, além da ausência de antígeno LDH em amostras sanguíneas de pacientes curados (diferentemente do antígeno HRP-2 de

P. falciparum, o qual persiste em amostras sanguíneas por mais de 30 dias após o tratamento, como mencionado anteriormente), fazem da pLDH um excelente marcador de infecção por plasmódios para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico rápido, profilaxia e, conseqüentemente, controle da malária.

1.5 Retrospectiva de trabalhos anteriores

Em um trabalho anterior, coordenado pelo pesquisador Paulo Afonso Nogueira, no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM - Porto Velho/RO), foi produzida a proteína recombinante LDH de *Plasmodium vivax*, a partir do gene que continha 817 pares de base (Figura 8). Este gene foi extraído do sangue periférico de um paciente positivo para *P. vivax*, foi inserido em um plasmídeo pGEX-3x (Amershan), o qual fusiona a proteína a uma cauda de Glutathione-S-transferase (GST). Após a indução de sua expressão em um hospedeiro bacteriano *Escherichia coli*, a proteína LDH recombinante apresentou aproximadamente 60 kDa, sendo posteriormente purificada através de uma resina de sefarose glutathiona (Amershan) (HOLANDA, 2008).

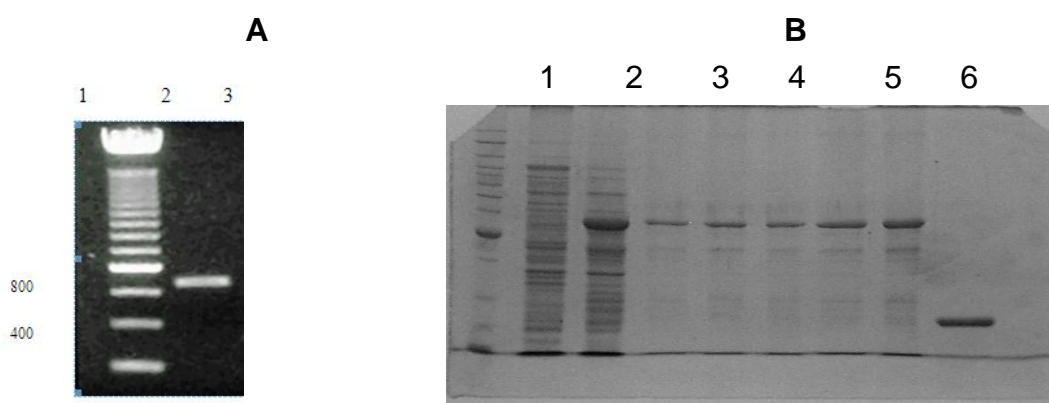


Figura 8 - Purificação da proteína pvLDH35-305aa. A) Purificação do gene de LDH em um gel de agarose na concentração de 0,8%, no qual o poço de número 1 corresponde ao padrão de peso molecular de 250pb e a canaleta 2 contém o fragmento de 800pb. B) Purificação de LDH de *P. vivax* em diferentes concentrações de Uréia. Gel SDS PAGE a 12%, onde: 1) peso molecular, 2) Não induzido, 3) induzido, 4) 0 M; 5) 1M; 6) 2M; 7) 3M; 8) 4M; 9) GST. Foram aplicados 5µl no gel.

No mesmo ano, a proteína LDH recombinante foi purificada por uma metodologia padronizada no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/FIOCRUZ) e utilizada para a imunização de coelhos e camundongos Balb/c para a produção e purificação de IgG anti-LDH, visando a realização de ensaios em sistema ELISA sanduíche. Nos ensaios foram utilizados IgG policlonal de coelho como anticorpo de captura e IgG policlonal de camundongo como anticorpo primário para a detecção de antígeno LDH nativo em amostras armazenadas determinadas por microscopia positivas e negativas para a malária. Como resultado foi observado uma reatividade similar deste sistema tanto para as amostras positivas quanto negativas (Figura 9). Este dado sugeriu que os anticorpos policlonais gerados reconheceram epítomos comuns da LDH de *Plasmodium Sp.* e isoformas da LDH humana, tornando inviável sua utilização, como único reagente, para a produção de um teste diagnóstico devido a elevada formação de resultados falsos positivos.

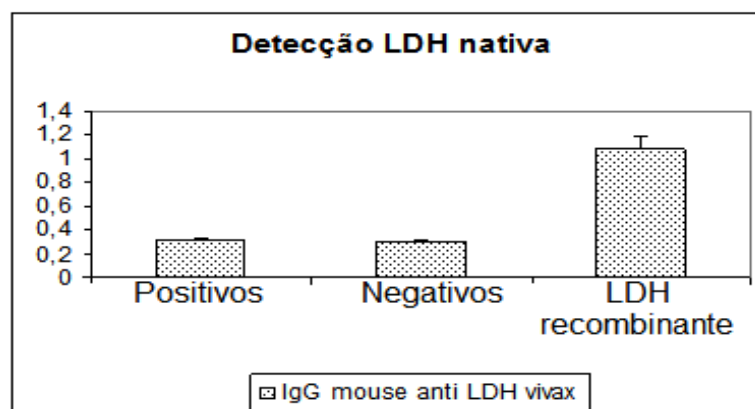


Figura 9 - ELISA sanduíche da pvLDH35-305aa. ELISA em sistema sanduíche utilizando anti LDH de coelho e camundongo no reconhecimento de LDH em amostras positivas e negativas para a malária. A reação foi revelada com substrato TMB e peróxido de oxigênio e a leitura (D.O.) realizada em um filtro de 450 nm em leitor de ELISA. A proteína LDH recombinante de *Plasmodium .vivax* foi utilizada como controle.

Ao analisar a sequência utilizada para a produção da proteína recombinante citada, foi constatado que a região utilizada por Piper e colaboradores (1999) para a produção de anticorpos monoclonais anti *p*fLDH e *p*LDH não estava presente na construção. Esta região, aparentemente, é essencial para a diferenciação da LDH humana e plasmodial. Logo, foi elaborada a hipótese que a produção de anticorpos policlonais direcionados contra esta região levaria a obtenção de insumos reagentes que solucionariam o problema encontrado no trabalho de Holanda (2008).

Sendo assim, a produção e validação de uma proteína recombinante, contendo a região utilizada por Piper e colaboradores (1999) como insumo para produção de anticorpos policlonais que sejam eficientes para o diagnóstico de infecções maláricas, viabilizará a avaliação futura da utilização direta destes anticorpos em campo, pelos diferentes métodos, ou o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para a elaboração de um imunodiagnóstico brasileiro e menos oneroso, visando à utilização ampla no Sistema Único de Saúde (SUS), o que poderá proporcionar aceleração ao diagnóstico. Ou, ainda, poderá viabilizar o desenvolvimento de um imunoensaio baseado em anticorpos policlonais anti-LDH plasmodial para, por exemplo, o monitoramento do curso da doença durante a terapia com antimaláricos.



Objetivo

Produzir uma proteína recombinante LDH de *Plasmodium vivax*, visando o desenvolvimento de anticorpos policlonais capazes de detectar antígeno nativo em amostras sanguíneas de pacientes infectados.

1.6 Objetivos específicos

- Expressar e validar a proteína LDH recombinante de *Plasmodium vivax* com base em Piper et al., 1999.
- Avaliar o desempenho de anticorpos policlonais anti-LDH de *Plasmodium vivax* na detecção de LDH nativa em amostras sanguíneas positivas e negativas para a malária por imunoenensaio ELISA em sistema sanduíche.

 *Material e métodos*

1.7 Modelo de estudo

Foi realizado um estudo experimental, no qual, visou-se à produção de uma proteína recombinante LDH de *Plasmodium vivax* para a obtenção de anticorpos policlonais anti-pvLDH, pelas imunizações desta proteína em coelho e camundongos Balb/c. Posteriormente, avaliou-se o desempenho destes anticorpos no reconhecimento de LDH nativa em relação a amostras sanguíneas de indivíduos com diagnóstico confirmatório para a malária e indivíduos não expostos ao *Plasmodium Sp.*, visando avaliar eventuais reações cruzadas destes anticorpos com isoformas de LDH humana.

1.8 Aspectos éticos da pesquisa

O estudo foi desenvolvido com animais (camundongos e coelho) e amostras sanguíneas coletadas para as pesquisas vinculadas aos projetos “Desenvolvimento de insumos reagentes para o diagnóstico rápido de malária” e “Dinâmica das infecções maláricas em comunidades do Amazonas sob aspectos de marcadores moleculares de parasitas e do polimorfismo de proteínas candidatas a vacina”, deferidos pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Conselho de Ética em Pesquisa da UFAM, com CEEA-UFAM 005/2010 e CEP-UFAM com CAAE nº 3640.0.000.115-07, respectivamente (Anexo 3 e 4). Os experimentos foram realizados no laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/AM em colaboração com o grupo de pesquisas do Dr Paulo Afonso Nogueira.

1.9 Desenho da amplificação do gene de lactato desidrogenase de *Plasmodium*.

O desenho dos óligos para a amplificação da região do gene de interesse da *p*LDH e não homóloga a regiões de LDH humana foi realizado com base na pesquisa de sequências já publicadas anteriormente no Gen Bank e comparando a região utilizada por Piper (1999) ao trabalhar com anticorpos anti LDH de *P. falciparum* e pan reativo. Utilizou-se o programa DNASTAR (Lasergene ® Core Suite) para o devido alinhamento e desenho dos óligos. Para a amplificação da região específica de DNA, utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores (primers) Sense 5' **GGATCCA T G A C G C C G A A A C C C A A A A T T G T** 3' e Antisense 5' **GAATTC T T T C C T T G G G G C C A T G T T T T T** 3'. As bases nitrogenadas em destaque nos primers correspondem aos sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *BamHI* para a realização de subclonagem direcionada, visando a correta inserção do fragmento de *p*LDH em Plasmídeo de expressão. A figura 13 ilustra a construção dos genes para a produção da proteína LDH do presente estudo, nomeada *p*LDH 1-43aa, e LDH produzida em um estudo anterior (Tópico 1.4; HOLANDA, 2008), nomeada *p*LDH 35-305aa, as quais originaram 131 e 817 pares de bases, respectivamente.



Figura 10 - Amplificação dos genes de interesse para a construção da *p*LDH 1-43aa e *p*LDH 35-305aa. A) A amplificação do gene da LDH para a produção da *p*LDH 1-43aa, a partir de 131 pares de base (em vermelho e verde); amplificação do gene da LDH para a produção da *p*LDH 35-305aa, a partir de 817 pares de bases (em verde e azul). O branco corresponde a região não

amplificada. B) A *pLDH* 1-43aa corresponde aos aminoácidos 1-43 (em vermelho) e *pvLDH* 35-305aa corresponde aos aminoácidos 35-305 (em azul).

1.10 Extração de Dna genômico de *Plasmodium vivax*

Para a extração de DNA genômico de amostras sanguíneas de indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* foi utilizado o kit de extração de DNA ChangeSwitch® gDNA 50-100 µl Blood Kit (invitrogen), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

1.11 Reação em cadeia da polimerase (pcr)

O método de PCR proposta por Siki et al (1985) e modificada por Mullis et al (1987) para a amplificação de sequências alvo (específicas), neste estudo, obedeceu a condição ilustrada no quadro abaixo.

Quadro 1 - Condições da PCR utilizada para a amplificação do gene *pLDH*.

REAGENTE	CONDIÇÃO/µl
DNA de <i>P. Vivax</i>	2,5
Taq Polimerase	0,5
DNTP à 2.5 mM	2,5
Tampão 10X	2,5
MgCl ₂ 1.5 Mm	2,25
Primer sense à 10 pMol	3
Primer antisense à 10 pMol	3
H ₂ O para injeção	8,75

Em seguida, o conteúdo foi submetido a três ciclos, conforme a figura 11.

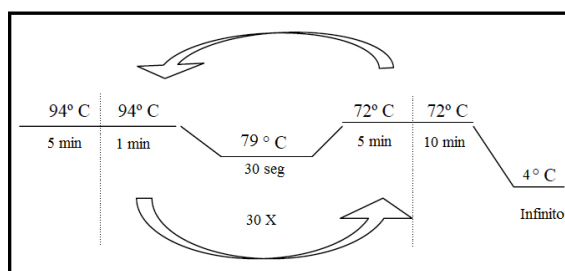


Figura 11 - Ciclo de temperaturas utilizadas da PCR para a amplificação de fragmento de *pvLDH*. Figura modificada de Fagundes (2005).

1.12 Eletroforese em gel de agarose e purificação de Dna

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose, procedimento básico de todas as análises com ácidos nucléicos. Resumidamente, utilizou-se gel de agarose na concentração de 1.5% em solução aquosa TBE 1X a 100 V por 45 minutos. Posteriormente, o gel corado com brometo de etídeo 1% foi visualizado sob a luz ultravioleta (UV).

A purificação de bandas de DNA após a eletroforese foi realizada pelo kit Gel Extraction Kit (250) Qiaquick® (QIAGEN), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

1.13 Clonagem e subclonagem de *pvidh1-43aa*

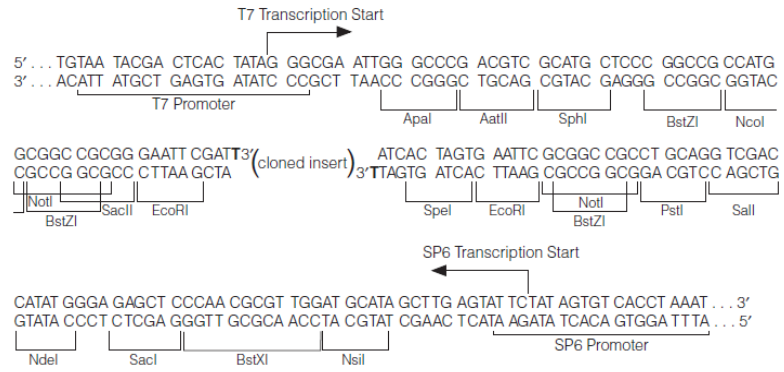
As cepas bacterianas da linhagem *Escherichia coli* e os plasmídeos de clonagem e expressão (DNA extracromossômico capaz de se replicar independentemente da replicação cromossomal) utilizados neste estudo, para a produção de proteínas recombinantes, encontram-se caracterizados no quadro abaixo.

Quadro 2 - Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados para a clonagem e expressão de pLDH.

CEPAS BACTERIANAS	CARACTERÍSTICAS	FABRICANTE
TOP 10	<i>E. coli</i> quimicamente competente	Invitrogen
BL 21 (DE3) pLyss	<i>E. coli</i> quimicamente competente	Invitrogen
PLASMÍDEOS		
pGEM	vetor de clonagem	Promega
pRSET A	vetor de expressão	Invitrogen

1.13.1 Plasmídeo de clonagem: pgem®-t easy vector

A



B

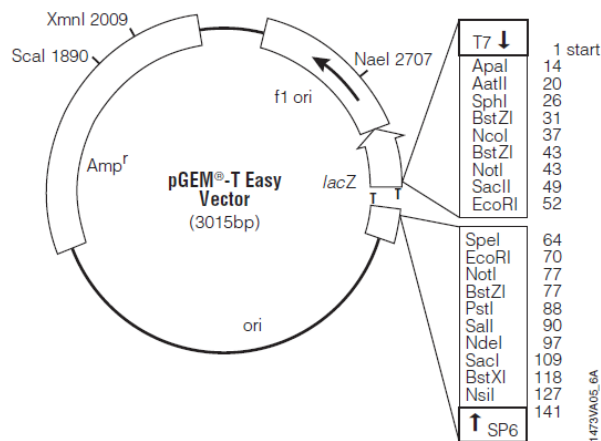


Figura 12 - Sequência e Mapa do Plasmídeo pGEM. Sequência (A) e mapa (B) do plasmídeo de clonagem pGEM. Fonte: Manual Técnico Promega – 12/10.

1.13.2 Plasmídeo de expressão – pRSET A

A

```

21  AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG GTTCCCTCT AGAATAATT TTGTTAACT TTAAGAAGGA
      T7 promoter                                     RBS

91  GATATACAT ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
      Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
      Polyhistidine (6xHis) region

148 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT CGA TGG GGA
      Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp Arg Trp Gly
      T7 gene 10 leader                               Xpress™ Epitope                               BamH I
      EK recognition site                               EK cleavage site

205 TCC GAG CTC GAG ATC TGC AGC TGG TAC CAT GGA ATT CGA AGC TTG ATC CGG CTG CTA
      Ser Glu Leu Glu Ile Cys Ser Trp Tyr His Gly ile Arg Ser Leu Ile Arg Leu Leu
      Xho I Sac I Bgl II                               Pst I Pvu II Kpn I Nco I EcoR I BstB I Hind III

262 ACA AAG CCC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG CAT
      Thr Lys Pro Glu Arg Lys Leu Ser Trp Leu Leu Pro Pro Leu Ser Asn Asn *** His
      T7 reverse priming site
  
```

B

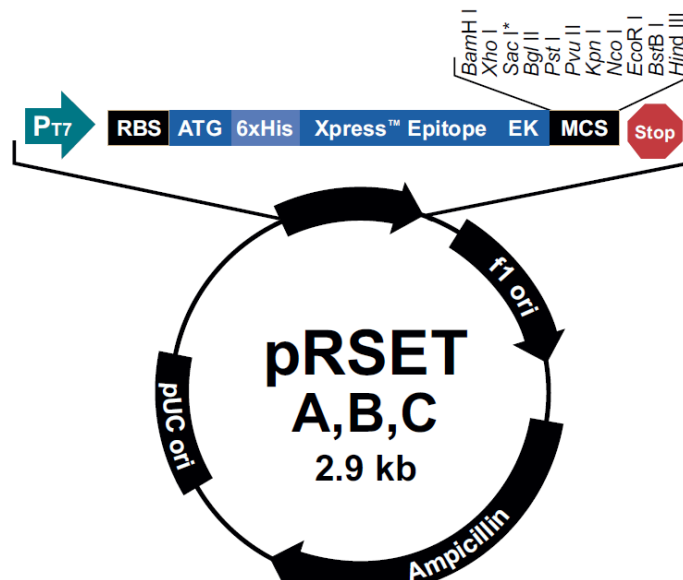


Figura 13 - Sequência e Mapa do Plasmídeo pRSET A. Sequência (A) e mapa (B) do plasmídeo de expressão pRSET-A. Fonte: Manual Técnico Invitrogen (Catálogo V 351-20).

1.13.3 Ligação do fragmento pVL_{DH} 1-43aa em vetor de clonagem pGEM

Utilizou-se 1 µl do vetor de clonagem para 3 µl do produto da PCR purificado, para a inserção do fragmento pVL_{DH} 1-43aa em vetor de clonagem pGEM. O volume final da reação foi de 15 µl utilizando os outros reagentes que compõem a reação (quadro III). A ligação foi submetida a 16 °C por 16 horas para posterior inserção em célula hospedeira TOP 10.

Quadro 3 - Condição utilizada para a ligação do fragmento pVL_{DH} 1-43aa em vetor de clonagem pGEM.

REAGENTE	CONDIÇÃO/µl
Produto da PCR purificado	3
Vetor de Clonagem	1
T4 DNA ligase	1
Tampão da ligase	3
H ₂ O	7

1.13.4 Preparação de célula competente para a inserção do plasmídeo recombinante – transformação

Para o preparo de *E. coli* TOP 10 quimicamente competente, inicialmente, utilizou-se o protocolo descrito por Lederberg e Cohen (1974). As bactérias foram incubadas em 100 ml de LB até atingir D.O. 0.6, em seguida, foram centrifugadas a 4.000 rpm, 4 °C por 10 minutos e homogeneizada diversas vezes em tampão CaCl₂ a 50 mM.

