Giselle Fernandes Maciel de Castro Lima

Análise comparativa da PCR em tempo real, *nested* PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Dra. Sílvia Maria Fátima Di Santi**

**São Paulo
2011**

Giselle Fernandes Maciel de Castro Lima

Análise comparativa da PCR em tempo real, *nested* PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Programa de: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Dra. Sílvia Maria Fátima Di Santi**

**São Paulo
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Giselle Fernandes Maciel de Castro

Análise comparativa da PCR em tempo real, *nested* PCR e teste
imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como
plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala /
Giselle Fernandes Maciel de Castro Lima. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Silvia Maria Fátima Di Santi.

Descritores: 1.Malária 2.Reação em cadeia da polimerase
3.Plasmodium/diagnóstico

USP/FM/DBD-107/11

*De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre a começar,
A certeza de que é preciso continuar,
E a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto, devemos fazer
Da interrupção um caminho novo,
Da queda, um passo de dança,
Do medo, uma escada,
Do sonho, uma ponte,
Da procura, um encontro.
(Fernando Sabino)*

À minha família linda!

Minha mãe e irmãs, vocês são meu alicerce e minha inspiração. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me ensinarem a ter paciência frente aos obstáculos, pela força e compreensão nos momentos de minha ausência e por todo apoio nas horas difíceis. Amo a todas, vocês são demais!

Mãe, obrigada por sempre me incentivar a pensar em:

Tudo o que é verdadeiro, honesto, justo, puro, amável, tudo o que é de boa fama, se há alguma virtude, e se há algum louvor, seja isso o que ocupe o vosso pensamento (Filipenses 4:8).

Ao meu amigo e irmão David Jimenez pela amizade e apoio nas pesquisas e computador.

A todos os amigos e pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que demonstraram amizade sincera, pela força, oração, preocupação e incentivo para a conclusão deste projeto.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não seria possível sem a ajuda e o apoio de determinadas pessoas que demonstraram o seu apoio e carinho incondicional. Tentando não esquecer ninguém, quero agradecer:

Em primeiro lugar a Deus, meu Pai, meu amigo. Agradeço a fidelidade, força espiritual e física, por me sustentar e me capacitar a fazer este trabalho e alcançar mais uma vitória, e por me rodear de pessoas maravilhosas que se empenharam em me ajudar a concluir este estudo.

À Dra. Silvia Maria Di Santi, chefe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN e minha orientadora neste trabalho, por todo apoio, paciência, dedicação, disposição e pelas horas dispensadas em meu auxílio, pela amizade, preocupação, atenção e apoio prestados, pelas respostas e bons conselhos sempre que solicitada, aproveitando para felicitá-la pela excelente coordenação deste mestrado e principalmente pela orientação neste projeto.

Ao Professor Doutor Aluísio A. Cotrim Segurado, coordenador da Comissão Coordenadora do Programa Doenças Infecciosas e Parasitárias, pela simpatia e prontidão com que me recebeu e me incluiu em sua agenda, pela paciência e todo apoio a mim concedidos.

Ao Professor Doutor Jose Eduardo Levi do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Banco de Sangue do Hospital Sírio Libanês, colaborador que prontamente aceitou participar deste projeto, pela partilha de conhecimentos e instruções valiosas que em muito enriqueceram este trabalho.

À Dra. Carmen Arroyo Sanchez do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, pela atenção e apoio prestados, pela disponibilidade sempre que consultada.

Às minhas companheiras e amigas Angélica, Juliana e Dida obrigada pela força, amparo, conselhos, amizade e pelo trabalho de vocês na concretização deste estudo. Pelo incansável esforço a mim dispensados na coleta do material, na extração e nos ensaios. Vocês são demais!

A Christina e Maria Silvia pela força e dedicação na leitura das lâminas e pela pesquisa de dados. Ao Rafael pelas amostras concedidas. Muito obrigada vocês também fazem parte deste trabalho.

Ao Marcelo pelo tempo precioso a mim dispensado, pela amizade, conselhos, apoio e conhecimentos concedidos.

A Roseli e Vânia da Secretaria da Pós-Graduação, que me acompanharam neste Mestrado, pela confiança, incentivo e carinho, pelas informações e disponibilidade, paciência e atenção a mim prestadas.

Aos meus colegas e amigos do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, Lia, Morgana, Lilian, Dra. Karin, Giovani pelo carinho com que sempre me receberam, pela compreensão, pelo incentivo e preocupação a mim dispensados, pela grande amizade, alegria e apoio que demonstraram, vocês moram em meu coração.

Ao Seminário Laveran & Deane 2008, pelas sugestões que enriqueceram o projeto.