1.13.5 Transformação de célula quimicamente competente

A inserção do plasmídeo de clonagem recombinante (pGEM + fragmento de pVL_{DH}) em bactéria *E. coli* Top 10 obedeceu o protocolo descrito por Cohen e colaboradores (1972). Todo o produto da ligação foi adicionado a 100 µl de célula competente e incubados no gelo por 45 minutos. Posteriormente, incubou-se o

material a 42 °C por dois minutos e, em seguida, no gelo por 10 minutos e, por fim, acrescentou-se 1 ml de LB ao conteúdo e incubou-se a 37 ° C sob agitação constante por 1 hora. Em seguida, o material foi cultivado em placas de Luria Bertani Agar (LB Agar) contendo Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG), 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) e ampicilina (100 μ g/ml) para o crescimento bacteriano e seleção de colônias transformantes, seguindo as instruções do fabricante do vetor pGEM (Promega).

1.13.6 Lise de bactérias transformantes

As colônias transformantes obtidas no tópico 4.7.5 foram escolhidas aleatoriamente, repicadas organizadamente em uma segunda placa de LB Agar e mantidas a 37 °C por 16 h. Em seguida, as colônias foram colocadas individualmente em 50 μ l de água para injeção e, posteriormente, foram passadas para o nitrogênio líquido por alguns segundos, para congelamento rápido, e logo em seguida, para o banho seco a 95 °C por 10 minutos.

1.13.7 Triagem das colônias por pcr usando primer sense e antisense

Para a comprovação da identidade das colônias transformantes foi realizada a PCR, para a amplificação do gene de interesse, sob a mesma condição já descrita anteriormente (Tópico 4.5)

1.13.8 Extração plasmidial

As colônias com resultado positivo, verificadas através da PCR, foram cultivadas em 3 ml de meio LB líquido contendo ampicilina, a 37 ° C, por 16 horas. Realizou-se um Miniprep das colônias, utilizando o kit Qiaprep spin (QIAGEN), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

1.13.9 Digestão do vetor de clonagem com enzima de restrição *EcoRI*

Utilizou-se 1 µl da enzima de restrição *EcoRI* para 5 µl do vetor de clonagem. O produto final de 10 µl, dividido também entre os outros reagentes que compõem a reação (Quadro IV), foi incubado a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, o produto foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, utilizando agarose na concentração 1.5%, para a verificação das respectivas bandas em gel (plasmídeo e fragmento *pVLDH 1-43aa* devidamente digerido). Em seguida, as bandas obtidas por digestão foram purificadas segundo o protocolo já mencionado anteriormente para a purificação de DNA em gel.

Quadro 4 - Condição utilizada para a digestão do vetor de clonagem pGEM.

REAGENTE	CONDIÇÃO/µl
Plasmídeo	5
Enzima <i>EcoRI</i>	1
Tampão da Enzima	1
H ₂ O	3

1.13.10 Subclonagem: ligação de fragmento *pVLDH1-34aa* em vetor de expressão pRSET A e transformação

Utilizou-se 1 µl de vetor de expressão pRSET A para 3 µl de fragmento *pVLDH 1-43aa* para ligação do fragmento em plasmídeo de expressão. O volume final de 50 µl dividido também entre os outros reagentes que compõem a reação (Quadro V), foi então submetido à temperatura de 16 °C por 16 horas.

Quadro 5 - Condição utilizada para a subclonagem de *pVLDH 1-43aa*.

REAGENTE	CONDIÇÃO/µl
Fragmento	25
Plasmídeo	5
Enzima T4 ligase	2
Tampão da Enzima	10
H ₂ O	8

Em seguida, o produto da ligação foi inserido em *E. coli*, cepa TOP 10, como descrito no tópico 4.7.5.

1.13.11 Pcr de colônias transformantes e extração plasmidial (miniprep)

Após lise de colônias transformantes, selecionadas aleatoriamente como descrito anteriormente, para confirmar a presença da sequência alvo, realizou-se a PCR conforme as condições citadas anteriormente (Tópico 3.5). Em seguida, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1.5% para a verificação e análise de bandas de DNA amplificadas. Posteriormente, realizou-se uma extração plasmidial em baixa escala, utilizando kit Quiaprep Spin (Quiagen), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

1.13.12 Digestão com enzima de restrição EcoRI E BamHI

Utilizou-se a enzima de restrição *EcoRI* e *BamHI* para a digerir o fragmento *pVLDH 1-43aa* inserido no vetor de expressão pRSET A, seguindo a condição exposta no quadro VI . A reação foi incubada a 37 ° C, por 1 hora. Posteriormente, o conteúdo foi submetido à eletroforese em tampão TBE 1X a 100 V, por 45 minutos, utilizando agarose 1.5%, para a verificação das respectivas bandas em gel (plasmídeo e fragmento *pVLDH1-43aa* devidamente digerido).

Quadro 6 - Condição utilizada para a digestão do pRSET A.

REAGENTE	CONDIÇÃO/ul
Plasmídeo	5
Enzima Eco RI	1
Enzima BamHI	1
Tampão da Enzima	1
H2O	3

1.13.13 Sequenciamento

Para o conhecimento da sequência de bases nitrogenadas correspondente ao gene em questão, realizou-se o sequenciamento das amostras em parceria com a Plataforma de Sequenciamento da Fundação Oswald Cruz / BA. Para esta reação, utilizou-se o óligo universal T7 e um analisador genético Abi 3100 (Applied Biosystems). Posteriormente, realizou-se a análise do sequenciamento por Bioinformática utilizando as ferramentas disponíveis *online* BLASTp (NCBI) e PROTPARAM (Expasy) seguida da extração plasmidial utilizando o “kit” Plasmid Midi Kit (100) (Quiagen) (seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante) do plasmídeo que apresentou a sequência com maior similaridade as depositadas no NCBI.

1.13.14 Preparação de células eletrocompetentes

Para o preparo de *E. coli*, cepa BL21(DE3) pLysS, competente, utilizou-se o protocolo fornecido pelo grupo de Pesquisa em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas. Resumidamente, as bactérias foram incubadas em 300 ml de LB líquido até atingir D.O 0.5 e, posteriormente, centrifugadas a 4.000 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e o “pellet” ressuspensão sucessivas vezes em tampão glicerol 10%.

1.13.15 Transformação de células eletrocompetentes

Para a inserção do plasmídeo de expressão recombinante, em célula bacteriana *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimicamente competente, utilizou-se 1 µl do produto da ligação para 50 µl de célula competente e incubou-se no gelo por 5 minutos. Posteriormente, colocou-se o conteúdo em cubeta de eletroporação para o choque térmico a 1.900 V. Em seguida, adicionou-se ao conteúdo 950 µl de LB⁺ (glicose e MgCl₂) e incubou-se a 37 ° C, por 1 hora e colocou-se em placas de Petri

contendo LB agar e os respectivos antibióticos para o crescimento bacteriano em placas.

1.14 Cultivo e indução de proteína *pVLDH1-43aa* recombinante

Após extração plasmidial da colônia que possuía o fragmento, confirmado através da PCR, digestão com as respectivas enzimas de restrição e sequenciamento, realizou-se a inserção do plasmídeo em célula competente BL21. As colônias transformadas foram cultivadas em três ml de LB contendo ampicilina e cloranfenicol por 16 horas a 37 ° C. Em seguida, a colônia cultivada foi adicionada a 200 ml de LB contendo os respectivos antibióticos. Posteriormente, o conteúdo foi incubado até atingir D.O. 0.8 para a aplicação do reagente indutor IPTG na concentração final de 1mM. O conteúdo foi incubado a 37 ° C sob agitação constante, por 3 horas e centrifugado a 4.000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C.

1.15 Análise de proteína

Para a análise da proteína recombinante *pVLDH*, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE. Após corrida em gel de poliacrilamida, fixou-se a proteína em solução corante contendo ácido acético glacial, etanol e Coomassie diluídos em H₂O, que além de fixá-las, mantém as proteínas desnaturadas. Uma vez coradas, foram submetidas à descoloração, utilizando os mesmos reagentes exceto o Coomassie, para visualização e análise de proteínas. Neste estudo, utilizou-se gel de poliacrilamida 15% segundo Maniatis (1989).

1.16 Purificação de proteína recombinante

Primeiramente a proteína recombinante pLDH foi ressuspensa em tampão contendo uréia e β -mercaptoetanol. Posteriormente, a proteína foi purificada pela técnica denominada Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado (IMAC) desenvolvida por Porath em 1975. Neste estudo, utilizou-se a coluna de purificação contendo íons Ni^{2+} (Invitrogen) em afinidade a cauda de Histidina inserida na proteína. A retenção da proteína pLDH1-43aa foi testada em várias concentrações de imidazol, de 80 a 1000 mM em duplicata.

1.17 Produção de anticorpos

Camundongos da linhagem Balb/c e coelhos foram imunizados, via intraperitoneal, com 50 e 500 μ g, respectivamente, de proteína recombinante pLDH purificada e diluída em solução salina e Adjuvante Completo de Freund. Após quinze dias, os plasmas dos camundongos e coelhos imunizados foram testados por ELISA, e a cada quinze dias foram aplicados dois reforços, desta vez, com Adjuvante Incompleto de Freund.

1.18 ELISA indireto

As reações por Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), segundo Harlow e Lane (1988), foram realizadas para avaliar a resposta de camundongos e coelhos às imunizações. Resumidamente, poços de placas de 96 wels foram sensibilizados com proteína recombinante pLDH diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6 overnight a 4° C. Dia seguinte, os poços foram lavados 3 vezes com PBS twen 0,05%, e bloqueados com PBS/leite desnatado a 5%, adicionando-se 200 μ l/poço e incubados a 37°C por 2 hs. Soros diluídos a 1/100

foram colocados nos poços e incubados em câmara úmida em estufa a 37°C, por 1 h e em seguida lavados 3 vezes em PBS tween 0,05%. Conjugado anti-IgG de camundongo peroxidase HRP diluídos a 1/2.500 foram adicionados nos poços e incubados a 37°C por 1 h e, em seguida, lavados 3 vezes em PBS tween 0,05 %. Substância cromogênica Tetrametilbenzidina (TMB - Sigma) e H₂O₂ foi adicionada durante 15 minutos para revelação da reação que, em seguida, foi interrompida com 50µl H₂SO₄ a 2M e lida em leitor de ELISA em um filtro de 492nm. Para a titulação dos anticorpos os plasmas dos animais foram diluídos por sete vezes (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 e 1/6400).

1.19 Purificação de anticorpos e ELISA sanduíche

Anticorpos IgG de camundongos e coelhos foram purificados por Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sepharose Proteína A. Os ensaios de reação ELISA em sistema “sanduíche”, para a detecção de antígeno malárico, foram elaboradas com as frações IgG purificadas de camundongos e coelhos imunizados para avaliar a viabilidade dos anticorpos em resposta ao antígeno presente em amostras sanguíneas infectadas por *P. vivax*. Para isto, foram utilizados dois esquemas nos ensaios: 1) um anticorpo IgG policlonal de coelho como anticorpo de captura (para o reconhecimento de um fragmento pVL_{DH} 1-43 aa) e um anticorpo IgG policlonal de camundongo como anticorpo primário (também para o reconhecimento de um fragmento pVL_{DH} 1-43 aa) e 2) um anticorpo IgG policlonal de coelho como anticorpo de captura (para o reconhecimento de um fragmento pVL_{DH} 1-43 aa) e um anticorpo IgG policlonal de camundongo como anticorpo primário (para o reconhecimento da LDH de *Plasmodium* em sua quase totalidade, obtido em um trabalho anterior, conforme tópico 1.4) (Figura 17).

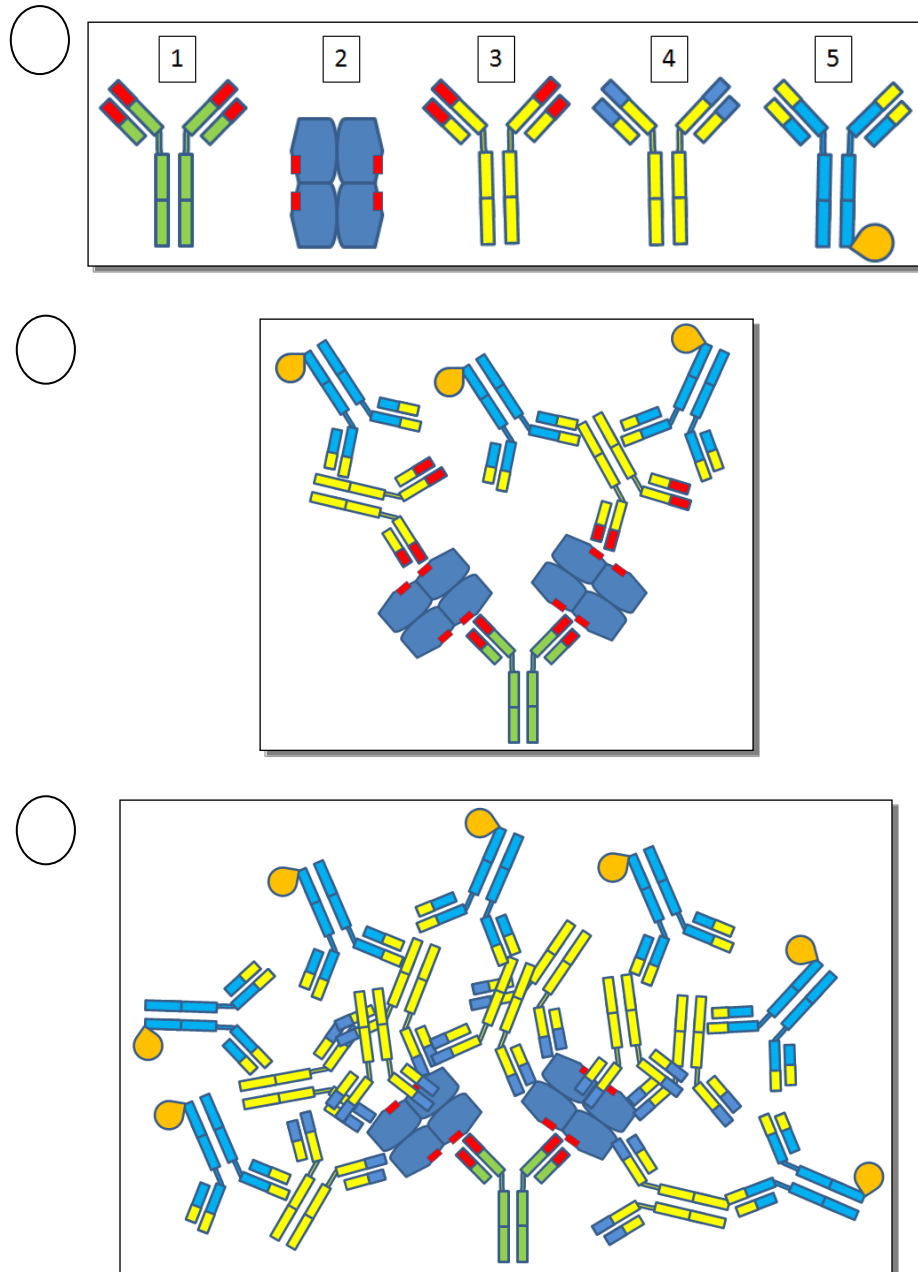


Figura 14 - Modelos experimentais do ELISA Sanduíche. A - Componentes dos sistemas: 1) Anticorpo de coelho anti-LDH de *P. vivax* região 1-43 aa; 2) Lactato Desidrogenase nativa (ilustração tetramérica baseada na estrutura tridimensional do antígeno descrita por Chaikuad (2005); 3) Anticorpo de camundongo anti-LDH de *P. vivax* região 1-43 aa; 4) Anticorpo de camundongo anti-LDH de *P. vivax* região 35-305 aa; 5) Anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a enzima *Horseradish* peroxidase. B - Teste 1: Anticorpo de coelho anti-pLDH 1-43 aa foi utilizado para capturar a LDH nativa através de reconhecimento de uma pequena região do antígeno. Anticorpos de camundongo anti-pLDH 1-43 aa foram utilizados para reconhecer a mesma região do anticorpo de captura, sendo esta reação revelada utilizando um anticorpos secundário anti-camundongo. C - Anticorpo de coelho anti-pLDH 1-43 aa foi utilizado para capturar a LDH nativa através de reconhecimento de uma pequena região do antígeno. Anticorpos de camundongo anti-pLDH 35-305 aa foram utilizados para reconhecer demais regiões do anticorpo de captura, sendo esta reação revelada utilizando um anticorpo secundário anti-camundongo.

1.20 Análise dos dados

Os resultados obtidos no presente estudo foram analisados utilizando o programa estatístico PRISM versão 5.0 (Graph Pad Software). O cálculo do cut-off foi realizado segundo a média do controle negativo mais duas vezes o desvio padrão (Silveira, 2009). A análise do coeficiente Kappa, para verificar o grau de concordância entre os ensaios imunoenzimáticos ELISA em sistema sanduíche, foi realizada segundo Landis & Koch (1977).



Resultados

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A novel polyclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of *Plasmodium vivax* developed from two lactate dehydrogenase protein segments

Luciana Pereira Sousa¹, Luis André Morais Mariuba^{1*}, Rudson Jesus Holanda², João Paulo Pimentel¹, Maria Edilene Martins Almeida¹, Yury Oliveira Chaves¹, Davi Borges¹, Emerson Lima³, James Lee Crainey¹, Patricia Puccinelli Orlandi¹, Marcus Vinicius Lacerda⁴ and Paulo Afonso Nogueira¹

Abstract

Background: Immunoassays for *Plasmodium* detection are, presently, most frequently based on monoclonal antibodies (MAbs); Polyclonal antibodies (PABs), which are cheaper to develop and manufacture, are much less frequently used. In the present study we describe a sandwich ELISA assay which is capable of detecting *P. vivax* Lactate Dehydrogenase (LDH) in clinical blood samples, without cross reacting with those infected with *P. falciparum*.

Methods: Two recombinant proteins were produced from different regions of the *P. vivax* LDH gene. Two sandwich ELISA assay were then designed: One which uses mouse anti-LDH 1-43aa PABs as primary antibodies ("Test 1") and another which uses anti-LDH 35-305aa PABs ("Test 2") as the primary antibodies. Rabbit anti-LDH 1-43aa PABs were used as capture antibodies in both ELISA assays. Blood samples taken from *P. vivax* and *P. falciparum* infected patients (confirmed by light microscopy) were analysed using both tests.

Results: "Test 2" performed better at detecting microscopy-positive blood samples when compared to "Test 1", identifying 131 of 154 positive samples (85%); 85 positives (55%) were identified using "test 1". "Test 1" produced one false positive sample (from the 20 malaria-free control) blood samples; "test 2" produced none. Kappa coefficient analysis of the results produced a value of 0.267 when microscope-positive blood smears were compared with "test 1", but 0.734 when microscope-positive blood smears were compared with the results from "test 2". Positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were observed to be 98% and 22% respectively, for "Test 1", and 99% and 45%, for "test 2". No cross reactivity was detected with *P. falciparum* positive blood samples (n = 15) with either test assay.

Conclusion: Both tests detected *P. vivax* infected blood and showed no evidence of cross-reacting with *P. falciparum*. Further studies will need to be conducted to establish the full potential of this technique for malaria diagnostics. As well as representing a promising new cost-effective novel technique for *P. vivax* diagnosis and research, the method for developing this assay also highlights the potential for PAB-based strategies for diagnostics in general.

Keywords: Malaria diagnosis, Lactate dehydrogenase, Recombinant protein, ELISA

* Correspondence: mariuba@amazonia.fiocruz.br
¹LMD, Instituto Leônidas and Maria Deane, 476, Teresina Street, 69057-070
Manaus, AM, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

© 2014 Sousa et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

carrying with it an enormous cost in human suffering and economic hardship. In 2010 there were an estimated 216 million cases of the disease [1] and over half a million deaths attributed to it [2]. Despite great advancements in many areas of malaria research, light microscopy-based methods of parasite detection, which were first developed over a century ago, still remain as the gold standard and the most commonly used way of detecting malaria parasites in blood samples [3].

Although this technique is cost-effective and permits quantitative and qualitative parasite detection, it has some quite serious limitations. As well as requiring specialist equipment and staff training, light microscopy also needs basic infrastructural support and is unable to detect very low levels of parasitemia [4,5]. As a result of these limitations, prevalence levels can be underestimated and diagnostic errors can be made, which can lead to adaption to infrastructure-free settings than the other existent approaches. For this reason Immunological assays have become basis of most commercial diagnostic test kits, with most interest focused on the use of monoclonal antibodies (MAbs) [10,11]. Almost all of the malaria rapid diagnostic tests (RDTs) that are presently available on the commercial market make use of MAbs to detect the presence of parasite proteins. Although such MAb-based methods offer a potentially powerful infrastructure-free way of diagnosing the presence of malaria parasites and are increasingly being used for this purpose, RDTs are still only used for a small fraction of the hundreds of thousands of malaria diagnoses made annually [1]. Part of the reason for this is that RDT test kits are still too expensive for routine usage in developing countries where most malaria occurs [12] and part of the

suboptimal malaria treatment regimens [6,7].

PCR-based malaria detection offers a greater level of sensitivity than light microscopy [8]; however, it too also requires specific apparatus, technical experience and even more complex and expensive infrastructural support (especially if the technique is required to have a quantitative dimension) [9]. Thus while PCR has helped to illuminate the limitations of light microscopy-based malaria detection, it is still not a major part of routine malaria parasite detection, especially in remote areas where malaria can be prevalent.

Immunological assays which use antibodies to detect parasite molecules offer a fundamentally different approach to both PCR and light microscopy. Although these assays can also suffer from sensitivity issues, they have a far greater potential for

reason is that RDTs can be unreliable and often recommend that diagnosed results are validated with light microscopy anyway [13-19].

While MAb-based ELISA assays are generally more sensitive than MAb-based rapid diagnostic tests (RDTs) and they can offer certain advantages over PCR and light microscopy for malaria diagnosis, the infrastructure requirements for their use in ELISA assays are similar to those needed for PCR and light microscopy diagnoses. In contrast to MAbs, polyclonal-antibodies (PABs) are far simpler and cheaper to develop and manufacture [20] and therefore offer the potential to lower the cost of both RDTs and laboratory-based ELISA assays for malaria diagnosis and, by doing so, potentially broaden the appeal of Immunoassays in both laboratory and field settings. PAB-based immunoassays can, however,

sometimes be more sensitive to false positives, than MAbbased assays [21], which is a problem that this paper has attempted to address.

In this paper we describe the development of a novel polyclonal based technique for the detection of the Malaria parasite *P. vivax*. The technique developed has avoided cross-reactivity issues by using two polyclonal antibody sets in concert: one directed to a short portion of the n-terminal region of the *P. vivax* lactate dehydrogenase (PvLDH) and one to a larger over-lapping portion of the same protein.

METHODS

Blood sample collection from patients infected with Plasmodium vivax

Red blood cells (RBC) of 154 patients infected with *Plasmodium vivax* were collected between March of 2010 and February of 2011. RBC of 15 patients infected with *P. falciparum* were also collected. *Plasmodium vivax* and *P. falciparum* were confirmed with light microscopy. Secondary laboratory confirmation of *P. falciparum* blood infections was obtained by ELISA using an anti- HRP2 (Histidine rich protein 2) *P. falciparum* specific assay, described previously. A control group was formed with twenty blood samples taken from healthy individuals who were not thought to have been exposed to malaria for more than 6 month. Following collection, all samples were centrifuged; serum and erythrocytes were then separated and stored at -20°C until their use in the ELISA assays, described below.

Recombinant protein production and quality assessment

As a first step in the production of polyclonal antibodies for detection of native LDH from *P. vivax* (pvLDHn), two recombinant proteins were designed (see Figures 1A and B). The first protein (pvLDH1-43) was designed to contain the amino acid residues corresponding to positions 1° to 43° of the pvLDHn protein (i.e. an extension of the region used successfully by Piper et al. (1999) [10] in a similar MAb immunoassay and second protein (pvLDH35-305) was designed to contain the amino acid residues from positions 35° to 305° of the pvLDHn protein (aiming the production of antibodies capable to interact with a large area of antigen target). Molecular mass predictions for each of the two designed proteins were made using the program Protparam (Expasy).

For *Plasmodium vivax* genomic DNA extraction, 100 µl of erythrocytes' sediment was treated with 1% saponin in Salt phosphate buffer for 20 minutes. After centrifugation the pellet was resuspended in distilled water and treated with lysis buffer (40 mM Tris, pH 8; 80 mM EDTA; 2%SDS; 0,1 mg/ml of K-proteinase) for 16 hours. Distilled water was added to make-up each preparation to a 500 µl volume; five hundred microliters of phenol were then added to the preparation and the resultant 1 ml solution was homogenized and centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the aqueous phase was collected and homogenized with chloroform; 250 µl of the aqueous phase of this preparation was then added to 45 µl of 3 M of sodium acetate. Genomic DNA was then precipitated with 100% ethanol. DNA was then pelleted with centrifugation and then washed with 70% ethanol and centrifugation.

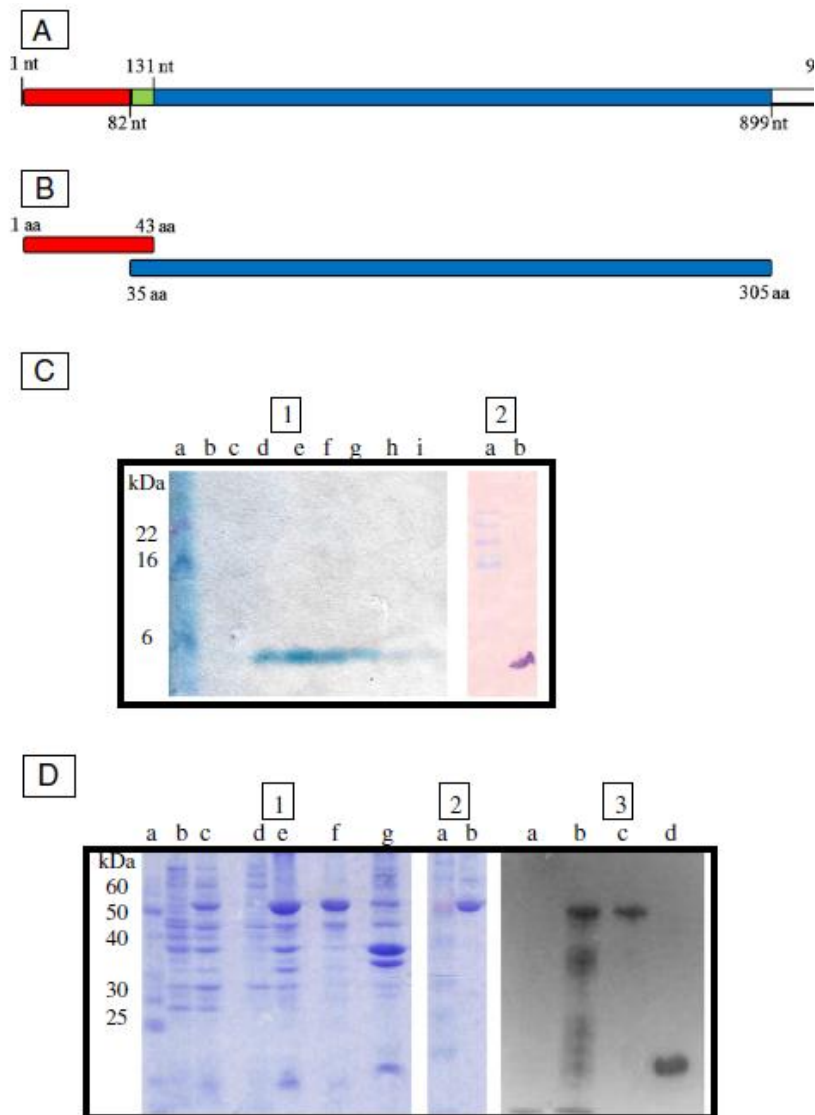


Figure 1 Recombinant protein production for pvLDH epitope preparations. **A)** Shows the pvLDH gene sequence targeted for “pvLDH 1-43aa” protein production; PCR primers were used to amplify nucleotide positions 1 to 131 (shown in red and green). For “pvLDH 35-305aa” protein production, PCR primers were designed to amplify nucleotide positions 82 to 899 (shown in green and blue). **B)** Shows the corresponding protein segments “pvLDH 1-43aa” and “pvLDH 35-305aa” that were subsequently cloned and expressed. **C)** Shows the results from a SDS page gel and an immunoblot that were used to confirm the successful expression and isolation of a recombinant proteins of the size expected of pvLDH 1-43aa protein segments. **D)** Shows the results from a western blot confirming the successful expression and isolation of a recombinant protein of a size expected for pvLDH 35-305aa recombinant protein segment. NT = Nucleotide; AA = Aminoacids.

For production of pvLDH1-43, two oligonucleotide primers were used to amplify the targeted region for cloning: the forward primer was 5' ggatccATGACGCC GAAACCCAAAATTGT 3' and reverse

primer was 5' gaattcTTTCCTTGGGGCCATGTTTTT 3'. The reaction mixture used for PCR amplification was prepared containing: 1X Taq DNA polymerase buffer, 2.25 nM MgCl₂, 0,125 mM dNTP

(Invitrogen), 0.6 pMol of each oligonucleotide primer, around 100 pg genomic DNA and 1 unit of Taq polymerase enzyme (Invitrogen) in a final volume of 50 μ L. Sterile distilled water was used to make a final reaction volume of 25 μ L. PCR conditions were as follows: One initial denaturing step at 94°C for 5 min; followed by 30 cycles of denaturing at 94°C for 1 minute, annealing at 69°C for 30 seconds and extending at 72°C for 1 minute; and a final extension step at 72°C for 10 minutes. The resultant PCR product was purified using a Gel Extract kit (Qiagen) and then cloned using a commercially purchased vector (pGEM-T Easy plasmid, Promega) and competent E. coli cells. A plasmid preparation of pGEMpvLDH 1-43aa was then made using a QIAGEN miniprep kit and digested with the restriction enzymes BamH1 and EcoR1 (Invitrogen). The digested plasmid insert was then isolated by gel extraction (using a Qiagen gel extraction kit) and then directional cloned into an expression vector using pRSET A (Invitrogen) and E. coli competent cells. Successful cloning of the targeted gene sequence was then confirmed by Sanger sequencing the pRSETA-pvLDH 1- 43aa insert in two directions using vector and insert primers and an Abi 3100 genetic analyzer and recommended reagents and protocols (Applied Biosystems).

After sequence integrity confirmation, purified plasmid pRSETA-pvLD 1-43aa was used to transform competent E. coli BL21 (DE3) pLysS cells for expression. Transformed colony isolates were incubated in a 200 ml LB ampicillin culture at 37°C, with constant agitation until the cell density provided an OD (optical density) reading of 0.8. At this point, induction of the gene expression was initiated with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (at a final

working concentration of 1 mM). Following induction, the culture was incubated, as before, for a further 3 hours. The cell suspension was subsequently centrifuged at 14 000 rpm, at 4°C, for 15 minutes and the pelleted cells were resuspended in buffer 2 (20 mM Tris, pH 7.9; 0.5 M NaCl; 10% glycerol; 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride), and left, rocking, for 30 minutes. Recombinant proteins, contained in the resultant soluble fraction were decanted from cell debris after centrifugation at 14 000 rpm at 25°C for 15 minutes and were then isolated using Ni-NTA columns (QIAGEN) for purification of recombinant protein under denaturing conditions, following the manufacture's recommendations. SDS-PAGE gels were used to monitor protein expression and purification, and an anti-HisG antibody (Invitrogen) immunoblot (with Western Breeze kit [Invitrogen]) was used to ensure the presence of polyhistidine tag in the recombinant protein.

For production of pvLDH35-305, the forward primer used was 5' GGATCCATGACGTAGTGAAAA 3' and reverse primer used was 5' GAATTCAACTGCCTCGT CG 3'. The reaction mixture used for gene amplification was prepared containing 1X Taq DNA polymerase buffer, with 3 mM MgCl₂, 0.15 mM dNTPs, 15 pMol of each oligonucleotide primer, 100 pg genomic DNA and 1 unit of Taq polymerase enzyme (Invitrogen) in a final volume of 50 μ L. The PCR conditions used for amplification were as follows: one initial denaturing step at 94°C for 5 minutes; followed by 30 cycles of a denaturing step at 94°C for 1 minute followed by an annealing at 62°C for 1 minute and an extension step at 72°C for 1 minute; and then finally a 72°C final extension step lasting 5 minutes. The resultant PCR product was purified and cloned into a

protein expression vector. The approach used to create and assay protein production from pGEX3X-pvLDH 35-305aa was very similar to that used to create from pRSETA-pvLDH 1-43aa. Purification of GST tagged protein was conducted with a glutathione sepharose kit following the manufacture's instructions (Amershan).

Polyclonal antibodies attainment and purification

Two groups of three mice and one rabbit were immunized separately with pvLDH1-43 protein serum. Mice and rabbits were stimulated with 50 µg and 500 µg of recombinant protein, respectively. Three inoculations were carried-out in both kinds of animal with intervals of 15 days, using complete freund's adjuvant in first inoculum and incomplete freund's adjuvant in the others. Indirect ELISA using animal sera were used to monitor humoral response. The most responsive animals, total serum was obtained and IgG was purified using Protein A sepharose (Amershan) [22]. Animals were bled and serum purified in polyclonal antibody preparations with concentrations of 1 µg/µL and 6 µg/µL from mice and rabbits, respectively. Purified pvLDH35-305 was inoculated just in mice for this study.

ELISAs for antigen detection

Sandwich ELISAs for LDH *P. vivax* and *P. falciparum* detection were done using rabbit and mouse purified

IgGs. Two systems were tested: a two-site polyclonal antibody sandwich ELISA using just anti-pvLDH 1-43aa (coating plates with rabbit antibody and mouse antibody as primary, ("test 1" Figure 2B), and a two site polyclonal antibody sandwich ELISA using anti-pvLDH 1-43aa (for coating) and anti-pvLDH 35-305aa (as primary) ("test 2", Figure 2C).

Briefly, ELISA plates were coated with 50 µl of rabbit polyclonal antibodies anti-pvLDH 1-43aa at a concentration of 4 µg /mL in sodium bicarbonate buffer (pH 9.6). The coated plates were incubated at 4°C overnight. After blocking at 37°C with phosphate buffer containing 5% skimmed milk (w/v) for 2 h, plates were washed with phosphate buffer. Test sample (12,5 µL of erythrocyte concentrate plus 37,5 µL of 0,1% Triton x-100) were then added in duplicates into the plates and incubated for 1 h at 37°C. After the washing step with the phosphate buffer, primary mouse antibody at a concentration of 16 µg/ml was added. Bound antibodies were detected with HRP (Horseradish peroxidase) conjugated goat anti-mouse IgG antibodies (adsorbed to rabbit antibodies, KPL), and reveled using TMB (0.1 mg/ml final concentration), 0,04% f.c. H2O2, in phosphate-citrate buffer.

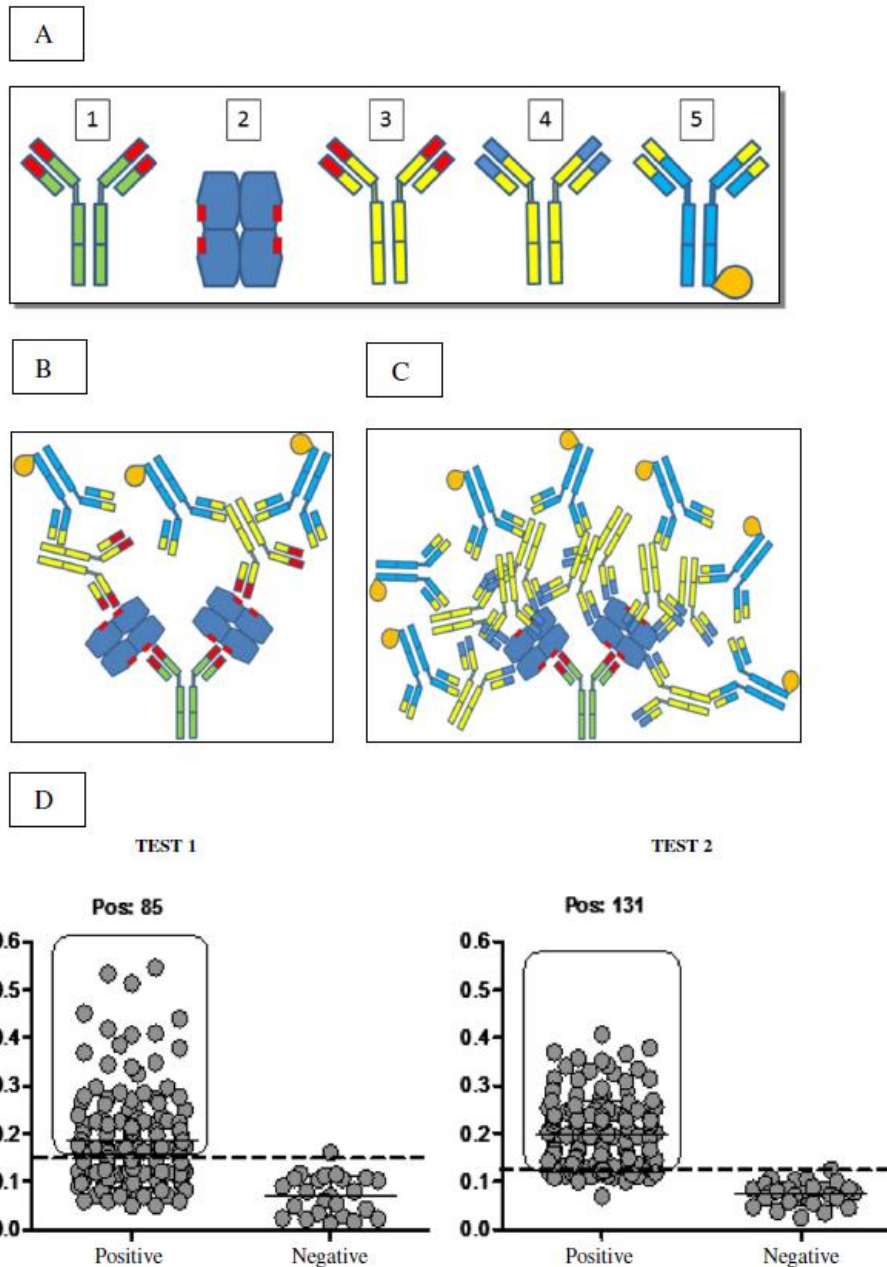


Figure 2 pvLDH PAb Sandwich ELISA assays. **A)** Shows the systems components labeled: 1) Rabbit antibody anti-pvLDH 1-43 aa; 2) Native LDH (draw based in tetrameric structure described by Chaikuad (2005)); 3) Mouse antibody anti-pvLDH 1-43 aa; 4) Mouse antibody anti-pvLDH 35-305aa; 5) Goat secondary antibody anti-mouse IgG conjugated to HRP. **B)** Shows a graphic representation of “test 1”. **C)** Shows a graphic representation of “test 2”. **D)** Shows two dot plots illustrating performance of the two PAb assays tests described in main text. Values indicated on the Y-axis are for optical density measurements. Individual data points are represented with spots. In both test data sets, points from negative control blood samples are displayed on the right hand side of the plots and those from the microscope slide positive samples are shown on the left. Solid horizontal lines represent test mean values, dashed lines indicate test cut-off points.