Este estudo foi realizado no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN e no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, com apoio da SUCEN, LIM 49, PROAP/CAPES e CNPq.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO.....	1
1. Malária: aspectos gerais.....	2
2. Epidemiologia da malária.....	3
2.1. Situação mundial.....	3
2.2. Situação no Brasil.....	4
3. Descrição e biologia de <i>Plasmodium</i>	11
4. Ciclo biológico da malária.....	11
5. Sintomatologia.....	15
6. Desenvolvimento de imunidade.....	17
7. Infecção assintomática.....	20
8. Infecções induzidas.....	20
8.1. Acidentes hospitalares.....	21
8.2. Uso compartilhado de agulhas.....	21
8.3. Transplante.....	22
8.4. Via congênita.....	22
8.5. Transfusional.....	23
9. Diagnóstico da malária.....	25

9.1. Método de referência - gota espessa.....	26
9.2. Métodos de detecção de antígenos.....	27
9.3. Métodos Moleculares.....	29
9.3.1. Genes ribossomais aplicados ao diagnóstico de malária.....	29
9.3.2. PCR convencional.....	30
9.3.3. PCR em tempo real.....	32
9.4. Métodos de detecção de anticorpos.....	33
9.4.1. RIFI.....	34
9.4.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	35
9.4.3. Dot ELISA.....	36
9.4.4. Testes rápidos imunocromatográficos.....	36
9.5. Processamento de amostras em <i>pool</i>	37
OBJETIVOS.....	39
Objetivo Geral.....	40
Objetivos Específicos.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
1. Origem das amostras.....	42
2. Montagem dos <i>pools</i>	44
3. Extração de DNA.....	44
4. PCR em tempo real.....	45
4.1. Sensibilidade analítica do controle positivo.....	46
4.2. Especificidade.....	47
4.3. Controle negativo e controle interno.....	47
5. <i>Nested</i> PCR.....	48

6. Detecção de anticorpos.....	50
7. Aspectos éticos da pesquisa.....	50
8. Análise estatística.....	51
RESULTADOS.....	53
1. Padronização dos controles positivo e negativo.....	54
1.1. Padronização do controle positivo pelas técnicas de PCR em tempo real e <i>nested</i> PCR.....	54
1.2. Padronização do controle negativo.....	57
2. Controle interno.....	58
3. Desempenho da PCR em tempo real, <i>nested</i> PCR e SD Bioline <i>Pf/Pv</i> comparados com a gota espessa.....	60
3.1. Desempenho comparativo dos ensaios moleculares e o soroló - gico.....	62
3.2. Concordância entre os testes moleculares e sorológico.....	62
4. Aspectos comparativos entre os ensaios moleculares e o soroló - gico considerando as amostras de <i>P. vivax</i>	63
5. Aspectos comparativos entre os ensaios moleculares e o soroló - gico das amostras de <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i>	67
6. Aspectos comparativos entre os ensaios moleculares e o soroló - gico das amostras processadas em <i>pool</i>	70
DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ANEXOS.....	120
ANEXOS I.....	121
ANEXOS II.....	124

TABELAS

1. Números estimados de casos de malária (milhões) e mortes (milhares) por Região da Organização Mundial de Saúde, 2008	4
2. Casos de malária, segundo estados da Amazônia Legal, 2008 a 2009.....	5
3. Amostras positivas para <i>Plasmodium</i> selecionadas para a montagem dos <i>pools</i> , segundo prevalência das espécies no Brasil.....	43
4. Sequências dos <i>primers</i> gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de <i>Plasmodium</i> e sonda FAM-TAMRA (GAMA et al, 2007) utilizados para realização de PCR em tempo real nas amostras positivas, negativas e nos <i>pools</i>	46
5. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação por <i>nested</i> PCR, de fragmentos de genes da <i>ssrRNA</i> de <i>Plasmodium</i> . Os <i>primers</i> rPLU5 e rPLU6 são gênero-específicos e os <i>primers</i> rVIV1 e rVIV2, rMAL1 e rMAL2, rFAL1 e rFAL2, rOVA1 e rOVA2 (ou rOVA1v e rOVA2v) são espécie-específicos para <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. falciparum</i> e <i>P. ovale</i> respectivamente. Gene <i>ssrRNA</i> esquematizado abaixo.....	49
6. PCR em tempo real realizado em triplicata com amostras de <i>P. falciparum</i> de cultura em diluições seriadas, com e sem GAPDH....	58
7. Valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) de PCR em tempo real, <i>nested</i> PCR e SD Bioline, comparados à gota espessa, com IC 95% de probabilidade.....	61

8. Concordância e índice Kappa (IC 95%) entre os testes moleculares e o sorológico.....	63
9. Resultados dos ensaios de PCR em tempo real (<i>cut-off</i> = 36,88), <i>nested</i> PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv em amostras de sangue positivas para <i>P. vivax</i>	66
10. Resultados dos ensaios de PCR em tempo real (<i>cut-off</i> = 36,88), <i>nested</i> PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv em amostras de sangue positivas para <i>P. falciparum</i> e <i>P. malariae</i>	69
11. Resultados dos ensaios de PCR em tempo real (<i>cut-off</i> 36,88), <i>nested</i> PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv (Standard Diag. Inc.) realizado com <i>pools</i> contendo amostras positivas* com negativas. * = <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> ou <i>P. ovale</i>	73