Alignment and linear B-cell epitopes analyses

Residues 1-43aa of lactate dehydrogenase from *P. vivax* (AEP83563.1), *P. ovale* (AAS77571.1),

P. malariae (AAS77572.1), *P. falciparum* (ABH03417.1), *P. berguie* (AY437808.1), *P. knowles* (JF958130.1) and *P. yoelli* (XP_724101.1) were downloaded from the NCBI protein databases and then edited manually before being aligned

using Clustal W2. Detection of linear B-cell epitopes was done using Bepiprep

1.0 server (Larsen & Nielsen, 2006) and a threshold value of 0.2.

```

Piper et al. (1999)  PKAKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNL
P.falciparum      MAPKAKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVLFDIVKNMPHG 43
P.yoelii         MAPKAKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVLFDIVKNMPHG 43
P.berguie       MAPKAKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVMFDIVKNMPHG 43
P.ovale         -----VLVSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVMFDIVKNMPLG 36
P.malarie       -----VLVSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVMFDIVKNMPYG 36
P.vivax         MTPKPKLVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGDVMFDVVKNMPQG 43
P.knowlesi      MAPKPKIVLVGSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVMFDVVKNMPQG 43
*****:***:*****
  
```

Figure 3. Alignment of residue 1-43aa from different Plasmodium species. Highlighted amino acids were the detected ones in Bepiprep (threshold = 0.2). Bold letters and red box represent the difference between *P. vivax* and *P. falciparum* at this region

Data management and statistical analysis

Data was recorded on registered forms and entered into a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft Corporation). Cut-offs were calculated using the mean optical density readings from negative sample plus twice the standard deviation of negative samples. Calculation of specificity, sensitivity, positive predictive and negative predictive values followed procedures detailed in [23]. Agreement for results of microscopy and ELISA, and between the two ELISA methods was calculated with kappa values. A kappa value between 0.6 and 0.8 was considered a good agreement, higher than 0.8 was considered as excellent [24].

Ethical review

The study was approved by the Brazilian Animal Ethical Committee (CEEA-UFAM 005/2010) and the Human Research Ethical Committee of Amazonas Federal University (CAAE 3640.0.000.115-07). All patients signed a statement of consent.

RESULTS AND DISCUSSION

Most Malaria immunological assays target one of three malaria proteins: Histidine rich protein 2 (HRP2), aldolase or lactate dehydrogenase (LDH), all of which are known to be abundant and detectable in blood serum. Studies on LDH, however, have shown that blood concentrations of the LDH proteins correlate strongly with parasite blood-levels and thus assays targeting this protein can have a quantitative dimension. Although the development of a quantitative assay was not an initial goal of this work, and outside the scope of the work presented here, this feature contributed to its selection as a target for this work.

DNA sequence analysis confirmed that the two LDH gene segments that were targeted for this study (pvLDH 1-43aa and pvLDH 35-305aa) were successfully cloned into plasmid expression vectors. The successful expression of recombinant proteins from their vectors was confirmed with Western blot (see Figures 1C and D). Initial sandwich

ELISA assays carried out with the PABs generated from the pvLDH 35-305aa showed unacceptably high levels of cross-reactivity (data not shown) in negative samples, presumably caused by the presence of native human LDH in blood samples. The pvLDH 1-43aa PABs developed here were specifically designed to combat this issue. Rabbit and mice PABs directed to pvLDH 1-43aa, when used in combination as capture and primary antibodies respectively in “test 1” (see Figure 2B and C), showed unacceptably low level of parasite detection (only 85 of 154 [55%] microscope positive samples tested positive with this test), although they did not show much evidence of cross reaction: just one of the malaria-free control group blood samples (1/20) tested positive for the parasite with this assay (see Figure 2D). One possible explanation for this observation is that there is epitope binding competition between the capture and the primary antibodies used in this assay. Even though the tetrameric structure of the antigen [25] might be expected to limit the impact of such binding competition, such competition affects have been reported elsewhere [26].

The second sandwich ELISA experiment tested here was designed to harness the strengths of both assays and evade the weaknesses. In this assay (see test 2 in Figure 2D) thus anti-pvLDH pvLDH 1-43aa PABs were used as the initial capture antibodies and the anti-pvLDH 35-305aa PABs were used as primary antibodies. This test showed higher levels of parasite detection than were observed for “test 1”: A total of 131 (131/154; 85%) of the microscopy

positive samples tested positive in this assay and the assay did not generate any false positives (see Figure 2D). These results show that the tested pvLDH 35-305aa PABs are more affective primary antibody complements to pvLDH 1-43aa PABs primary antibodies than the pvLDH 1-43aa PABs are. Presumably this is because the 35-305aa PABs bind more affectively to pvLDH 1-43aa-MAb-bound native pvLDH proteins than 1-43aa PABs do, perhaps because of reduced competition. The fact that no cross reactivity was observed with this assay is likely to be a consequence of the removal of human LDH protein during the ELISA wash steps that preceded the introduction of the secondary anti-35-305aa PABs.

Surprisingly, our polyclonal antibodies were not able to detect parasites in microscope positive (and HRP2 ELISA confirmed) *P. falciparum* infected blood samples using either the “test 1” or “test 2” methodology (see Figure 3). Figure 4 shows our pvLDH 1-43aa target protein aligned to six equivalent segments from other plasmodium species and shows a region of the protein which has already been used in the development in a pan-Plasmodium sandwich ELISA. Although the apparent specificity of our assays maybe limited to the Amazonian derived *P. falciparum* samples we have tested, the low levels of between-species diversity, which can be seen in Figure 4, occur in protein regions our bepiprep analysis has predicted are most likely to be immunogenic and therefore our assay may retain this specificity for a broader range of *P. falciparum* strains.

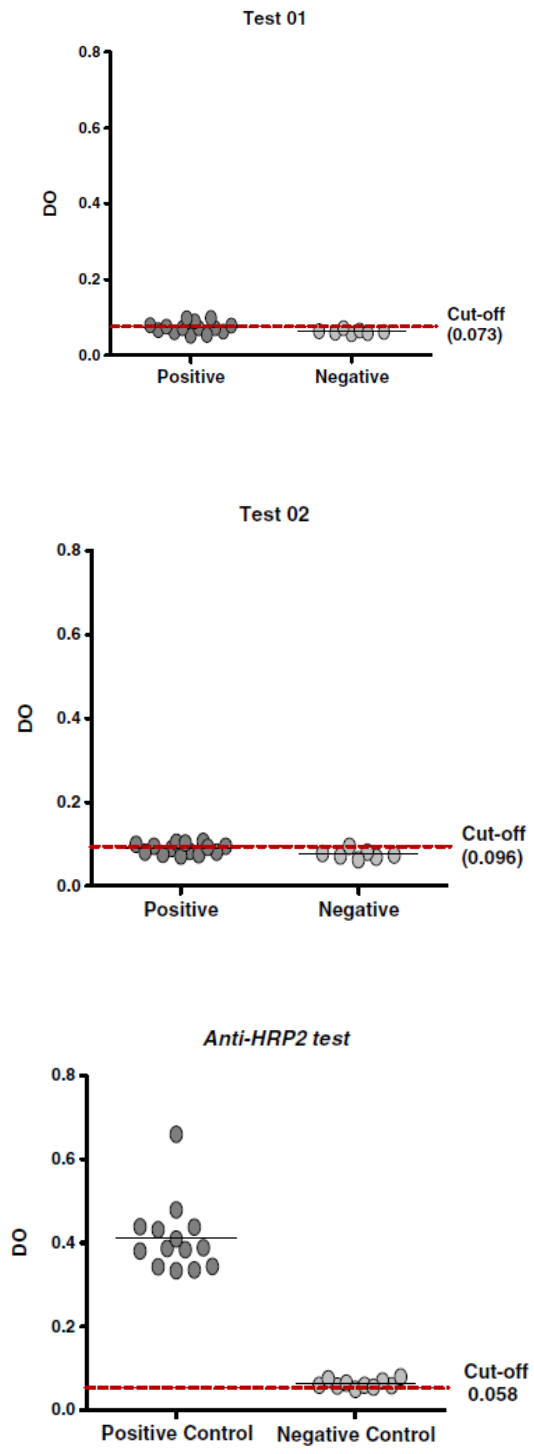


Figure 4. ELISA results of *P. falciparum* infected blood samples. Test 1 and 2 did not presented positive results. Control assay using anti-HRP2 antibodies detected all positive samples.

The combination dual-LDH PAb sandwich ELISA assay described here in test 2 thus represents a potentially powerful low cost tool, which could form the basis of a variety of immunological assays, for research and clinical diagnosis and parasite load monitoring. Using microscopy diagnosed slides as the gold standard, the positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) calculated for these tests were 98% and 22% (for “test 1”) 99% and 45%, for “test 2”. Kappa coefficient analyses of the results gave a 0.267 value when blood smears were compared to “test 1”; a 0.734 value when blood smears were compared to the results from test “test 2” and a value of 0.367 when both test 1 and 2 results were compared

CONCLUSION

In conclusion, the novel LDH targeting PAb-based sandwich ELISA “test 2” described here detects *P. vivax* microscopy-positive blood samples with an efficiency similar to what has been observed with MAb-based RDT kits. Further studies will need to be conducted to establish if the technique can be adapted to detect submicroscopic parasitic infections and/or if it can perform better with fresh blood samples and/or if it can be

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LAMN and PAN conceived, designed the study and drafted the manuscript. LPS, RJH, MEMA, YOC, DB all made substantial contributions to the acquisition of the data presented in this manuscript. EL, PPO, MVL, PAN also all made important contributions to the data contained in

with each other. Although the potential for this assay to detect submicroscopic levels of parasitemia has not yet been examined, this assay compares very favorably when compared to PCR for detecting microscope positive blood samples [4]. Similarly, when the results from “test 2” are compared with the results obtained with commercially available MAb-based immunoassays its performance can be seen to be comparable [27]. In addition to this, as the blood samples tested in this assay were all stored frozen prior to use it might also be that the sensitivity of the test can be improved with fresh blood samples as Kifude and colleagues (2008) [28] showed that HRP-2 signal detection reduces after samples are subjected to freeze and thaw cycles.

adapted for a RDT. As well as representing a promising new cost-effective novel technique for *P. vivax* diagnosis and research, the method for developing this assay also highlights the potential for PAb-based strategies for diagnostics in general. It is thus suggested here that the both dual antibody LDH sandwich ELISA described here and the technique used to generate it might stimulate further research in this field.

this article and were involved in the studies design and execution. JLC made a substantial contribution to the article's drafting and revision for publication. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities, and for financial support provided by CNPq –

“Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico” and FAPEAM – “Fundação de Amparo a pesquisa do Amazonas”.

Author details

¹ILMD, Instituto Leônidas and Maria Deane, 476, Teresina Street, 69057-070 Manaus, AM, Brazil. ²CEPEM, Centro de Pesquisa Medicina Tropical, 4,5 km 364 Road, 78900-970 Porto Velho, RO, Brazil. ³UFAM, Universidade Federal do Amazonas, 330, Alexandre Amorim Street, Aparecida, Manaus, AM, Brazil. ⁴FMT-HDV, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, 25, Pedro Teixeira Avenue, Dom Pedro, Manaus, AM, Brazil.

Received: 2 August 2013 Accepted: 14 January 2014

Published: 30 January 2014

REFERENCES

1. World Health Organization: World Malaria Report. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2011.
1. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, et al: Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010. *Lancet* 2012, 15(9859):2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0. Erratum in: *Lancet* 2013 23;381(9867):628.
2. Okell LC, Ghani AC, Lyons E, Drakeley CJ: Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis* 2009, 200(10):1509–1517.
3. Manjurano A, Okell L, Lukindo T, Reyburn H, Olomi R, Roper C, Clark TG, Joseph S, Riley EM, Drakeley C: Association of sub-microscopic malaria parasite carriage with transmission intensity in north-eastern Tanzania. *Malar J* 2011, 10:370.
4. Ashley AE, Touabi M, Ahrer M, Hutagalung R, Htun K, Luchavez J, Dureza C, Proux S, Leimanis M, Lwin MM, Koscalova A, Comte E, Hamade P, Page LA, François NF, Guerin JP: Evaluation of three parasite lactate dehydrogenasebased rapid diagnostic tests for the diagnosis of falciparum and vivax malaria. *Malar J* 2009, 8:241.
5. Bell D, Peeling R: Evaluation of rapid diagnostic tests: Malaria. *Nat Rev Microbiol* 2006, 4(9):1524.
6. White NJ: The parasite clearance curve. *Malar J* 2011, 10:278.
7. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN: Identification of the four human malarial species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol* 1993, 58:283–292.
8. Singh N, Shukla MM, Shukla MK, Mehra RK, Sharma S, Bharti PK, Singh MP, Singh A, Gunasekar A: Field and laboratory comparative evaluation of rapid malaria diagnostic tests versus traditional and molecular techniques in India. *Malar J* 2010, 9:191.
9. Piper R, Lebras J, Wentworth L, Cooke HA, Houze S, Chiodini P, Makler M: Immunocapture diagnostic assays for malaria using

- plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH). *Am J Trop Med Hyg* 1999, 60(1):109–118.
10. Shiff CJ, Premji Z, Minjas JN: The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for Plasmodium falciparum infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, 87(6):646–648.
 11. Piper RC, Buchanan I, Choi YH, Makler MT: Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. *Malar J* 2011, 10:213.
 12. Quattara A, Doumbo S, Saye R, Beavogui AH, Traoré B, Djimdé A, Niangaly A, Kayentao K, Diallo M, Doumbo OK, Thera MA: Use of a pLDH-based dipstick in the diagnostic and therapeutic follow-up of malaria patients in Mali. *Malar J* 2011, 10:345.
 13. Quintana M, Piper R, Boling HL, Makler M, Sherman C, Gill E, Fernandez E, Martin S: Malaria diagnosis by dipstick assay in a honduran population with coendemic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg* 1998, 59(6):868–871.
 14. Valéa I, Tinto H, Nikiema M, Yamuah L, Rouamba N, Drabo M, Guiguemde RT, D'alessandro U: Performance of OptiMAL-IT_ compared to microscopy, for malaria detection in Burkina Faso. *Trop Med Int Health* 2009, 14(3):338–340.
 15. Chayani N, Das B, Sur M, Bajoria S: Comparison of parasite lactate dehydrogenase based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMal®) with microscopy for detection of malaria parasites. *Indian J Med Microbiol* 2004, 22(2):104–106.
 16. de Oliveira MRF, Giozza SP, Peixoto HM, Romero GAS: Cost-effectiveness of diagnostic for malaria in Extra-Amazon Region, Brazil. *Malar J* 2012, 11:390.
 17. de Oliveira MR, de Castro GA, Toscano CM: Cost effectiveness of OptiMal® rapid diagnostic test for malaria in remote areas of the Amazon Region, Brazil. *Malar J* 2010, 9:277.
 18. Pang LW, Piovesan-Alves F: Economic advantage of a community-based malaria management program in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65(6):883–886.
 19. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Garcia FW: Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J* 2005, 46:3.
 20. Khusmith S, Intapan P, Tharavanij S, Tuntrakul S, Indravijit KA, Bunnag D: Two-site sandwich ELISA for detection of Plasmodium vivax blood stage antigens using monoclonal and polyclonal antibodies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1992, 4:745–751.
 21. Harlow E, Lane D: *Antibodies: A Laboratory Manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988:726.
 22. Lalkhen, Abdul G, McCluskey, Anthony: Clinical tests: sensitivity and specificity. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain J* 2008, 8:6.

23. Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977, 33:159–179.
24. Chaikuad A, Fairweather V, Connors R, Joseph-horne T, Turgut-balik D, Brady RL: Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH. *Biochemistry* 2005, 44(49):16221.
25. Roeffen W, Beckers PJ, Teelen K, Lensen T, Sauerwein RM, Meuwissen JH, Eling W: *Plasmodium falciparum*: a comparison of the activity of Pfs230- specific antibodies in an assay of transmission-blocking immunity and competition ELISAs. *Exp Parasitol* 1995, 80(1):15–26.
26. Waitumbi JN, Gerlach J, Afonina I, Anyona SB, Koros JN, Siangla J, Ankoudinova I, Singhal M, Katts K, Polhemus M, Vermeulen NM, Mahoney W, Steele M, Domingo GJ: Malaria prevalence defined by microscopy, antigen detection, DNA amplification and total nucleic acid amplification in a malaria-endemic region during the peak malaria transmission season. *Trop Med Int Health* 2011, 16(7):786–793.
27. Kifude CM, Rajasekariah HG, Sullivan JRDJ, Stewart VA, Angov E, Martin SK, Diggs CL, Waitumbi JN: Enzyme-linked immunosorbent
28. assay for detection of *plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in blood, plasma, and serum. *Clin Vaccine Immunol* 2008, 15(6):1012–1018.



Referências

ARCANJO, L. R. A.; LACERDA, G.V.M; ALECRIM, D. W; ALECRIM, C. G. M. Avaliação dos testes rápidos Optimal-IT e ICT Pf/Pv para o diagnóstico da malária na Atenção Básica de Saúde, no município de Manaus, Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 88-90, 2007.

ASHLEY, E.; MCGREADY, R.; PROUX, S.; NOSTEN, F. Malaria. **Travel Medicine and Infections Disease**, v. 4, p. 159-173, 2006.

ASHLEY, A. E.; TOUABI, M.; AHRER, M.; HUTAGALUNG, R.; HTUN, K.; LUCHAVEZ, J.; DUREZA, C.; PROUX, S.; LEIMANIS, M; LWIN, M. M.; KOSCALOVA, A.; COMTE, E.; HAMADE, P.; PAGE, L. A.; FRANÇOIS NOSTEN, F; GUERIN, J. P. Evaluation of three parasite lactate dehydrogenase-based rapid diagnostic tests for the diagnosis of falciparum and vivax malaria. **Malaria Journal**, n.8, p 241, 2009.

AVILA, S. L.; FERREIRA, A. W. Malaria diagnosis: a review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 4, p. 431-443. 1996.

AVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. Na appraisal of laboratory method addressing rolls back malaria. **Ciência e Cultura**, v.52, n.4, p. 220-228, 2000.

AVILA, P.E.; KIRCHGATTER, K.; BRUNIALTI, K.C.S.; OLIVEIRA, A.M.; SICILIANO, R.F.; DI SANTI, S. M. Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-CheckTM, for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 5, p 293-296, 2002.

BALIK, D. T.; CHAIKUAD A.; FAIRWEATHER, V., CONNERS, R.; TIM JOSEPH-HORNE, T.; BRADY, R. L. Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium Vivax*: Complexes with NADH and APADH. **Biochemistry**, v. 44, p. 16221-16228, 2005.

BALTAR, V. T.; OKANO, V. Análise de concordância Kappa. Disponível em: <<http://www.lee.dante.br/pesquisa/kappa/index.html>>, acesso em 01 de setembro de 2012.

BERWAL, R.; GOPALAN, N.; CHANDEL, K; PRAKASH, S; SEKHAR, K. Amplification of LDH gene from Indian strains of *Plasmodium vivax*. **J Vect Borne Dis**, v. 43, p. 109-114, 2006.

BOTERO, D.; RESTREPO, M. Parasitosis Humanas. **Corporación para Investigaciones Biológicas**, p. 149-189, 1998.

BROWN, W.M.; YOWELL, C.A.; HOARD, A.; VANDER JAGT, T. A.; HUNSAKER, L. A.; DECK, L. M.; ROYER, R. E.; PIPER, R. C.; DAME, J. B.; MAKLER, M. T.; VANDER JAGT, D. L. Comparative Strutural Analysis and Kinetic Properties of Lactate Dehydrogenases from the four Species of Malaria Parasites. **Biochemistry**, v. 43, p. 6219-6229, 2004.

BRUCE, M. C.; ALANO, P.; DUTHIE, S.; CARTER, R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v. 100, p. 191-200, 1990.

CHAIKUAD, A; FAIRWEATHER, V; CONNERS, R; JOSEPH-HORNE, T; TURGUT-BALIK, D; BRADY, RL. Structure of lactate dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH. **Biochemistry**, v. 44, p. 49, 2005.

CHAYANI, N.; DAS, B.; SUR, M.; BAJORIA, S. Comparison of parasite lactate dehydrogenase based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMal®) with microscopy for detection of malaria parasites. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 104-106, 2004.

CHONG. World intellectual Property Organization. **International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**, n 2009/075404, 2009.

CO, A. M. O.; JOHNSON, M. S.; MURTHY, T.; TALWAR, M.; HICKMAN, R. M.; JOHNSON, J. D. Recent Methods in Antimalarial Susceptibility Testing. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 148-160, 2010.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 69, p. 2110-2114, 1972.

COX, F. E. G. History of human parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-612, 2002.

COOKE, A. H.; CHIODINI, P. L.; DOHERTY, T.; MOODY, A. H.; RIES, J.; PINDER, M. Comparison of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMAL) with microscopy for the detection of malaria parasites in human blood samples. **Am J Trop Med Hyg**, v. 60, p. 173-176, 1999.

DILEK TURGUT-BALIK, T. D.; AKBULUT, E.; SHOEMARK, K. D.; CELIK, V.; MORETON, M. K.; SESSIONS, B. R.; HOLBROOK, J. J.; BRADY, L. R. Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1051–1055, 2004.

DRUILHE, P.; MORENO, A.; BLANC, C.; BRASSEUR, P. H.; JACQUIER, P. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, p. 233–241, 2001.

DRUILHE, P.; BRASSEUR, P.; BLANC, C.; Makler, M. Improved Assessment of *Plasmodium vivax* Response to Antimalarial Drugs by a Colorimetric Double-

Site *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2112–2116, 2007.

FADUL, S. D. **Avaliação do nível de concordância do teste imunocromatográfico OPTIMAL-IT e a Gota Espessa no diagnóstico da malária no município de Mazagão – AP, Brasil.** Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Pará. Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, 2007.

FARID, Z.; KILPATRICK, M. E.; CHIODINI, P. L. Parasites diseases of the liver. **Diseases of the Liver**, p.1338-1355, 1993.

GARBA, H. I.; UBOM, A. G. Total serum lactate dehydrogenase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria infection. **Singapore Medicine Journal**, v. 46, n. 11, p. 632-634, 2005.

GILLES, H. M. The malaria parasite. **Essential Malariology**, p. 12-34, 1993.
GONÇALES, N. S. L.; GONÇALES JR, F. L. Diagnóstico laboratorial. in: II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia da Hepatite C, p. 25-27, 2004.

GOTIJO, C. M. F.; FALCÃO, A. R.; FALCÃO, A. L.; COELHO, M. V. The development of species of *Leishmania* Ross, 1903 in *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 90, n. 3, p. 367-373, 1995.

GRETCH, D.R. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, p. 43S-47S, 1997.

HARLOW, E.; LANE, D. Antibodies: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, p. 726, 1988.

HEXAGON MALARIA COMBI D. **Human do Brasil, 2008.**

HOLANDA, R. J. Produção de anticorpos policlonais a partir de um fragmento recombinante da Lactato Desidrogenase de *Plasmodium vivax* expresso em vetor procarionte pGEX-3X. **Universidade Federal de Rondônia**, 2008.

HUMAR, A.; HARRINGTON, M. A.; PILLAI, D.; KAIN, C. K. ParaSight-F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 56, p. 44–48, 1997.

HVIID, L. Clinical disease immunity and protection against *Plasmodium falciparum* malaria in population living in endemics areas. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, p. 1-10, 1998.

IDRO, R; MARSH, K.; JOHN, C. C.; NEWTON, C. R. J. Cerebral malaria mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive

outcome. **UKPMC Funders Group Author Manuscript *Pediatr. Res.***, v. 68, n. 4, p. 267-274, 2010.

ILSE, C. E.; HENDRIKSEN, E. C. I.; MTOVE, G.; PEDRO, J. A.; GOMES, E.; SILAMUT, K.; LEE, J. S.; MWAMBULI, A.; GESASE, S.; REYBURN, H.; DAY, J. P. N.; WHITE, J. N.; SEIDLEIN, L.; DONDORP, M. A. Evaluation of a PfHRP2 and a pLDH-based Rapid Diagnostic Test for the Diagnosis of Severe Malaria in 2 Populations of African Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1100-1107, 2011.

INVITROGEN. pRSET A, B, and C for high-level expression of recombinant proteins in *E. coli*. v. D 351-20. IQBAL, J; SIDDIQUE, A.; JAMEEL, M.; HIRA, P. R. Persistent Histidine-Rich Protein 2, Parasite Lactate Dehydrogenase and Panmalarial Antigen Reactivity after Clearance of *Plasmodium falciparum* Monoinfection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4237-4241, 2004.

KRETTLI, A. U. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: A retrospective overview and present goals. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.46, p. 446-454, 1994.

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

LANDIS, J.R; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LEDERBERG, E. M.; S. N. COHEN. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. **J. Bacteriol.** v. 119, p. 1072-1074, 1974.

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clin Chem.**, v 12, p. 2415-8, 2005.

LOZOVEI, A. L. Culicídeos Mosquitos. **Entomologia Médica e Veterinária**, p. 59-113, 2001.

MACHADO, R. L. D.; D' ALMEIDA COUTO, A. A. R.; CAVA INI, C. E.; CALVO A, V. S. P. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 581-586, 2003.

MAKLER, M. T.; GIBNINS, B. Laboratory diagnosis of malaria. **Clin Lab Med**, v. 11, n. 4, p. 941-56, 1992.

MILLER, L. H; BARUCH, D. I.; MARSH, K.; DOUBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**, 1ª Ed, 2010.

MOORE, S. A.; SURGEY, E. G. E.; CARDWGAN, A. M. Malaria Vaccines: where are we and where are we going?. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 737-743, 2002.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1123-1128, 2001.

MOODY. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p. 66. 2002.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. **Methods in Enzymology**, vol. 155, p. 335-50, 1987.

OLIVEIRA, M. R. F.; GOMES, A. C.; TOSCANO, C. M. Cost effectiveness of OptiMal® rapid diagnostic test for malaria in remote areas of the Amazon Region, Brazil. **Malaria Journal**, v.9, p. 277, 2010.

PALMER, C.J.; LINDO, J.F.; KLOSKALA, W.I.; QUESADA, J.A .; KAMINSKY, R.; BAUM, M.K.; AGER, A.L. Evaluation of the Optimal Teste for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.1, p.203-206, 1998.

PALMER, C. J.; BONILLA, J. A.; BRUCKNER, D. A.; BARNETT, E. D.; MILLER, N. S.; HASEEB, M. A.; MASCI, J. R.; STAUFFER, W. M. Multicenter study to evaluate the OptiMal test for rapid diagnosis of malaria in u.s. hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5178–5182, 2003.

PENHALBEL, R. S. R.; FUGIKAHA, E.; LORENZETTI A.; ALVES, R. T.; CAVASINI, C. E.; ROSSIT, A. R. B.; CALVOSA, V. S. P.; COUTO, A. A. D.; MACHADO, R. L. D. Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38. n. 2, p. 194-195, 2005.

PIPER, R.; LEBRAS, J.; WENTWORTH, L.; COOKE, H. A.; HOUZE, S.; CHIODINI, P.; MAKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 1, p. 109-118, 1999.

PIPER, R. C.; BUCHANAN, I.; CHOI, Y. H.; MAKLER, M. T. Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. **Malaria Journal**, v. 10, p. 213, 2011.

PLAYFORD, E. G.; WALKER, J. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travelers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4166-4171, 2002.

PODLASEK, S. J.; MCPHERSON, R. A. Streptokinase binds lactate dehydrogenase subunit-M, which shares an epitope with plasminogen. **Clin Chem**, v. 35, p. 69-73, 1989.

PROMEGA. Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, 2010.

SAIKI. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, vol. 239, p. 487-91, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, EF; MANIATIS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Ed. 2, v. 1, 2 e 3, 1989.

SIEGEL, S.; CASTELLAN, N.J. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. **New York, NY: McGraw-Hill**, 1988.

SILVA-VASCONCELOS, A.; KATO, M.Y.N.; MOURÃO, E.M.; SOUZA, R.T.L.; LACERDA, R.N.L.; SIBAJEV, A.; TSOURIS, P.; PÓVOA, M.M.; MOMEN, H.; ROSA-FREITAS, M.G. Biting índices, host-seeking activity and natural infection rates of Anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil, from 1996 to 1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 151-61, 2002.

SILVEIRA, C H; PIRES D.E.V; MINARDI R. C.; RIBEIRO, C.; VELOSO, C. J. M.; LOPES, J. C. D; MEIRA JR, W. M; NESHICH, G.; RAMOS, C. H. I.; HABESCH, R.; SANTORO, M. M. Protein cutoff scanning: A comparative analysis of cutoff dependent and cutoff free methods for prospecting contacts in proteins. **Proteins**, v. 74, p. 727–743, 2009.

SINGH, N.; VALECHA, N. A. C.; NAGPAL, S.; MISHRA, H. S.; SUBBARAO, S. K. The hospital- and field-based performance of the OptiMAL test, for malaria diagnosis and treatment monitoring in central India. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, v. 97, p. 5–13, 2003.

SIVEP. Dados epidemiológicos de malária por estado: Amazônia Legal. **Sistema de Informação de Vigilância epidemiológica – Notificação de casos**, 2010.

SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral Malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 291-300, 2002.

VANDER, J. D .L.; HUNSAKER, L. A.; HEIDRICH, J. E. Partial purification of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol**. v. 4, n 5, p. 225-64, 1981.

VENTURA, S. R. M. A. **Anemia da Malária por *Plasmodium vivax* : Estudo clínico e laboratorial em crianças e adolescentes**. Intituto Oswald Cruz: FIOCRUZ. Doutorado em Medicina Tropical, 2010.

WALLIKER, D. Genetic variation in malaria parasites. **British Medical Bulletin**, v.38, n. 2, p. 123-128, 1982.

WELLEMS, T. E.; MILLER, L. H. Two worlds of malaria. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 16, p. 1496–1498, 2003.

WIWANITKIT, V. Plasmodium and Host Lactate Dehydrogenase Molecular Function and Biological Pathways: Implication for Antimalarial Drug Discovery. **Chem. Biol. Drug. Des.**, v. 69, n. 4, p. 280, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of rapid diagnostic test: malaria. **Nature Publishing Group**, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Information note on recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests (RDTs)**, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report, 2011**.

Apêndice 1

1.21 Equipe Científica

Nome	Formação	Título	Órgão	Atividade
Luciana P. de Sousa	Bióloga		UFAM	Bio.Mol./Imunol.
Luís A. Mariuba	Biólogo	Doutor	FIOCRUZ	Pesq: Biol. Mol.
Paulo A. Nogueira	Biólogo	Doutor	FIOCRUZ	Pesq: Imunol.
Davi B. da Silva	Aluno/Patologia Clínica		CEL	Técnico: Biotério

Bio. Mol. – Biologia Molecular

Imunol. – Imunologia

Pesq – Pesquisador

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

CEL – Centro de Ensino Literatus

1.22 Resultados não incluídos no artigo

A novel polyclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of *Plasmodium vivax* developed from two lactate dehydrogenase protein segments

1. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO *p*vLDH1-43aa

Com o objetivo de amplificar o fragmento *p*vLD, pela Reação da Cadeia Polimerase (PCR), utilizou-se DNA genômico extraído de uma amostra de sangue periférico de um paciente infectado com *Plasmodium vivax*, contaminado em uma região periurbana da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, cuja parasitemia atingiu duas “cruzes”, segundo o método da gota espessa. Escolheu-se a condição B (melhor condição de amplificação do fragmento) para o prosseguimento dos experimentos (Figura 15 - 1).

2. CLONAGEM E SUBCLONAGEM DO FRAGMENTO *p*vLDH1-43aa

Após purificação do fragmento amplificado para a ligação em vetor de clonagem pGEM e transformação em célula hospedeira *E. coli* TOP10, realizou-se um PCR visando verificar as colônias transformantes. Posteriormente, realizou-se extração plasmidial de colônias transformantes e, em seguida, realizou-se digestão do vetor de clonagem com enzima de restrição Eco RI, visando verificar a presença do fragmento *p*vLDH em Plasmídeo de Clonagem pGEM (Figura 15 - 2) para posterior purificação e inserção em vetor de expressão.

Após purificação do fragmento LDH, devidamente digerido do vetor de clonagem, realizou-se a ligação do fragmento em vetor de expressão pRSET-A para a transformação em célula hospedeira *E. coli* BL-21. Posteriormente,

realizou-se um PCR visando verificar as colônias transformantes. Em seguida, realizou-se extração plasmidial das colônias transformantes e digestão do vetor de expressão visando verificar a presença do fragmento *p*LDH (Figura 15 - 3).

Tendo em vista que o plasmídeo de expressão utilizado nos experimentos possuem sítios de restrição para as enzimas *Eco*RI e *Bam*HI, verificou-se um resultado positivo para a correta fase de leitura do fragmento, em virtude da existência do fragmento *p*LDH somente quando utilizou-se ambas as enzimas, *Eco*RI e *Bam*HI (poço de número 4), para a digestão do plasmídeo de expressão PRSET-A (Figura 15 - 3).

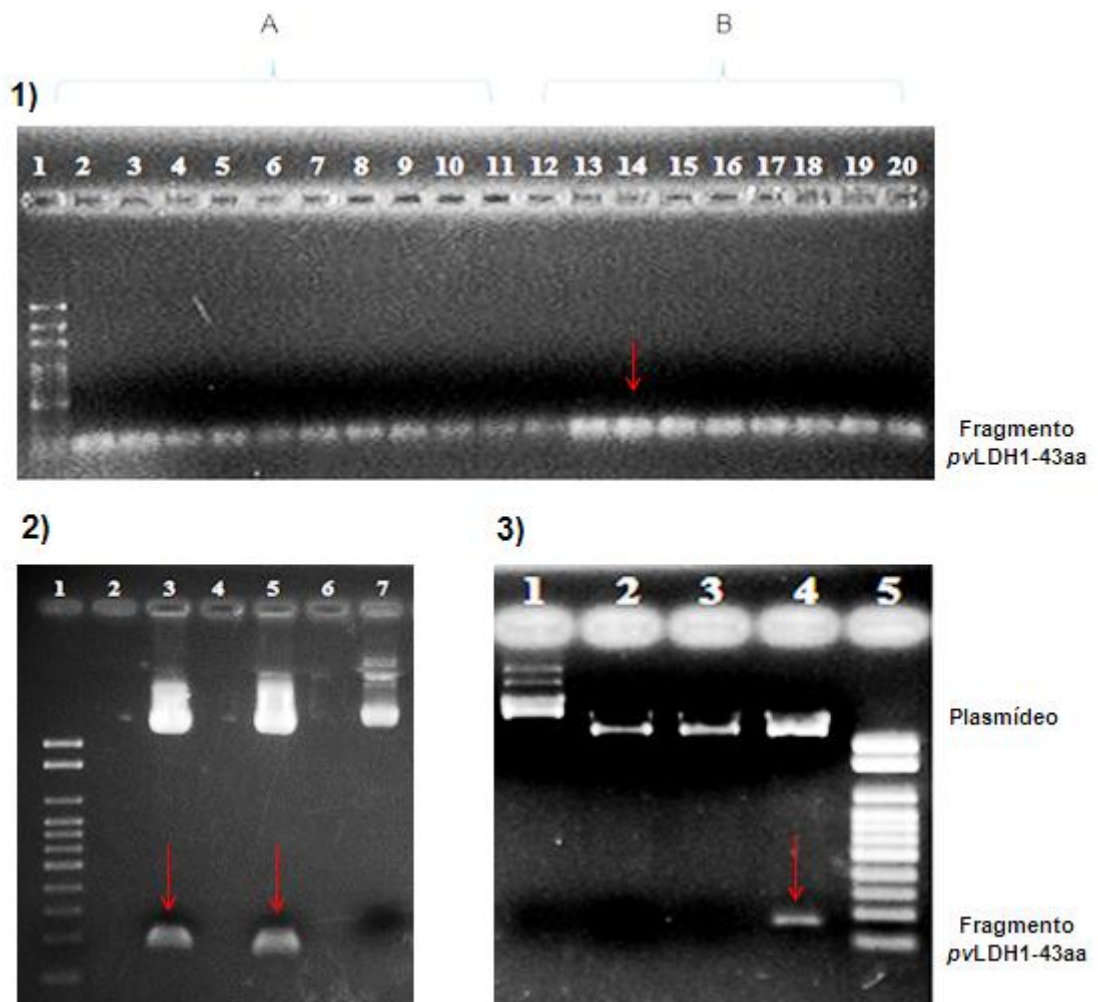


Figura 1. Amplificação, clonagem e subclonagem de *p*LDH1-43aa. 1) Amplificação do fragmento *p*LDH1-43aa de 112 pb através da PCR. O poço de número 1 representa o marcador molecular de 100 pb (ladder). A condição A está representada pelos poços de número 2 a 11 e a condição B pelos poços de número 12 a 20. Escolheu-se a condição B e poço número 14 para dar continuidade aos experimentos. Para a eletroforese, utilizou-se um gel de agarose na concentração de 1,5%. Foi aplicado nos poços todo o volume da PCR, 25 μ l.

2) Digestão do Plasmídeo de Clonagem pGEM. O poço de número 1 representa o marcador molecular de 1 kb (ladder). Os poços de número 3 e 5 representam o plasmídeo com a presença do fragmento *pVLDH* devidamente digerido com enzima de restrição Eco RI e o poço de número 7 representa o controle positivo da reação (utilizando enzima de restrição BamHI). Para a eletroforese, utilizou-se gel de agarose na concentração de 1.5%. Foram aplicados nos poços 3 µl de plasmídeo. 3) Digestão do vetor de expressão pRSET A. O poço de número 1 representa o controle negativo da reação (sem enzima de restrição); o poço de número 2 e 3 representam o controle positivo da reação (com enzima de restrição BamHI e EcoRI, respectivamente); o poço de número 4 representa o Plasmídeo de expressão pRSET A devidamente digerido com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI; e o poço de número 5 representa o marcador molecular de 1kb (Ladder).

3. ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

A análise do sequenciamento, pelas ferramentas da Bioinformática, demonstrou que a LDH recombinante do presente estudo teve 98% de identidade com LDH de *P. vivax* e 80% de identidade com LDH de *P. falciparum*.

4. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Visando a produção de anticorpos anti *pVLDH*, camundongos e coelho foram imunizados com a proteína recombinante *pVLDH* devidamente purificada. Posteriormente, realizou-se ELISAS indiretos com o plasma dos animais em várias diluições (1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 e 1/6400) após a terceira inoculação do antígeno *pVLDH* recombinante, visando a obtenção do título de anticorpos contra a proteína recombinante *pVLDH*. Os animais demonstraram boa resposta de anticorpos após a terceira inoculação de proteína recombinante, sendo a resposta de anticorpos do coelho superior a resposta dos camundongos, com valores de absorbância, na diluição 1/100, de 2.600 e 2.100, respectivamente (Figura 16 A e B).