FIGURAS

1. Letalidade por malária na Amazônia Legal e na região Extra- Amazônica referente aos casos autóctones e importados, 2008.....	6
2. Número de casos autóctones de malária na Região Extra- Amazônica, 2001 a 2008.....	7
3. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> no hospedeiro humano e no vetor.....	14
4. Diagrama de um merozoíto, com destaque das principais organelas e estruturas celulares.....	15
5. Montagem de <i>pools</i> com 10 amostras de sangue, incluindo positivas para <i>Plasmodium</i> e negativas.....	44
6. PCR em tempo real com as diluições seriadas de amostras de <i>P.</i> <i>falciparum</i> de cultura, em duplicata: diluições de 3.600 parasitos/mm ³ a 0,36 parasito/mm ³ e <i>Cycle Treshold</i> (Ct) de 21,7 a 34,3, respectivamente (A). Curva mostrando o log da quantidade inicial de DNA (eixo-x) e Ct (eixo-y), com uma determinação (R ²) coeficiente de 0,99 e -3,2 de inclinação (B).....	55
7. <i>Nested</i> PCR realizado com as diluições seriadas de amostras de <i>P. falciparum</i> de cultura, em duplicata: diluições de 3.600 parasitos/mm ³ a 0,36parasito/mm ³	56
8. PCR em tempo real de amostras de <i>P. malariae</i> e <i>P.vivax</i> lisadas com e sem saponina e diluídas para 6 e 1 parasito/mm ³ , controle	

positivo amostras clínicas de <i>P. falciparum</i> (Ct 22) e <i>P. malariae</i> (Ct 19).....	56
9. <i>Nested</i> PCR de amostras de <i>P. malariae</i> e <i>P. vivax</i> lisadas com (A e C) e sem (B e D) saponina e diluídas para 6 (A e B) e 1 (C e D) parasito/mm ³	56
10. PCR em tempo real realizado com amostras negativas e controle positivo com 1 parasito/mm ³ (▲).....	57
11. PCR em tempo real para teste do gene GAPDH (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase) [<i>Homo sapiens</i>] como controle interno, realizado com amostras contendo leucócitos e com os pools de validação. Gene esquematizado no topo.....	59
12. PCR Convencional do gene da β-globina [<i>Homo sapiens</i>] como controle interno, realizado com amostras contendo leucócitos e com pools. Gene esquematizado no topo	60
13. PCR em tempo real realizado com DNA de amostras de <i>P. vivax</i> e controle positivo com 1 parasito/mm ³ (▲).....	64
14. <i>Nested</i> PCR realizado com amostras de sangue positivas para <i>P. vivax</i> , mostrando amplificação de fragmentos de 120bp.....	65
15. A. Teste imunocromatográfico SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diag, Inc.) para detecção de anticorpos específicos contra antígenos recombinantes, realizado com amostras de soro positivas para <i>P. vivax</i> . B. Controle realizado com amostras de soro negativas para malária. Seta vermelha=controle do teste; seta azul= reação positiva.....	65

16. PCR em tempo real realizado com amostras de <i>P. falciparum</i> (A), <i>P. malariae</i> (B) e controle positivo com 1 parasito/mm ³ (▲)...	68
17. <i>Nested</i> PCR realizado com amostras de sangue positivas para <i>P. falciparum</i> (A) e <i>P. malariae</i> (B) mostrando amplificação de fragmentos de 205 bp e 144 bp respectivamente.....	68
18. Teste imunocromatográfico SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diag, Inc.) para detecção de anticorpos específicos contra antígenos recombinantes, realizado com amostras de soro positivas para <i>P. falciparum</i> (n ^{os} . 17,20,21,22,23 e 24). Seta vermelha=controle do teste; seta azul= reação positiva.....	69
19. PCR em tempo real realizado com amostras positivas e negativas agrupadas em <i>pools</i> e controle positivo com 1 parasito/mm ³ (▲).....	71
20. <i>Nested</i> PCR realizado com amostras processadas em <i>pools</i> contendo amostras positivas com negativas, mostrando amplificação de fragmentos de 205bp, 120bp e 144bp respectivamente para <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> e <i>P. malariae</i>	71
21. Teste imunocromatográfico SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diag, Inc.) para detecção de anticorpos específicos contra antígenos recombinantes, realizado com soros processados em <i>pools</i> contendo amostras positivas* com negativas. * = <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> ou <i>P. ovale</i>	72

RESUMO

Lima GFMC. **Análise comparativa da PCR em tempo real, *nested* PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em pool, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala.** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

O diagnóstico da malária tem como teste de referência a gota espessa, porém é consenso que é preciso adotar alternativas em situações específicas, com técnicas mais sensíveis e que possam ser aplicadas no processamento de grande número de amostras, como estudos clínicos, epidemiológicos ou triagem de doadores em bancos de sangue. Com a finalidade de formar uma plataforma de diagnóstico para malária em amostras agrupadas em *pools*, foi realizada análise comparativa da PCR em tempo real, a *nested* PCR e um teste rápido específico para detecção de anticorpos contra *P.falciparum* e *P. vivax*, com intuito de reduzir o número de ensaios, com custo relativamente baixo. Foram utilizadas 50 amostras de sangue positivas para *Plasmodium*, de acordo com a prevalência das espécies no Brasil (*P. vivax* 75%, *P. falciparum* 22% e *P. malariae* 3%), com diagnóstico realizado pelo método padrão ouro. Adicionalmente, 48 amostras de sangue negativas para *Plasmodium* foram selecionadas para controle negativo e confecção de 15 *pools*, contendo amostras positivas e negativas. Quatro das amostras negativas para malária eram positivas para outras doenças. Tanto as amostras positivas como as negativas foram submetidas individualmente aos ensaios de PCR em tempo real, *nested* PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv para detecção de malária. Um teste de PCR convencional foi incluído a fim de testar a qualidade do DNA, mediante amplificação de uma sequência do gene humano da β -globina como controle interno. Posteriormente as amostras foram analisadas em *pools* pelos ensaios moleculares e sorológicos. Nos testes individuais, 45/49 amostras foram positivas para *Plasmodium* pela PCR em tempo real, com Sensibilidade de 91,84%, e Especificidade (48/48) de 100,00%; 46/49 amostras detectaram *Plasmodium* pela *nested* PCR, com Sensibilidade de 93,88%, e Especificidade (12/12) de 100,00%; 32/46 amostras foram reagentes no teste sorológico SD Bioline Pf/Pv, com Sensibilidade de 69,56%, e Especificidade (10/10) de 100,00%. Nos ensaios com amostras agrupadas, 13 *pools* (86,66%) foram positivos pela PCR em tempo real; a *nested* PCR também obteve positividade nos mesmos 13 *pools* (86,66%). O teste imunocromatográfico SD Bioline apresentou Sensibilidade de 73,33% considerando o diagnóstico pela gota espessa. Tanto a PCR em tempo real como a *nested* PCR apresentaram boa sensibilidade e especificidade, seja nas amostras clínicas analisadas individualmente ou em *pools*, diferentemente do teste sorológico SD Bioline. Ambas as metodologias moleculares apresentaram desempenho semelhante, com bons resultados de acurácia e indicadores de validade, como Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Negativo. Considerando-se as vantagens inerentes à PCR em tempo real, como rapidez, processamento em sistemas fechados e dispensa de eletroforese após amplificação, este método deve ser indicado como primeira escolha para diagnóstico de malária em grande número de amostras, seguido da *nested* PCR para diferenciação de espécies de *Plasmodium*. O teste sorológico, que é específico para detecção de anticorpos contra *P. vivax* e *P. falciparum*, pode ser indicado apenas como método complementar no diagnóstico de malária.

Descritores: malária; Reação em cadeia da Polimerase; *Plasmodium*; diagnóstico

SUMMARY

Lima GFMC. **Comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunochromatographic test in blood samples processed in pool, as a platform for molecular and serological diagnosis of malaria on large-scale.** [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

The diagnosis of malaria is based on the thick blood film as reference test, but the consensus is that it is necessary to adopt alternatives in specific situations, with more sensitive techniques that could be applied in the processing of large numbers of samples in clinical and epidemiological studies or in the screening of donors at blood banks. The purpose of this study was to analyze and compare the real-time PCR, the nested PCR and a rapid test for detection of specific antibodies against *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*, to build a platform for malaria diagnosis in pooled samples, reducing the number of tests and providing relatively low cost. For the tests analysis, we used 50 blood samples positive for *Plasmodium*, according to the prevalence of the species in Brazil (75% *P. vivax*, 22% *P. falciparum* and 3% *P. malariae*), with diagnosis performed by the gold standard method. In addition, 48 blood samples negative for *Plasmodium* were selected for negative control and production of 15 pools containing positive and negative samples. Four of the malaria negative samples were positive for other diseases. Both the positive and negative samples were submitted to individual testing of real-time PCR, nested PCR and immunochromatographic test SD Bioline Pf/Pv for the detection of malaria. To check the quality of DNA, a conventional PCR was included, with amplification of a sequence of the β -globin human gene as internal control. Subsequently the samples were analyzed in pools by molecular and serological tests. In individual tests, 45/49 samples were positive for *Plasmodium* by real time PCR, with sensitivity of 91.84% and (48/48) 100.00% specificity, 46/49 samples detected *Plasmodium* by nested PCR, with sensitivity of 93.88% and (12/12) specificity 100.00%; 32/46 samples were positive on serological test SD Bioline, with sensitivity of 69.56% and (10/10) 100.00% specificity. In tests with pooled samples, 13 pools (86.66%) were positive by real time PCR; the nested PCR also had positive results in the same 13 pools (86.66%). Immunochromatographic test SD Bioline Pf/Pv showed sensitivity of 73.33% compared with blood smear. Both real-time PCR and the nested PCR showed good sensitivity and specificity in samples analyzed individually and in pools, unlike the SD Bioline test. Both molecular methods showed similar performance, with good results in accuracy and validity indicators, such as sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. Considering the advantages inherent in real-time PCR, a fast test that is processed in closed systems without post-amplification handling, this method should be indicated as first choice for diagnosis of malaria in large numbers of samples, followed by nested PCR for species determination. Serological test, that is specific for antibodies against *P. vivax* and *P. falciparum*, could be used as a supplementary method for diagnosis of malaria.