A variação na massa molecular da proteína recombinante *pVLDH*, devido a inserção da cauda de histidina do vetor de expressão pRSET A, não influenciou na resposta de anticorpos dos camundongos e coelho imunizados, ou seja não houve a produção de anticorpos anti-histidina. Isto foi possível

observar quando os plasmas destes animais foram testados por ELISA indireto em relação à proteína recombinante pVLDH (fragmento de pLDH + vetor de expressão pRSET A) e pRSET A vazio (somente o vetor de expressão pRSET A purificado) (Figuras 17 A e B).

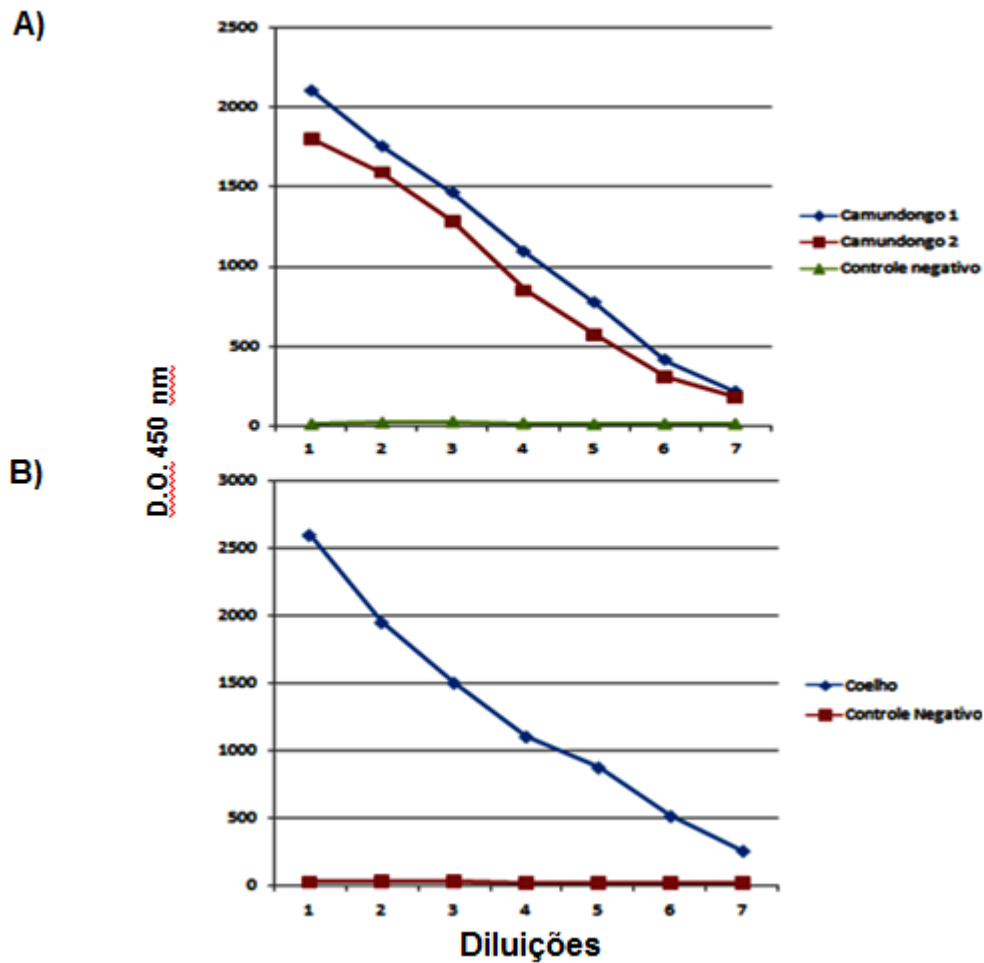


Figura 2. ELISA indireto dos camundongos (A) e coelho (B) para verificar o título de anticorpos gerados pelas inoculações de proteína recombinante pVLDH. Os valores de absorbância estão representados no eixo Y e as diluições dos anticorpos anti-pLDH dos animais estão representadas no eixo X, onde 1: 1/100, 2: 1/200, 3: 1/400, 4: 1/800, 5: 1/1600, 6: 1/3200 e 7: 1/6400.

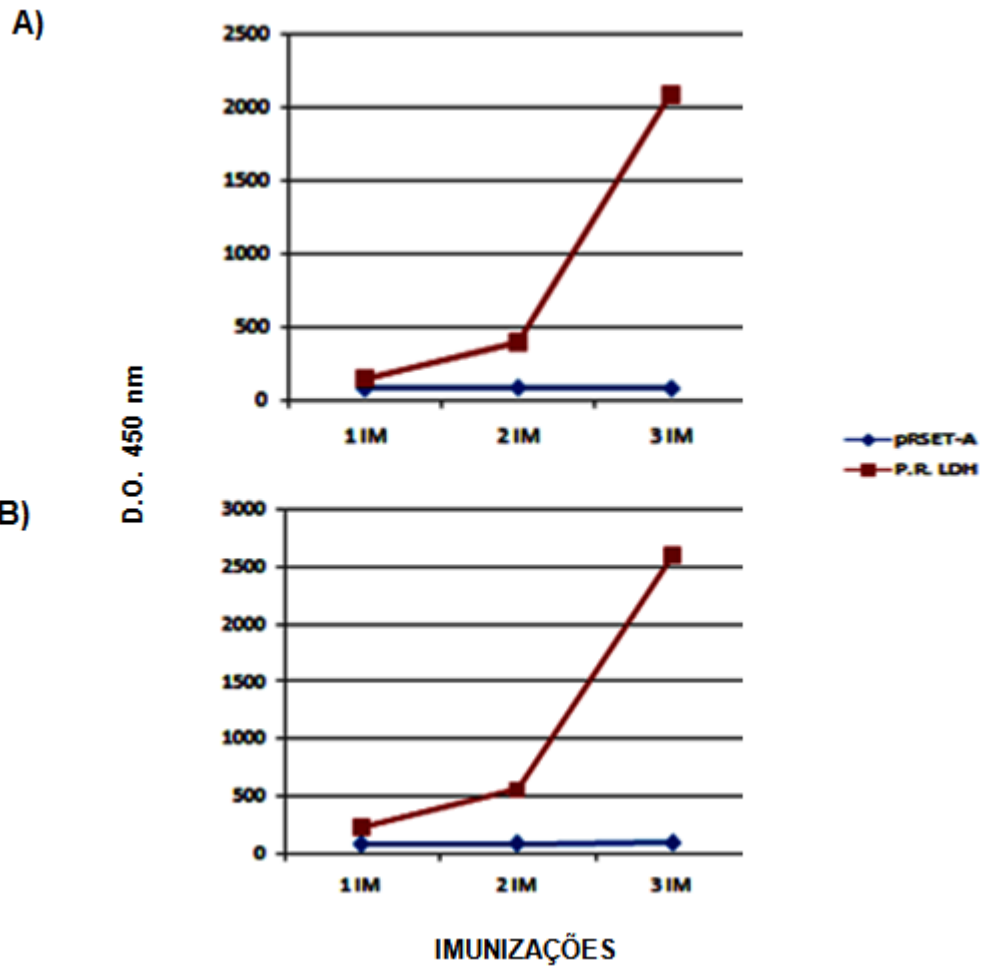


Figura 3. Resposta de anticorpos de camundongos (A) e coelho (B) em relação à proteína recombinante ρ LDH1-43aa (em vermelho) e pRSET A vazio (em azul). 1 IM, 2 IM e 3IM correspondem a primeira, segunda e terceira inoculação de proteína recombinante ρ LDH nos animais.

1.23 Parecer do comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 005/2010-CEEA, sobre “Utilização de camundongos e coelhos visando o desenvolvimento de insumos reagentes para diagnóstico rápido de malária” sob responsabilidade de **PAULO AFONSO NOGUEIRA**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de **07/05/2010**.

Manaus, 12 de maio de 2010


Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni
Presidente do CEEA-UFAM

Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Coroado – Campus Universitário, Setor S4, Bloco A - CEP 69077-000, Manaus - AM
Tel: (91) 3305-4038- e-mail: ceeafam@ufam.edu.br

1.24 Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº. 3640.0.000.115-07, intitulado: **“Dinâmica das infecções maláricas em comunidades do Amazonas sob aspecto de marcadores moleculares de parasitas e do polimorfismo de proteínas candidatas a vacinas”**, tendo como Pesquisador Responsável Paulo Afonso Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 22 de novembro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Cep. 69.057-070 – Manaus/AM – Fone: (92) 622-2724 r. 32
E-mail: cep@ufam.edu.br

1.25 Artigo de revisão



Scientia Amazonia, v. 2, n.2, 29-41,

2013 Revista on-line <http://www.scientia.ufam.edu.br>

OPTIMAL-IT®: Uma revisão de seu desempenho no diagnóstico de malária¹

Luciana Pereira de Sousa², Luis André Mariuba³ e Paulo Afonso Nogueira³

Resumo

O presente trabalho relata o desempenho de um dos testes de diagnóstico rápido mais recomendados para a detecção de parasitas do gênero *Plasmodium*, o OptiMAL-IT®, em vários contextos epidemiológicos globais. O teste é baseado em anticorpos monoclonais detectores de Lactato Desidrogenase (LDH) de *Plasmodium falciparum* e LDH pan-específico para a detecção das demais espécies de *Plasmodium* que infectam os seres humanos. Embora a maioria dos estudos citados neste trabalho tenha exibido sensibilidade do teste rápido OptiMAL-IT® abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), este parece constituir uma excelente ferramenta de diagnóstico de malária em áreas remotas, além de oferecer informações adicionais importantes a microscopia na detecção precisa e eficaz de infecções maláricas para o tratamento correto e oportuno da doença.

Palavras-Chave: Diagnóstico, Lactato Desidrogenase, Malária.

Abstract

This paper reports the performance of a rapid diagnostic tests more recommended for detection of parasites of the genus *Plasmodium*, the OptiMAL-IT® in various epidemiological context globally. This test is based on monoclonal antibodies detectors of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase (LDH) and LDH pan specific for the detection of other species of *Plasmodium* that infect humans. Although most of the studies cited in this paper has shown sensitivity of the rapid test OptiMAL-IT® below the level recommended by the World Health Organization, this seems to be an excellent diagnostic tool for malaria in remote areas and provide important additional information on microscopy effective and accurate detection of malarial infections for the correct and timely treatment of the disease.

Keywords: Diagnostic, Lactate Dehydrogenase, Malaria.

¹ Parte da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

² Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

³ Pesquisador do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, Brasil.

1. Introdução

A Malária continua a ter um enorme impacto na saúde global e o diagnóstico ainda é um desafio para a maioria dos países, onde há incidência desta parasitose. Os elementos principais na estratégia global para uma gestão eficaz de controle da Malária são o diagnóstico rápido, preciso e tratamento efetivo, estes, porém, possuem acesso limitado em áreas onde a Malária é endêmica.

Investimentos buscando uma mudança neste quadro vêm sendo arcados em diversos países tanto para a distribuição dos medicamentos utilizados para o tratamento desta doença como para o desenvolvimento de novas drogas e de vacinas. É imperativo, contudo, que este processo seja acompanhado por um compromisso paralelo buscando uma melhora das

ferramentas de diagnóstico e sua disponibilidade pela população residente de áreas malarígenas (WONGSRICHANALAI et. al., 2001). Logo, uma reflexão sobre as técnicas utilizadas para a detecção dos patógenos causadores da malária é de grande importância para a execução de políticas públicas visando o controle da doença.

Atualmente, o diagnóstico confirmatório de infecções por plasmódios pode ser realizado por diferentes técnicas que englobam aspectos microscópicos, moleculares e imunológicos. Dentre este último, a detecção utilizando anticorpos em um sistema de fitas imunocromatográfica tem sido debatida pelos resultados divergentes entre diferentes grupos, variantes ambientais, genética e carga parasitária. Este texto fará uma abordagem sobre os temas

relacionados ao único teste rápido do gênero validado nacionalmente, o do OptiMAL-IT®.

2. Metodologia

A revisão da literatura sobre a sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico rápido OptiMAL-IT® foi realizado pela busca de publicações de pesquisas na linha de testes diagnósticos para a Malária disponíveis em banco de dados eletrônicos. O período destas publicações foi de 1959 a 2012, cujas palavras-chave foram: *rapid diagnostic test for malaria, malaria diagnostic, performance of OptiMAL-IT®*.

3. Revisão de literatura

Tradicionalmente, o diagnóstico de malária ocorre pelo exame microscópico do sangue, o qual é realizado, a partir da técnica desenvolvida por Gustav Giemsa, em 1904. O exame denominado gota espessa é o diagnóstico microscópico considerado padrão ouro por apresentar custo operacional relativamente baixo, especificidade e sensibilidade alta (dependendo da experiência do microscopista), permitindo a identificação quantitativa e qualitativa de parasitas, sendo o exame mais utilizado mesmo diante aos avanços de técnicas para o diagnóstico de Malária nas últimas décadas. A técnica consiste na coleta de sangue periférico de pacientes com manifestações clínicas de malária para a preparação de lâminas coradas com o tampão de Giemsa para a visualização em campo microscópico, com óleo de imersão, visando à identificação das espécies e contagem do número de

parasitas por campo para a obtenção da parasitemia.

O exame da gota espessa permite a detecção de densidade mínima de parasita, cerca de 5-10 parasitas por microlitro (μL) de sangue, desde que o examinador seja bastante experiente. Todavia, em condições de campo, normalmente, a capacidade de detecção salta para 100 parasitos por μL de sangue. A técnica permite o diagnóstico em cerca de 60 minutos entre a coleta de sangue, análise microscópica para a identificação de espécies, mensuração da parasitemia e entrega de resultado. Esta, porém, possui exigência de uma infraestrutura adequada para a realização dos exames e algumas limitações na preparação de lâminas (WHO, 2006; WHO, 2010). Dentre elas, há aspectos caracterizados como difíceis de serem solucionados, como a morfologia dos parasitas não preservada ou modificada, manuseio e coleta de amostras sanguíneas infectadas (material biológico mal fixado, possível lise de hemácias) e o fato da preparação e leitura de lâminas poder variar entre os microscopistas, tornando o diagnóstico, muitas vezes, inviável em áreas de difícil acesso. Estas entre outras variáveis podem acarretar em erros de diagnóstico e, conseqüentemente, erro na administração de antimaláricos favorecendo, assim, a disseminação de *Plasmodium* sp. e manutenção da doença (WHO, 2011).

O diagnóstico molecular, o qual detecta ácido nucléico do parasita, pela tecnologia de amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é extremamente eficiente, porém menos utilizado, pois é restrito a grandes laboratórios em virtude do custo elevado de reagentes

necessários para a reação e alta complexidade da técnica, além de ser inviável em campo. Os testes para diagnósticos imunológicos, tais como ELISA e Imunofluorescência, também são pouco utilizados para diagnóstico de Malária não só em decorrência do elevado custo, mas também em virtude de incertezas ao diagnóstico, pois a presença de anticorpos no soro de pacientes não significa necessariamente infecção ativa, tendo em vista que anticorpos podem permanecer algum tempo no organismo após a cura da doença.

3.1. Aspectos gerais sobre imunocromatográficos para Malária testes para

Nos últimas décadas, tem-se desenvolvido testes para o diagnóstico rápido (TDR) e preciso de malária que utilizam os princípios da imunocromatografia, os quais se baseiam na captura de derivados proteicos maláricos (antígenos alvos) por anticorpos monoclonais reativos a tais antígenos encontrados no sangue periférico infectado por protozoários do gênero *Plasmodium* sp. (MOODY, 2002).

Basicamente, a imunocromatografia pela migração da fase líquida de sangue periférico infectado, sob anticorpos monoclonais (contra determinados antígenos) sensibilizados em uma membrana de nitrocelulose e acoplados a partículas de ouro em fase móvel (MOODY, 2002). A fase fixa é determinada por um anticorpo de captura aplicado a fita de nitrocelulose. Assim, a migração do complexo antígeno-anticorpo da fase móvel ao longo da fita possibilita a identificação do antígeno capturado pelo anticorpo da fase fixa, produzindo uma linha colorida visível (MOODY, 2002). Para assegurar o correto processo

de migração em torno da membrana de nitrocelulose, é necessária a adição de um anticorpo anticamundongo como controle positivo do sistema (PIPPER et. al., 1999). A técnica permite o diagnóstico preciso entre 10 a 20 minutos (WONGSRICHANALAI, 2001).

Os antígenos mais utilizados como alvos são: HRP-2 (“Proteína 2” Rica em Histidina), LDH (Lactato Desidrogenase) e Aldolases. A HRP-2 é utilizada para a detecção exclusiva de *Plasmodium falciparum* (pfHRP-2). Esta proteína é solúvel e somente expressa por esta espécie de parasita durante o estágio sanguíneo assexuado e estágio de gametócitos jovens (PARRA et. al., 1991; ÁVILA & FERREIRA, 2000). Este foi o primeiro antígeno a ser utilizado em teste de diagnóstico rápido (SHIFF et. al., 1993), podendo ser detectada inclusive na saliva de pacientes (WILSON, 2008) e embora apresente um bom desempenho quando comparado com os outros marcadores de infecção malárica (HENDRIKSEN, 2011), vale ressaltar que a HRP-2 possui algumas limitações, como sua persistência no organismo, por alguns dias após a cura da doença podendo acarretar resultados falsos positivos e, conseqüentemente, a administração desnecessária de antimaláricos (IQBAL et. al., 2004, FOGG et. al., 2008). Além disso, estudos mostrando a existências de isolados apresentando uma variação ou deleção gênica da HRP-2 (MALTHA et. al., 2011; LEE et. al., 2006; BAKER, 2005) e a ocorrência do fenômeno de pró-zona (ocorrência de um equilíbrio entre antígeno e anticorpo) em testes rápidos que detectam este antígeno (GILLET et. al., 2009) demonstram a necessidade de uma grande avaliação do uso deste

antígeno como marcador de infecção.

Detectada como marcador de malária cerebral (FUHRMANN & PELTZER, 1959) e testada como candidata a vacina nos anos 80, do século XX (CERTA et. al., 1988), a enzima aldolase foi detectada por ELISA em pacientes infectados (SRIVASTAVA, 1989) e tem sido utilizada até hoje como antígeno alvo para o diagnóstico de espécies de *Plasmodium* em testes para diagnóstico rápido. Apesar deste grande potencial da aldolase, um maior número de produtos busca a detecção da enzima LDH (Lactato Desidrogenase), a qual faz parte do metabolismo do parasita, especificamente, encontrada na via glicolítica, principal fonte de ATP para crescimento e desenvolvimento intracelular do parasita (MAKLER & GIBBINS, 1991). Esta vem sendo utilizada como marcadora de infecções maláricas desde a década de 90, do século XX (MAKLER e GIBBINS, 1993), sendo produzida tanto na fase sexuada quanto assexuada do parasita, o que a torna um bom indicador de infecção ativa, pois é produzida somente por parasitas vivos (PALMER et. al., 1998; IQBAL et. al., 2004). Novos estudos mostram que é possível detectar a LDH também em amostras de saliva de pacientes (GBOTOSHO, 2010), por não sofrer com o efeito de pró-zona (GILLET et. al., 2009) e não apresentar um polimorfismo significativo (TALMAN et. al., 2007; MARIETTE et. al., 2008).

Os testes de diagnóstico rápido (TDR) fornecem opções adicionais que podem estabelecer parâmetros para análise e comparação ao método tradicional de diagnóstico da doença. Apesar de se apresentarem como de difícil implantação em muitos países devido ao elevado custo

operacional (PIPPER, 2011), proporcionam simplicidade, rapidez e eficiência ao diagnóstico. Essa técnica é bastante específica, sensível e útil para o diagnóstico em áreas remotas, onde o acesso à microscopia é praticamente impossível.