Descriptors: malaria; Polimerase Chain Reaction; *Plasmodium*; diagnosis

INTRODUÇÃO

1. Malária: aspectos gerais

A malária é uma infecção potencialmente grave e a mais importante das parasitoses, ocasionando significativa morbidade e mortalidade no mundo. A infecção é causada por parasitos do gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885, Classe *Sporozoa*. A descoberta do parasito da malária no sangue humano foi feita na Argélia em 1880, por Charles Louis Alphonse Laveran, tendo sido chamado inicialmente de *Oscillaria malariae*. É transmitida pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas, podendo também ser transmitida por transfusão sanguínea, pelo uso compartilhado de agulhas contaminadas e por via congênita no momento do parto. Cinco espécies podem parasitar o homem: *P. falciparum* Welch, 1897, *P. vivax* Grassi e Feletti, 1890, *P. malariae* Laveran, 1881, *P. ovale* Stephens, 1922 e *P. knowlesi* Sinton e Mulligan, 1932, este recentemente considerado o quinto parasito causador de malária em humanos (Rev. em DI SANTI e BOULOS, 1999; COX-SINGH et al, 2008; WHITE, 2008). Dentre estas espécies *P. falciparum* pode evoluir para malária grave, porém relatos recentes sobre complicações e óbitos em infecções por *P. knowlesi* e *P. vivax* (COX-SINGH et al, 2008; SHARMA e KHANDURI, 2009) foram registrados. A resistência do parasito aos antimaláricos é um dos maiores desafios para o controle da doença, levando a tratamentos ineficazes que contribuem para o aumento da morbidade e

mortalidade (GREENWOOD et al, 1987). No continente africano a anemia em crianças também contribui para a morbidade, levando à necessidade de transfusões sanguíneas, aumentando ainda mais o risco de adquirir a malária (HEDBERG et al, 1993).

2. Epidemiologia da malária

2.1. Situação mundial

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que metade da população mundial esteja sob o risco de adquirir malária, com 243 milhões de casos e aproximadamente 863 mil óbitos em 2008. Na África ocorrem 85% dos casos, seguido pelo Sudeste Asiático com 10% e regiões do Mediterrâneo Oriental com 4%. As estimativas mostram redução no número de casos em países em sua maioria pequenos, o que não causa impacto nos números globais. Com relação ao número de óbitos, 89% ocorrem na África, seguido pelo Mediterrâneo Oriental com 6% e Sudeste Asiático com 5%. Os números referentes às diferentes regiões determinadas pela OMS são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Números estimados de casos de malária (em milhões) e mortes (em milhares) por Região da Organização Mundial de Saúde, 2008.

Região OMS	Casos		Óbitos	
	Nº. Total	<i>P. falciparum</i> (%)	Nº. Total	Abaixo 5 anos (%)
África	208	98	767	88
Américas	1	32	1	30
Mediterrâneo Oriental	9	75	52	77
Europa	0	4	0	3
Sudeste Asiático	23	56	40	34
Pacífico Ocidental	2	79	3	41
Total	243		863	

Fonte: World Malaria Report, World Health Organization, 2009.

2.2. Situação no Brasil

Na década de 50 a Organização Mundial da Saúde, através do Programa Global de Erradicação da Malária, empreendeu esforços para interromper a transmissão da doença, o que levou a uma redução importante do número de casos em todo o mundo. (MACDONALD, 1965).

A incidência da endemia no Brasil foi reduzida na década de 60, após a Campanha de Erradicação da Malária (CEM), registrando-se ocorrência de menos de 100.000 casos anuais, com eliminação da transmissão nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e parte do Centro-Oeste. A partir da década de 70, a implantação de projetos de colonização e a reforma agrária na Região Amazônica, levaram a um crescimento demográfico acentuado e desordenado e a epidemias de malária dispersas. Esta região concentra a maioria dos casos de malária do país, onde as condições sócio-econômicas e ambientais favorecem a

proliferação de *Anopheles*, e consequentemente, a exposição de grande número de indivíduos à infecção. Apesar dos esforços, em 1999 foram registrados 635.644 casos, quando então foi lançado o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal para reduzir a morbimortalidade por malária, evitar epidemias localizadas, reduzir a gravidade, o número de internações e óbitos (BRASIL, 2003). Em 2003, o Ministério da Saúde implantou o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) vigente nos dias atuais. Os dados referentes à malária em 2009 na Amazônia Legal, que é responsável por 99,5% dos casos do país, são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Casos de malária, segundo estados da Amazônia Legal, 2008 a 2009.

UF	Total de casos		% de variação de casos	% por UF 2009
	2008	2009		
AM	133.660	98.714	-26,1	32,3
PA	69.213	99.446	43,7	32,5
RO	49.807	41.359	-17,0	13,5
AC	27.704	27.515	-0,7	9,0
AP	15.132	14.990	-0,9	4,9
RR	10.235	14.778	44,4	4,8
MT	4.081	3.271	-19,8	1,1
MA	4.757	5.669	19,2	1,9
TO	165	126	-23,6	0,0
AMAZÔNIA	314.754	305.868	-2,8	100,0

Fonte: Sivep_Malária/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2010.

A espécie predominante é *P. vivax*, com cerca de 80% dos casos, embora no período de 1999 a 2006, tenha ocorrido um aumento na proporção de malária por *P. falciparum* de 18,6% para 24,9% (BRASIL, 2007). A letalidade vem diminuindo na Amazônia Legal, porém mostra um preocupante percentual na região extra-amazônica, como mostra a Figura 1. Este índice retrata o escasso conhecimento sobre a doença nas áreas sem transmissão ativa, levando ao diagnóstico tardio e agravamento do caso.

Figura 1. Letalidade por malária na Amazônia Legal e na região Extra-Amazônica referente aos casos autóctones e importados, 2008.

Fonte: SIM/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2010.

A região extra-amazônica não é considerada endêmica para malária, porém como não houve a eliminação do mosquito transmissor, é ainda vulnerável à ocorrência de episódios de reintrodução da

doença. O grande fluxo migratório da região amazônica para outros estados brasileiros possibilita o surgimento de surtos de malária, como os registrados em 2002, no Ceará, e em 2004, 2005 e 2006, no Piauí e Espírito Santo. Em 2006, o estado de São Paulo notificou 57 casos autóctones de malária, que representaram 42% do total de casos notificados na região, um aumento de 90% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2007). Os números referentes a casos autóctones na região extra-amazônica nos últimos oito anos são mostrados na Figura 2.

Figura 2. Número de casos autóctones de malária na Região Extra-Amazônica, 2001 a 2008.

Fonte: SINAN/ Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2010.

São poucas as informações sobre a transmissão autóctone na Região Extra-amazônica. Em Santa Catarina, os estudos epidemiológicos realizados na década de 60 por Avery-Jones e

Ferreira-Neto (1964) mostraram 8% de casos de *P. vivax* assintomáticos. Na mesma época, foi descrita a incidência de *P. malariae* no estado (FERREIRA e RACHOU, 1966) e *Anopheles* subgênero *Kerteszia* foi incriminado como o maior responsável pela transmissão da malária (RACHOU e FERREIRA, 1966). Em 1984, Deane et al relataram que a dispersão vertical do *An. (K) cruzii* estaria associada com a transmissão de malária simiana na região.

O Paraná mantém sua vulnerabilidade pela presença de anofelinos em áreas restritas, onde o fluxo migratório de doentes e portadores assintomáticos propicia reintrodução constante do agente etiológico. A análise dos dados registrados entre 1994 e 1999 mostrou 15,5% de casos autóctones, o que é preocupante quando se consideram as características da malária transmitida nos estados com cobertura de Mata Atlântica, onde são descritos casos assintomáticos (BÉRTOLI e MOITINHO, 2001).

O estado de São Paulo é considerado área sem transmissão ativa da doença, porém a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) em conjunto com o Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde, tem detectado anualmente casos de malária autóctone, de decurso clínico geralmente atípico, brando ou mesmo assintomático. Os parasitos identificados nesses casos são *P. vivax* ou *P. malariae* (CARVALHO et al, 1985; 1988; CURADO et al, 1997;

KIRCHGATTER et al, 2005). Nos últimos anos, os casos autóctones ocorreram nas regiões da grande São Paulo, Vale do Ribeira, Baixada Santista e Litoral Norte (SÃO PAULO, 2010b). A prevalência de infecções assintomáticas varia de 9,4% a 61,2% (COSTA-NASCIMENTO et al, 2006, RESUMOS; COUTO et al, 2010), com parasitemias muito baixas, de difícil detecção pela hemoscopia convencional. A importância da detecção de casos e do tratamento adequado reside principalmente no fato de que portadores assintomáticos podem servir como fonte de infecção para os vetores em diferentes regiões do estado, permitindo a disseminação da endemia. Além disso, há o risco de transmissão da doença por via induzida: em quatro episódios de malária induzida nos últimos 10 anos, portadores assintomáticos com deslocamentos por regiões de Mata Atlântica, realizaram doações de sangue que ocasionaram casos de malária transfusional, incluindo um óbito por *P. malariae* (KIRCHGATTER et al, 2005; SCURACCHIO et al, 2011).

No Espírito Santo são descritos casos autóctones diagnosticados pela gota espessa como *P. vivax*, sempre em baixas parasitemias, que os autores sugerem tratar-se de parasitos de origem simiana (CERUTTI et al, 2007). Corrobora com esta hipótese o fato de *P. brasilianum* e *P. malariae* serem considerados uma mesma espécie, com base em evidências moleculares (COCHRANE et al, 1990, FANDEUR et al, 2000). Do mesmo modo, *P. simium* tem sido identificado como *P. vivax* que circula em primatas do Novo Mundo (LI et al, 2001). Ainda nesta linha de

análise, foi descrito foco de malária em humanos causada por *P. knowlesi*, parasito originalmente circulante em primatas (SINGH et al, 2004). Deve também ser considerada a possibilidade de ocorrência de infecções auto-limitadas e de portadores assintomáticos que mantêm a transmissão na área, hipótese suportada pela significativa prevalência de anticorpos contra as formas sanguíneas de *Plasmodium* e por amostras de sangue de assintomáticos positivas pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (CERUTTI et al, 2007).

Quanto aos aspectos entomológicos, no Brasil, as espécies de *Anopheles* do subgênero *Nyssorhynchus* são as principais responsáveis pela manutenção da malária na Região Amazônica, enquanto o subgênero *Kerteszia* destaca-se pela transmissão de *Plasmodium* em áreas recobertas pela Mata Atlântica. Dentre as espécies do subgênero *Kerteszia*, *An. (K.) cruzii*, *An. (K.) homunculus* e *An. (K.) bellator* são considerados vetores potenciais de *Plasmodium* nas regiões sul e sudeste do Brasil (CALADO e NAVARRO-SILVA, 2005).