Em 2011, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu diretrizes ao diagnóstico rápido de malária, visando eficácia e precisão para um tratamento correto e oportuno, pois estes são apontados como os meios mais adequados para reduzir a disseminação, a gravidade e a letalidade da Malária. A OMS recomenda que a sensibilidade dos testes imunocromatográficos deve ser superior a 95% quando comparada com a microscopia, sendo que a parasitemia, em níveis de 100 parasitos/ μ L (0,002% parasitemia) deve ser detectada, confiantemente, com uma sensibilidade de 100%; disponibilizar as informações quantitativas ou semiquantitativas sobre as densidades parasitárias circulantes no sangue; seja hábil para distinguir parasitos viáveis de não viáveis, e de antígenos ou ácidos nucléicos associados a outras infecções; e, por fim, que indique o prognóstico de tratamento ou resistência às drogas antimaláricas comuns.

Diante disso, uma análise comparativa da sensibilidade e especificidade da microscopia em relação a um dos testes rápidos mais utilizados para o diagnóstico de malária, o OptiMAL-IT®, é de grande relevância, principalmente, para projetos futuros que visam o uso desta ferramenta.

3.2. OptiMAL-IT®: princípios

O OptiMAL-IT®, produzido por Dia-Med AG (Morat, Suíça), sob licença da Flow Inc. (Portland, OR) (COLEMAN, 2002) discrimina infecções causadas por *Plasmodium falciparum* e não *falciparum*, esta última, na maioria das vezes, diagnosticadas como *P. vivax* (PIPPER et al., 1999). Esta capacidade de detecção é particularmente importante em países onde estas espécies de *Plasmodium* coexistem (FERRO, 2002). O teste foi produzido a partir de um painel de anticorpos monoclonais capazes de se ligar a pLDH, os quais foram desenvolvidos a partir de eritrócitos infectados por *P. falciparum*. Três anticorpos monoclonais são utilizados no teste imunocromatográfico OptiMAL-IT® (Figura 1). Dois dos anticorpos monoclonais são pan-específicos, reconhecendo quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (*P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. falciparum*), sendo um deles imobilizado na membrana imunocromatográfica do sistema em fluxo lateral e outro ligado ao ouro coloidal. O terceiro anticorpo monoclonal é específico para LDH de *P. falciparum* e fica ligado à fita imunocromatográfica. Os anticorpos monoclonais utilizados no ensaio OptiMAL-IT® foram exaustivamente testados para reatividade cruzada com a LDH humana no sangue, assim como para a detecção de micro-organismos causadores de outras doenças infecciosas como *Leishmania*, bactérias e fungos patogênicos, porém nenhuma evidência de tal reatividade cruzada foi encontrada, sugerindo, ser uma excelente ferramenta ao diagnóstico de malária (MOODY, 2002).

Há vários estudos sobre a utilização dos TDR publicados na literatura, sendo que muitos avaliaram a sensibilidade e ou

especificidade do OptiMAL-IT® comparado a microscopia. O texto que segue abordará este tema com diferentes populações do mundo, residentes de áreas endêmicas e indenes, sintomáticos, assintomáticos e coinfectados, além das condições ambientais de armazenamento e custo benefício do OptiMAL-IT®.

3.3. OptiMAL-IT®: desempenho na região Amazônica

A partir dos relatos encontrados na literatura, pode-se observar que os valores de sensibilidade e especificidade do OptiMAL-IT® no Brasil variam entre os estudos, apresentam-se aquém do estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. O OptiMAL-IT® foi validado nacionalmente, em 2002, por análises realizadas na “Rede Amazônica de Vigilância da Resistência as Drogas Antimaláricas no Brasil” (RAVREDA), apresentando sensibilidade e especificidade global igual a 93,6 e 99,4% (OLIVEIRA, 2010). Arcanjo e colaboradores (2007), entretanto, observaram uma concordância entre a gota espessa e este teste rápido igual a 72,1 % e 92,9%, quanto à copositividade e conegatividade, respectivamente. Neste estudo, as análises de parasitemia variaram de 100 a 46.500 parasitas por mm³ de sangue. Segundo estes autores, a gota espessa possui melhor positividade para o diagnóstico da malária em área endêmica, porém, acrescenta que são necessários outros estudos semelhantes em localidades com diferentes perfis epidemiológicos. Algumas hipóteses explicativas sugeridas para o baixo desempenho do teste rápido foram ligação inespecífica do anticorpo monoclonal ao substrato, baixa densidade parasitária de indivíduos

assintomáticos e a temperatura de armazenamento do “kit” para uso

em campo.

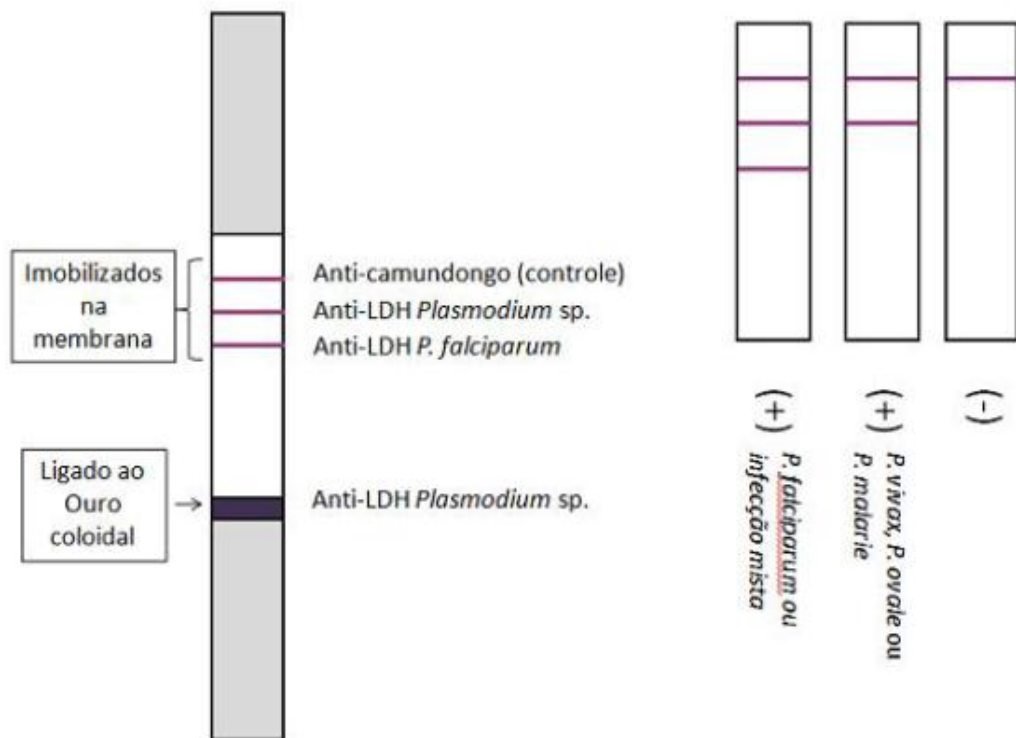


Figura 1. Princípios do teste diagnóstico rápido OptiMAL-IT® para a detecção de LDH de *Plasmodium falciparum* e LDH pan específico para a detecção das demais espécies de *Plasmodium* que infectam os seres humanos.

Segundo a OMS (2006) o desempenho de TDR para malária é seriamente afetado em ambiente de alta temperatura, tal como é prevalente em zonas tropicais. A influência do ambiente de estocagem do teste é uma variante que talvez possa ser considerada decisiva para sua utilização em áreas remotas, onde a falta de refrigeração é um fator aguardado. Contudo, este fator não apresentou influência no desempenho do teste na Amazônia Brasileira, como mostrado por Penhalbel e colaboradores (2005). Neste foi avaliado seu desempenho sob diferentes condições de

armazenamento: 25°C, 30°C e 39°C por 24, 48 e 72 horas antes do uso. O teste imunocromatográfico detectou todas as amostras positivas corretamente, com exceção das duas amostras de *P. malariae*, provavelmente devido à baixa parasitemia (<100 parasitos por microlitro). Os resultados mostram um excelente desempenho do teste OptiMAL-IT® sob as diferentes condições avaliadas, porém mais pesquisas com diversas condições ambientais, como a umidade, um maior tempo de exposição as diferentes temperaturas são importantes para determinar a aplicabilidade do teste

em áreas endêmica e não endêmicas da Amazônia Brasileira.

A densidade parasitaria é relatada como importante limitador de desempenho do teste. Em estudos realizados na Colômbia, Ferro e colaboradores (2002) observaram resultados falso-negativos com OptiMAL-IT® em parasitemias de 80 e 480 parasitas/ml. De forma semelhante, Mendoza e colaboradores (2007) encontraram uma diminuição da sensibilidade na detecção de *P. falciparum* para 60% em concentrações inferiores a 200 parasitas e para 50 % na detecção de *P. vivax* em amostras com 300 a 2500 parasitas. Metzger e colaboradores (2011) também relataram perda de precisão do teste em baixos níveis de parasitemia, assim como Tarazona et. al. (2004), em níveis parasitários menores que 1000 parasitas por microlitro. Uma análise do desempenho do OptiMAL-IT® abaixo do recomendado pela OMS (2011) também foi relatada em um estudo realizado por Cerón et. al. (2005) no México, cuja sensibilidade e especificidade foram de 93,3% e 99,5%,

Neste contexto, fica perceptível que a utilização do OptiMAL-IT® na Amazônia deve ser analisada com cautela, visto que aparentemente para a obtenção de um bom desempenho são necessárias condições específicas. Logo, uma discussão cuidadosamente deve ser realizada sobre a introdução de TDR como método efetivo de diagnóstico de malária, não só nesta região, mas em outras áreas endêmicas. Porém, um ponto determinante para a difusão e uso estratégico desta metodologia nestes países é o que concerne ao custo vendido aos governos por cada teste. Tarazona et. al. (2004), em um estudo

realizado no Peru, destacou este fator como uma grande desvantagem para a implantação desta técnica em países em desenvolvimento. Oliveira et. al. (2010), em um estudo detalhado sobre custo-efetividade do teste para o diagnóstico de malária em áreas remotas da Amazônia brasileira, coletou dados em 12 municípios do estado do Pará. Os custos foram expressos em dólar por casos devidamente diagnosticados, em 2006 (EUA \$ 1,00 = R\$ 2,17). A análise de sensibilidade foi realizada considerando a microscopia como modelo padrão de diagnóstico da doença. Como resultado foi observado que considerando 33.491 procedimentos de diagnóstico para Malária realizada, em 2006, o custo total da microscopia foi de \$ 227,315.53 dólares, e para o OptiMAL-IT® foi de \$ 172,082.09 dólares. O custo por caso diagnosticado adequadamente foi de 5,14 dólares usando OptiMAL-IT® e 6,79 utilizando a microscopia. A microscopia e o OptiMAL-IT® diagnosticaram adequadamente 32.989 e 32.888 casos, respectivamente. Nesse contexto, comparando a microscopia, o teste rápido só foi ineficaz para diagnosticar três casos em cada 1.000 pacientes febril, mostrando ter alta sensibilidade e especificidade neste contexto epidemiológico. Sendo assim, a microscopia possui maior custo-efetividade que o teste rápido nessas áreas remotas da Amazônia, porém a decisão sobre uso de testes de diagnóstico rápido de malária nestas áreas depende da precisão da microscopia atual em campo.

3.4. Desempenho do OptiMAL-IT® em diferentes regiões do mundo

Uma análise do desempenho do teste relatada em estudos realizados em diversas regiões geográficas demonstra que, assim como observado nos estudos realizados na Amazônia, há uma grande discrepância entre os resultados encontrados, cuja maioria destes enquadra o OptiMAL-IT® como inadequado se as especificações da OMS forem seguidas (Tabela 1).

Na grande maioria dos estudos revisados (QUATTARA et. al., 2011; VALÉA et. al., 2009; QUINTANA et. al., 1998; CHAYANI et. al., 2004; MASON et. al., 2002; IQBAL et. al., 2000) foram colocados em discussão questões sobre a não uniformidade dos dados encontrados em relação aos seguintes pontos: baixa parasitemia, reatividade cruzada com outras infecções e com fatores da Artrite Reumatoide, custo por teste, resistência térmica e erros no manuseio pelo usuário, apesar da semelhança entre as análises realizadas por gota espessa e os resultados obtidos pelo OptiMAL-IT®.

Com exceção de alguns estudos na Indonésia, Tailândia e Mianmar (Fryauff et. al., 2000; Pattanasin et. al., 2003; Ashley et. al., (2009), tais relatos mostram como ainda é contraditória e de difícil definição uma forma de utilização segura deste teste rápido como diagnóstico definitivo para malária. Um exemplo disto está em Madagascar, onde o governo decidiu implementar os testes rápidos para permitir um diagnóstico onde microscopia convencional não é possível, podendo ser um coadjuvante útil para a avaliação clínica do paciente e para a microscopia (RATSIMBASOA et. al.,

2007). Contrariamente, um estudo posterior neste país (RAKOTONIRINA et. al., 2008) revelou que o teste rápido em questão quando comparado com a PCR e microscopia, mostrou sensibilidade e especificidade inferiores, deixando de detectar 19 amostras positivas quando comparado com a PCR e 15 amostras positivas quando comparado com a microscopia. Segundo o autor, isso se deve, provavelmente, a baixas densidades parasitárias e ou a influência de altas temperaturas prevalentes em áreas onde a malária ocorre.

De maneira geral, há um consenso que em locais onde a microscopia é falha ou de difícil execução (como em áreas remotas ou em países não endêmicos), o OptiMAL-IT® torna-se uma boa alternativa. Palmer e colaboradores (2003) observaram ao realizar um estudo multicêntrico em seis hospitais norte-americanos altos níveis tanto de sensibilidade quanto de especificidade na detecção de *Plasmodium*. Os médicos que faziam parte da equipe do hospital e os diretores de laboratórios informaram, independentemente, que o teste rápido OptiMAL-IT® foi preciso, fácil de usar, e bem aceito pelos trabalhadores do laboratório de diagnóstico. Porém, o bom desempenho observado neste estudo pode estar relacionado com fatores como a pouca experiência dos microscopistas locais na identificação do parasita ou com o nível de parasitemia encontrado nos paciente (dado não relatado no estudo). Na Itália, por exemplo, Ricci e colaboradores (2000) observaram uma boa sensibilidade do teste (96-100%) apenas em níveis de parasitemia entre 0.1% a 20%, com redução (0-44%) em

parasitemias em níveis inferiores a 0.004-0.01%.

A grande redução da sensibilidade em baixas parasitemias, além de levantar dúvidas sobre os resultados negativos, inviabiliza sua utilização no acompanhamento do tratamento do paciente como observado por Craig e colaboradores (2002). Neste estudo, uma análise comparativa do desempenho do OptiMAL-IT® em condições laboratoriais em Durban, África do Sul, foi realizada com amostras de pacientes com infecção ativa e em tratamento. A capacidade global de detecção de *Plasmodium* foi de 91.16% e especificidade de 90%. A sensibilidade do teste começou a diminuir, a partir de < 300 parasitas/ μ L de sangue, tornando-se menos sensível que a microscopia convencional para diagnóstico de malária. O teste começou a apresentar resultados negativos para pacientes após sete dias de tratamento, mas como foi observada a diminuição da sensibilidade do teste conforme a diminuição da parasitemia realizou-se o exame microscópico e PCR destes pacientes e dois terços destes indivíduos mostraram-se positivos. Com isso, os autores concluíram que este teste rápido

não é confiável em níveis baixos de parasitemia e nem para o controle da infecção de pacientes em tratamento.

Resultados falso-positivos foram relatados em alguns estudos como o de Iqbal e colaboradores (2003), no Kuwait. Este demonstrou um pequeno grau de inespecificidade do teste diagnóstico rápido OptiMAL-IT® em uma população negativa para Malária segundo o teste microscópico. Foram avaliados pacientes com Artrite Reumatoide, pacientes com infecções virais e pacientes com infecções parasitárias crônicas. Destes, 75 pacientes apresentaram Artrite Reumatoide, 25 pacientes com hepatite C crônica, 50 pacientes portadores de esquistossomose, 25 pacientes com *Toxoplasma gondii* e 25 pacientes com infecção por *Echinococcus granulosus*. Apenas quatro amostras reagiram positivamente no OptiMAL-IT®, das quais três foram positivas para *P. falciparum* e uma positiva para infecção mista. Três das quatro amostras positivas eram de pacientes com Artrite Reumatoide e a quarta amostra era de um paciente com hepatite C crônica.

Tabela 1. Desempenho do OptiMAL-IT® em vários contextos epidemiológicos.

AUTOR	ANO	LOCALIDADE	N	S G	E G	VPP	VPN
Iqbal	2000	Kuwait	550	97%			
Fryauff	2000	Indonésia	505	92%			
Ricci	2000	Itália	139	83%			
Iqbal	2000	Kuwait	200	96			
Arcanjo	2007	Brasil	217	72%			
Kim	2008	Coréia	182	94%			
Valeá	2009	África	464	98%			
Oliveira	2010	Brasil	33491	90%			
Metzger	2011	Venezuela	550	77%			
Palmer	1998	Honduras	202	91%	100%		
Quintana	1998	Honduras	84	100%	95%		
Mason	2002	Myanmar	229	44%	97%		
Ferro	2002	Colômbia	192	93%	100%		
Craig	2002	África	109	91%	90%		
Coleman	2002	Tailândia	1137	50%	74%		
Ávila	2002	Brasil	65	97%	88,50%		
Pattanasin	2003	Tailândia	271	76%	99%		
Chayani	2004	Índia	232	98%	96,80%		
Penhabel	2005	Brasil	151	98%	99,50%		
Rakotonirina	2008	África	313	85%	97,60%		
Ashley	2009	Ásia	1002	92%	94,70%		
Kim	2011	Coréia	200	94%	100%		
Iqbal	2002	Kuwait	750	83%	99%	94%	99%
Palmer	2003	EUA	216	98%	100%	100%	99%
Tarazona	2004	Peru	72	92%	100%	100%	91,60%
Cerón	2005	México	893	93%	99%	96,50%	98,90%
Ratsimbaoa	2007	África	192	89%	100%	100%	95,30%
Mendoza	2007	Colômbia	214	95%	99,30%	98,40%	98%
Hendriksen	2011	África	1898	88%	88,30%	93,2	80,3
Quattara	2011	África	725	97%	94,40%	96,7	96,1

N: Número amostral; S G: Sensibilidade Global; E G: Especificidade Global; V P P: Valor Preditivo Positivo; V P N: Valor Preditivo Negativo

Nesse contexto, é notável que o OptiMAL-IT® precisa ser devidamente avaliado quanto a sua sensibilidade e especificidade em vários contextos epidemiológicos, antes de ser posto em prática como diagnóstico definitivo para o início de um tratamento para Malária.

4. Considerações finais

A capacidade de diagnosticar com precisão as infecções causadas por malária, particularmente em locais onde as instalações de laboratório não estão

bem desenvolvidas ou não estabelecidas, é de fundamental importância no controle desta doença. Logo, os testes de diagnóstico rápido (TDR) oferecem grande potencial para atender a essa necessidade (MASON et. al., 2002). Sendo assim, a análise do desempenho de testes de diagnóstico rápido para malária é crucial na tentativa de se estabelecer parâmetros e hipóteses em vários contextos epidemiológicos (METZGER et. al., 2011).