O comportamento epidemiológico da malária nas regiões de Mata Atlântica sugere que os anticorpos específicos dos pacientes assintomáticos controlam a multiplicação do protozoário, mantendo parasitemias discretas, e assim a circulação de gametócitos e a infectividade dos mosquitos transmissores permanecem baixas (BARROSO, 2003).

3. Descrição e biologia de *Plasmodium*

Natura

Mundus

Naturalia

Biota

Domínio Eukaryota

Reino Protozoa

SubReino Biciliata

InfraReino Alveolata

Filo Myzozoa

Subfilo Apicomplexa

Classe Aconoidasida

Ordem Haemospororida

Família Plasmodiidae

Gênero *Plasmodium* Marchiafava & Celli, 1885

<http://www.taxonomy.nl/Main/Classification/1326.htm>

Os parasitos da malária pertencem ao Subfilo Apicomplexa definido como um grande grupo monofilético que possui três organelas de invasão na extremidade apical - roptria, micronema e grânulo denso (VIVIER e DESPORTES, 1989). São obrigatoriamente intracelulares e no interior das hemácias ocorre a esquizogonia, a produção de pigmento malárico e a formação de gametócitos. A reprodução do parasito é realizada de forma assexuada em hepatócitos no ciclo exoeritrocítico e em glóbulos vermelhos no ciclo eritrocítico. A reprodução sexuada ocorre no *Anopheles*.

4. Ciclo biológico da malária

A fêmea do mosquito *Anopheles* realiza o repasto sanguíneo para maturação dos ovos, e quando infectada transmite os parasitos

para o hospedeiro vertebrado através da inoculação de esporozoítos. Estes são depositados primeiramente na derme, e ao encontrarem um vaso sanguíneo penetram na circulação sanguínea, iniciando-se assim o ciclo de vida do *Plasmodium* (Figura 3). Aproximadamente 70% dos esporozoítos alcançam a circulação sanguínea; os 30% restantes invadem o sistema linfático e apesar de alguns conseguirem se desenvolver em formas similares às formas exoeritrocíticas, são fagocitados por células dendríticas (PRUDÊNCIO et al, 2006). Pela circulação sanguínea os esporozoítos migram até o fígado onde, após atravessar as células de Kupffer através de vacúolo parasitóforo, penetram nos hepatócitos. Duas proteínas principais da superfície dos esporozoítos, a *circumsporozoite protein* (CSP) e a *thrombospondin-related adhesive protein* (TRAP) ligam-se a proteoglicanas de heparan sulfato da superfície dos hepatócitos durante a invasão, (MILLER et al, 2002). No interior das células hepáticas os esporozoítos dão origem a esquizontes hepáticos mediante reprodução assexuada, com liberação de milhares de merozoítos contidos em vesículas denominadas merossomos, que os transportam até o sinusóide hepático (STURM et al, 2006). Em *P. vivax* e em *P. ovale*, alguns esporozoítos podem permanecer latentes na fase hepática sob a forma de hipnozoítos e desencadear as recaídas características destas espécies (KROTOSKI, 1989).

Os merozoítos liberados alcançam a via circulatória, penetrando nos eritrócitos. O ciclo eritrocítico é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária (VAUGHAN et al, 2008; ALY et al, 2009).

Os receptores para a invasão são encontrados nos micronemas e nas roptrias (Figura 4), responsáveis pela mobilidade dos parasitos tanto no deslizamento quanto na migração e invasão. Este fenômeno chamado travessia celular também acontece com os esporozoítos na glândula salivar do mosquito, na pele do hospedeiro vertebrado e no endotélio sinusoidal (KAPPE et al, 1999). Cada merozoíto irá desenvolver-se sequencialmente em trofozoíto e esquizonte. A reprodução por esquizogonia produz esquizontes sanguíneos que ao se romperem liberam merozoítos que irão invadir outros eritrócitos. Posteriormente ao processo de invasão que ocorre em 20 segundos, há perda de micronemas, roptrias e membrana, dando origem ao trofozoíto. Após um período de reprodução assexuada, alguns trofozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, as formas infectantes para o mosquito vetor, onde ocorre o ciclo sexuado (HADLEY et al, 1986).

Quando o mosquito ingere eritrócitos contendo gametócitos, estes são liberados após rompimento das hemácias no intestino, ocorrendo exflagelação dos gametas masculinos (BILLKER et al, 1997). Após maturação dos gametas há formação de zigoto com

recombinação, originando o oocineto. Este rompe a matriz peritrófica, e se aloja entre o epitélio e a lâmina basal do intestino do mosquito. Nesta etapa, em contato com vários nutrientes da hemolinfa do mosquito, o oocineto transforma-se em oocisto, onde há formação de esporozoítos. Estes migram até a glândula salivar através da hemolinfa. A invasão da glândula salivar é a etapa onde o esporozoíto torna-se infectante ao hospedeiro vertebrado assim que o vetor anofelino fizer o próximo repasto (BEIER, 1998; KAPPE et al, 2003; ALY et al, 2009).

Figura 3. Ciclo de vida de *Plasmodium* no hospedeiro humano e no vetor.

Fonte: http://www.scripps.edu/newsandviews/e_20021007/Mosquito_cycle.jpg

Figura 4. Diagrama de um merozoíto, com destaque das principais organelas e estruturas celulares.

Fonte: Cowman e Crabb. *Cell* 2006; 124: 755–6.