Como dito anteriormente segundo a Organização Mundial de Saúde (2011), os testes devem ter sensibilidade maior ou igual a 95% em níveis de parasitemia de > 100 parasitas/ μ L de sangue, e isto não foi verificado na maioria dos estudos revisados. Várias são as hipóteses para a variação do desempenho do teste rápido OptiMAL-IT®, quanto a sensibilidade e especificidade, nos contextos epidemiológicos exibidos nesta revisão. Uma delas é que as variações regionais dos determinantes antigênicos de pLDH possa influenciar no reconhecimento dos anticorpos monoclonais em questão, devido à natureza bioquímica da reação entre pLDH e anticorpos monoclonais em si (PIPPER et al., 2011). Outra possibilidade seria a questão de que a atividade da pLDH diminui com a terapia. Assim, parasitas podem ser vistos em sangue, mas não são viáveis, logo não produzem pLDH em larga escala, diminuindo, assim, a sensibilidade dos testes rápidos baseados na detecção deste antígeno alvo.

Outra hipótese é que a automedicação com antimaláricos pudesse influenciar no desempenho de testes de diagnóstico rápido. Entretanto, em alguns estudos, o fraco desempenho destes testes não tenha sido atribuído à automedicação (MOODY, 2002; COLEMAN et. al., 2002). Sendo assim, faz-se extremamente necessário coletar dados sobre os padrões de terapias recomendadas e automedicação para uma explicação provável para o fraco desempenho de testes rápidos em algumas situações, mas esta hipótese não pode ser fundamentada até que mais informações sejam reunidas.

A exacerbação de anticorpos contra antígenos alvos, presentes em amostras sanguíneas, também são citadas na literatura como possível explicação para a redução da qualidade dos testes. Estes podem bloquear o reconhecimento do sistema imunocromatográfico, reduzindo a detecção do antígeno em questão, como mencionado por Arcanjo e colaboradores (2007). Porém, não foi encontrado na literatura trabalho algum provando a ocorrência deste fenômeno.

Embora a maioria dos estudos citados tenham exibido sensibilidade do teste rápido OptiMAL-IT® abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde (2011), este parece constituir uma excelente ferramenta de diagnóstico de malária em áreas remotas, além de oferecer informações adicionais importantes a microscopia na detecção precisa e eficaz de infecções maláricas para o tratamento correto e oportuno da doença. Contudo, medidas definitivas para garantir a reprodutibilidade dos lotes no mercado devem ser tomadas, assim como uma avaliação concreta de resistência as temperaturas tropicais, visto que o teste ainda é considerado de elevado custo operacional em muitos países epidêmicos (OLIVEIRA et. al, 2010).

Fica claro que há uma demanda pertinente para a obtenção de melhorias técnicas do sistema imunocromatográfico como comercializado atualmente, principalmente visando o aumento da sensibilidade. Mudanças da nano partícula utilizada, assim como a convergência para sistemas eletrônicos simples poderiam levar a esta melhora técnica (SHARMA et. al., 2008; MUDANYALI et. al, 2012), porém os custos acarretados ainda estão por serem calculados.

Novas abordagens para desenvolvimento de anticorpos monoclonais direcionados a epitopos estratégicos para diferenciação entre as espécies de *Plasmodium* também vem sendo apresentadas (HURDAYAL et. al., 2010; KIM et al., 2012) assim como melhorias técnicas nos sistemas imunocromatográficos visando a detecção de amostras falso-positivas e melhoras no diagnóstico espécie-específico (PIPER et. al., 2011).

Apesar da existência desta necessidade, maiores avaliações e melhorias técnicas comuns a todos os testes no mercado, alguns estudos (D'ACREMONT et. al.,

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta revisão, por meio eletrônico.

Referências

ARCANJO, L. R. A.; LACERDA, G.V.M; ALECRIM, D. W; ALECRIM, C. G. M. Avaliação dos testes rápidos Optimal-IT e ICT Pf/Pv para o diagnóstico da malária na Atenção Básica de Saúde, no município de Manaus, Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 88-90, 2007.

ASHLEY, A. E.; TOUABI, M.; AHRER, M.; HUTAGALUNG, R.; HTUN, K.; Luchavez, J.; Dureza, C.; Proux, S.; Leimanis, M; Lwin, M. M.; Koscalova, A.; Comte, E.; Hamade,

2011) sugerem estratégias para o uso dos TDR na rotina clínica, por exemplo, o uso dos testes como primeiro método diagnóstico. Em caso positivo, há o tratamento imediato, seguido de microscopia do sangue após 3 horas. Em resultado negativo, a amostra sanguínea do paciente segue para microscopia. Uma reflexão e análise do risco a que o paciente é exposto perante um resultado falso positivo, por exemplo, em indivíduos com Artrite Reumatoide (IQBAL et. al., 2003), ou mesmo falso negativo (BORRMANN et. al., 2010) deve ser analisados meticulosamente antes de uma completa difusão deste conceito

P.; Page, L. A.; François Nosten, F; Guerin, J. P. Evaluation of three parasite lactate dehydrogenase-based rapid diagnostic tests for the diagnosis of falciparum and vivax malaria. **Malaria Journal**, n.8, p 241, 2009. Doi 1475-2875-8-241

ÁVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. The appraisal of laboratory method addressing rolls back malaria. **Ciência e Cultura**, v.52, n.4, p. 220-228, 2000.

BAKER, J; MCCARTHY, J; GATTON, M. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 192:870–7, 2005. Doi: 10.1086/432010

BORRMANN, S; SALLAS, W M; MACHEVO, S; GONZALEZ, R; BJOURKMAN, A; MARTENSSON, A; HAMEL, M; JUMA, E; PESHU, J; OQUTU, B; DJIMDE, A; DALESSANDRO, U; MARRAST, A C; LEFEVRE, G; KEM, S E. The effect of food consumption on

lumefantrine bioavailability in African children receiving artemether-lumefantrine crushed or dispersible tablets (Coartem) for acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 4. p. 434-441, 2010. Doi: 10.1111/j.1365-3156.2010.02477.x

CERÓN, L G; RODRÍGUEZ, M H; BETANZOS, A F; ABADÍA, A. Eficacia de una prueba rápida para el diagnóstico de *Plasmodium vivax* en pacientes sintomáticos de Chiapas, México. **Salud Pública de México**, v. 47, n. 4, 2005.

CERTA, U; GHERSA, P; DOBELI, H; MATILE, H; KOCHER, H P; SHRIVASTAVA, I K; SHAW, A R; PERRIN, L H. Aldolase activity of a *Plasmodium falciparum* protein with protective properties. **Science**, v. 240, n. 4855, p. 1036-1038, 1988.

CHAYANI, N.; DAS, B.; SUR, M.; BAJORIA, S. Comparison of parasite lactate dehydrogenase based immunochromatographic antigen detection assay (OptiMal®) with microscopy for detection of malaria parasites. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 104-106, 2004.

CRAIG, M H; BREDEKAMP, B L; VAUGHAN, C H; WILLIAMS, E J; ROSSOUW, V. J.; KELLY, I; KLEINSCHMIDT, A; MARTINEAU; HENRY, G F J. Field and laboratory comparative evaluation of ten rapid malaria diagnostic tests. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 96, p. 258-265, 2002.

COLEMAN, R E; MANEECHAI, N; PONLAWAT, A; KUMPITAK, C; RACHAPAEW, N;

MILLER, R S; SATTABONGKOT, J. Short Report: Failure of the optimal rapid malaria test as a tool for the detection of asymptomatic malaria in an area of thailand endemic for *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 67, n. 6, p. 563-565, 2002. Doi: 10.1186/1475-2875-7-89

D'ACREMONT, V; GREUB, G; GENTON, B. Rapid diagnostic tests (RDT): the cure-all for the practitioner?. **Rev Med Suisse**, v. 7, n. 294, p. 984-986, 2011.

FERRO, B E; GONZÁLEZ, I J; CARVAJAL, F; PALMA G I; SARAVALIA, N G. Performance of OptiMAL in the Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Infections in a Malaria Referral Center in Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n 5, p. 731-735, 2002.

FOGG, C; TWESIGYE, R; BATWALA, V; PIOLA, P; NABASUMBA, C; KIGULI, J; MUTEBI, F; HOOK, C; GUILLERM, M; MOODY, A; GUTHMANN, J P. Assessment of three new parasite lactate dehydrogenase (pan-pLDH) tests for diagnosis of uncomplicated malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 25-31, 2008. Doi: 10.1016/j.trstmh.2007.09.014

FRYAUFF, D J; PURNOMO; SUTAMIHARDJA, M A; IQBAL R. S. E; SUSANTI, I; KRISIN; SUBIANTO, B; MARWOTO, H. Performance of the Optimal assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of irian jaya, Indonesia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, n. 4, p. 139-145, 2000.

FUHRMANN, G; PELTZER, F. Measurement of enzyme activity in a case of cerebral tropical malaria. **Z Tropenmed. Parasitol.** v. 10, p. 375-378, 1959.

GILLET, P; MORI, M; ESBROECK M V; ENDE, J V; JACOBS J. Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. **Malaria Journal**, v. 8, p. 271, 2009. Doi:10.1186/1475-2875-8-271.

GBOTOSHOG, G O; CHRISTIAN T. HAPPI, C T; FOLARIN O; KEYAMO, O; SOWUNMI, A; ODUOLA A M J. Rapid Detection of Lactate Dehydrogenase and Genotyping of Plasmodium falciparum in Saliva of Children with Acute Uncomplicated Malaria. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 2010, 83(3):496–501. Doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0166

HURDAYAL, R; ACHILONU, I; CHOVEAUX, D; COETZER, T H T; GOLDRING, J P D. Anti-peptide antibodies differentiate between plasmodial lactate dehydrogenases. **Peptides**, v. 31, p. 525–532, 2010. Doi: 10.1016/j.peptides.2010.01.002

IQBAL, J; SHER, A; RAB, A. Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2-Based Immunocapture Diagnostic Assay for Malaria: Cross-Reactivity with Rheumatoid Factors. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1184–1186, 2000. Doi: 0095-1137/00/\$04.00+0

IQBAL, J; MUNEER, A; KHALID, N; AHMED, M A. Performance of the Optimal test for malaria diagnosis among suspected malaria patients at the rural health

centers. **The American journal of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 68, n. 5, p. 624–628, 2003.

IQBAL, J; SIDDIQUE, A.; JAMEEL, M.; HIRA, P. R. Persistent Histidine-Rich Protein 2, Parasite Lactate Dehydrogenase and Pan-malarial Antigen Reactivity after Clearance of Plasmodium falciparum Mono-infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4237-4241, 2004. Doi: 10.1128/JCM.42.9.4237-4241.2004

HENDRIKSEN, I C E; MTOVE, G; PEDRO, A J; GOMES, E; SILAMUT, K; LEE, S J; MWAMBULI, A; GESASE, S; REYBURN, H; DAY, N P J; WHITE, N J; SEIDLEIN, L V S; ARJEN M. DONDORP, A M. Evaluation of a PfHRP2 and a pLDH-based Rapid Diagnostic Test for the Diagnosis of Severe Malaria in 2 Populations of African Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1100- 1107, 2011. Doi: 10.1093/cid/cir143

KIM, J H; LEE, J; SOHN, H J; SONG, H O; KIM, J Y; LEE, W J; PARK, H; SHIN, H J. Production of monoclonal antibodies for Plasmodium vivax lactate dehydrogenase and patient sera screening using sandwich ELISA. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1645-50, 2012. Doi: 10.1007/s00436-012-3003-x

LEE, N; BAKER, J; ANDREWS, K T. Effect of sequence variation in Plasmodium falciparum histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests for malaria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2773–8, 2006. Doi: 10.1128/JCM.02557-05

MAKLER, M T; GIBBINS, B. Laboratory diagnosis of malaria. **Clinical in Laboratory Medicine**, v. 11, n. 4, p. 941-56, 1991.

MAKLER, M T; HINRICH, D J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of Plasmodium falciparum as an assessment of parasitemia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 205-210, 1993.

MALTHA, J; GILLET, P; CNOPS, L; BOTTIEAU, E; ESBROECK, M V; BRUGGEMAN, C; JACOBS, J. Evaluation of the rapid diagnostic test SDFK40 (Pf-pLDH/pan-pLDH) for the diagnosis of malaria in a non-endemic setting. **Malaria Journal**, v. 10, p. 7, 2011.

MASON, D P; KAWAMOTO, F; LIN, K; LAOBOONCHAI, A; WONGSRICHANALAI, C. A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. **Acta Tropica**, v. 82, p. 51-59, 2002. Doi: 10.1016/S0001-706X(02)00031-1

METZGER, W G; MARTINEZ, V S; GIRON, A; VACCARI, E; CAMPOS, E; RODRIGUEZ, I; MIRANDA, E; TERAN, E; OLIVO, L; MAGNIS, M. Assessment of routine malaria diagnosis in the Venezuela Amazon. **Tropical Medicine & Hygiene**, v. 105, n 5, p. 262-268, 2011.

MENDOZA, N M; GARCIA, M; CORTÉS, L J; VELA, C; ERAZO, R; PÉREZ, P; OSPINA, O L; BURGOS, J D. Evaluación de dos pruebas rápidas [NOW® ICT

Malaria Pf/Pv y OptiMAL®] para el diagnóstico de paludismo en Tumaco, Colombia. **Biomédica**, v. 27, p. 571-580, 2007.

MARIETTE, N; BARNADAS, C; BOUCHIER, C; TICHIT, M; MÉNARD, D. Country-wide assessment of the genetic polymorphism in Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax antigens detected with rapid diagnostic tests for malaria. **Malaria Journal**, v. 7, p. 219, 2008. Doi:10.1186/1475-2875-7-219

MOODY, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.1, p. 66. 2002. Doi: 10.1128/CMR.15.1.66-78.2002

MUDANYALI, O; DIMITROV, S; SIKORA, U; PADMANABHAN, S; NAVRUZ, I; AYDOGAN OZCAN, A. Integrated Rapid-Diagnostic-Test Reader Platform on a Cellphone. **Lab Chip**, v. 12, n. 15, p. 2678-2686, 2012. Doi: 10.1039/C2LC40235A

OLIVEIRA, M R F; GOMES, A C; TOSCANO, C M. Cost effectiveness of OptiMal® rapid diagnostic test for malaria in remote areas of the Amazon Region, Brazil. **Malaria Journal**, v.9, p. 277, 2010.

PALMER, C J; LINDO, J F; KLOSKALA, W I; QUESADA, J A; KAMINSKY, R; BAUM, M K; AGER, A L. Evaluation of the Optimal Teste for rapid diagnosis of Plasmodium vivax e Plasmodium falciparum malaria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.1, p.203-206, 1998.

PALMER, C J; BONILLA, J A; BRUCKNER, D A; BARNETT, E D; MILLER, N S; HASEEB, M A;

MASCI, J R; STAUFFER, W M. Multicenter study to evaluate the OptiMal test for rapid diagnosis of malaria in u.s. hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5178–5182, 2003. Doi: 10.1128/JCM.41.11.5178-5182.2003

PARRA, M E; EVANS, C B; TAYLOR, D W. Identification of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1629–1634, 1991.

PATTANASIN, S; PROUX, S; CHOMPASUK, D; LUWIRADAJ, K; JAQUIER, P; LOOAREESUWAN, S; NOSTEN, F. Evaluation of a new Plasmodium lactate dehydrogenase assay (OptiMAL-IT) for the detection of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 672-674, 2003. Doi: 10.1016/S0035-9203(03)80100-1

PENHALBEL, R S R; FUGIKAHA, E; LORENZETTI, A; ALVES, R T; CAVASINI, C E; ROSSIT, A R B; CALVOSA, V S P; COUTO, A A D; MACHADO, R L D. Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 194-195, 2005. Doi: 10.1590/S0037-86822005000200015

PIPER, R; LEBRAS, J; WENTWORTH, L; COOKE, H A; HOUZE, S; CHIODINI, P; MAKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH). **The American Journal of**

Tropical Medicine and Hygiene, v. 60, n. 1, p. 109-118, 1999.

PIPER, R C; BUCHANAN, I; CHOI, Y H; MAKLER, M T. Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. **Malaria Journal**, v. 10, p. 213, 2011. Doi:10.1186/1475-2875-10-213

QUATTARA, A; DOUMBO, S; SAYE, R; BEAVOGUI, A H; TRAORÉ, B; DJIMÉ, A; NIANGALY, A; KAYENTAO, K; DIALLO, M; DOUMBO, O K; THERA, M A. Use of a pLDH-based dipstick in the diagnostic and therapeutic follow-up of malaria patients in Mali. **Malaria Journal**, v. 10, p. 345, 2011.

QUINTANA, M; PIPER, R; BOLING, H L ; MAKLER, M; SHERMAN, C; GILL, E; FERNANDEZ, E; MARTIN, S. Malaria diagnosis by dipstick assay in a honduran population with coendemic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 6, p. 868–871, 1998.

RATSIMBASOAA; RANDRI AMANANTENA, A; RAHERINJAFY, R; RASOARILALAO, N; MÉNARD, D. Which malaria rapid test for madagascar? field and laboratory evaluation of three tests and expert microscopy of samples from suspected malaria patients in madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 76, n. 3, p. 481–485, 2007.

RAKOTONIRINA, H; BARNADAS, C; RAHERIJAFY, R; ANDRIANANTENAINA, H; RATSIMBASOA, A; RANDRIANASOLO, L; JAHEVITRA, M; ANDRIANTSOANIRINA, V;

- MÉNARD, D. Accuracy and Reliability of Malaria Diagnostic Techniques for Guiding Febrile Outpatient Treatment in Malaria-Endemic Countries. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 2, p. 217–221, 2008.
- RICCI, L; VIANE, I; PICCOIO, G; FABIO, A; CALDERARO, A; GALATI, L; PERANDI, F; VECCHIA, L; MANCA, N; DELTORI, G; TURANO, A; CHEZZI, C. Evaluation of Optimal Assay Test to detect imported malaria in Italy. **Journal Microbiologica**, v. 23, n. 4, p. 391-398, 2000.
- SHARMA, S; PATHAK, S. Malaria vaccine: a current perspective. **Journal of vector borne diseases**, v. 45, p. 1-20, 2008.
- SHIFF, C J; PREMJI, Z; MINJAS, J N. The rapid manual ParaSight-F test. A new diagnostic tool for Plasmodium falciparum infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 646-648, 1993. Doi: 10.1016/0035-9203(93)90273-S
- SRIVASTAVA, I K; TAKACS, B; CASPERS, P; CERTA, U; MCGREGOR, IA; SCAIFE, J; PERRIN, L H. Recombinant polypeptides for serology of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v. 83, n. 3, p.317-21, 1989. Doi: 10.1016/0035-9203(89)90487-2
- TALMAN, A M; DUVAL, L; LEGRAND, E; HUBERT, V; YEN1, S; BELL, D BRAS, J L; ARIEY, F; HOUZE, S. Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of Plasmodium lactate dehydrogenase. **Malaria Journal**, v. 6, p. 140, 2007. Doi:10.1186/1475-2875-6-140
- TARAZONA, A S; ZERPA, L S; REQUENA, D M; LLANOS-CUENTAS, A; MAGILL, A. Evaluation of the Rapid Diagnostic Test OptiMAL for Diagnosis of Malaria due to Plasmodium vivax. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 2, p. 151-155, 2004. Doi: 10.1590/S1413-86702004000200005
- VALÉA, I; TINTO, H; NIKIEMA, M; YAMUAH, L; ROUAMBA, N; DRABO, M; GUIGUEMDE, R T; D'ALESSANDRO, U. Performance of OptiMAL-IT_ compared to microscopy, for malaria detection in Burkina Faso. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 3, p. 338–340, 2009. Doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02228.x
- WILSON, N; ADJEI, A; ANDERSON, W; BAIDOO, S; STILES, J. Short report: Detection of Plasmodium falciparum histidine-rich protein II in saliva of malaria patients **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 5, p. 733-735, 2008.
- WONGSRICHANALAI C. Rapid diagnostic techniques for malaria control. **Trends in Parasitology**, v. 17, p. 307-309, 2001. Doi: 10.1016/S1471-4922(01)01925.