5. Sintomatologia

A sintomatologia da infecção está relacionada com o ciclo sanguíneo do parasito. *P. falciparum* invade hemácias indistintamente e possui muitas vias alternativas para a invasão dos eritrócitos, o que possibilita atingir altas parasitemias em curto período de tempo. A invasão dos eritrócitos por *P. vivax* e *P. knowlesi* ocorre em grupo sanguíneo Duffy positivo, pois o parasito depende da interação com antígenos Duffy da superfície do eritrócito que são receptores da proteína *Duffy binding protein* (PvDBP) expressa pelo parasito (HAYNES et al, 1988; GRIMBERG et al, 2007). *P. vivax* e *P. ovale* são limitados à invasão

de reticulócitos, o que limita a parasitemia sanguínea, visto que a taxa de hemácias jovens de um indivíduo é em torno de 1%. *P. malariae* invade exclusivamente hemácias maduras, o que faz com que esta espécie leve a parasitemias muito baixas em indivíduos imunocompetentes devido ao processo natural de retirada de células maduras pelo baço ou macrófagos, podendo permanecer por muitos anos, em uma forma assintomática.

A sintomatologia da malária é bem estabelecida, porém o quadro clássico pode ser alterado pelo uso de profilaxia ou desenvolvimento de imunidade, quando então os sintomas estão modificados ou até ausentes. Doença infecciosa aguda, a malária é caracterizada por febre alta, calafrios, suores e cefaléia, que normalmente ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie de *Plasmodium*. Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente que depende do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de *Plasmodium*: 24 horas para *P. knowlesi* (COX-SINGH et al, 2008), 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae*. Entretanto, esta regularidade não é observada em certo número de casos.

De modo geral, as formas clínicas mais severas são causadas por *P. falciparum*, principalmente em adultos não imunes, crianças e gestantes. O quadro clínico pode evoluir para formas de malária

complicada, destacando-se forte cefaléia, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões, insuficiência renal aguda, edema pulmonar agudo, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria e choque, que podem evoluir para óbito (BRASIL, 2005). Porém casos graves e até mesmo letais são relatados também em *P. vivax* (MENDIS et al, 2001; LOMAR et al, 2005; PRICE et al, 2007), *P. knowlesi* (COX-SINGH et al, 2010) e *P. malariae* (KIRCHGATTER et al, 2005).

6. Desenvolvimento de imunidade

A dinâmica da imunidade em malária é bastante complexa e envolve mecanismos espécie/estágio específicos. A obtenção e a manutenção de imunidade protetora contra os sintomas clínicos requerem repetidas infecções durante o período de vida do indivíduo. Principalmente em *P. falciparum*, se a infecção não for controlada pelo sistema imune ou por antimaláricos, a parasitemia sanguínea pode aumentar exponencialmente causando agravamento do quadro e até morte. Mecanismos efetores inatos ou adaptativos podem limitar a parasitemia e prevenir a malária severa, contudo, não eliminam a infecção completamente, levando a parasitemias submicroscópicas que podem persistir por meses ou anos (STEVENSON e RILEY, 2004). A resistência inata engloba mecanismos de resistência que ocorrem logo no início das infecções, antecedendo a resposta imune adaptativa que

surge após certo período de tempo. Exemplos de resistência inata são os casos de anemia falciforme, que impede a evolução de *P. falciparum* para malária severa (ALLISON, 2009) e de deficiência em glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PD), que causa estresse oxidativo em eritrócitos e confere proteção contra malária severa, dificultando a infecção ou replicação do parasito nos eritrócitos (LUZZATTO, 1979; STEVENSON e RILEY, 2004). A herança de resistência inata à malária também pode ser demonstrada em indivíduos que não expressam o antígeno Duffy (DARC) nos eritrócitos, conferindo resistência ao *P. vivax* (ALLISON, 2009) pela ausência de interação deste antígeno com a proteína expressa no parasito, *Duffy binding protein* (PvDBP). Esta resistência também é observada com *P. knowlesi* em indivíduos do grupo sanguíneo Duffy negativo (MILLER et al, 1975; DVORAK et al, 1975). Em países da África onde o grupo Duffy-negativo se fixou, a transmissão de malária por *P. vivax* é incomum (WELCH et al, 1977; MENDIS et al, 2001). Recentemente alguns autores descreveram a ocorrência *P. vivax* em indivíduos Duffy negativos, habitantes do Quênia (RYAN et al, 2006), Brasil (CAVASINI et al, 2007) e Madagascar (MÉNARD et al, 2010).

As hemoglobinopatias HbS (*Glu6Val*), HbE (*Glu26Lys*) e HbC (*Glu6Lys*) que apresentam substituição do ácido glutâmico por valina ou lisina, também conferem resistência à infecção ou à malária severa (KWIATKOWSKI, 2005).

Apesar da exposição repetida ao parasito em áreas endêmicas, a imunidade protetora contra a infecção leva muitos anos para se desenvolver (SNOW et al, 1999). A idade é a correlação mais consistente com imunidade protetora - crianças que vivem em áreas endêmicas de *P. falciparum* desenvolvem a imunidade protetora contra malária grave durante os primeiros cinco anos de vida (MARSH,1992) em indivíduos residentes em áreas de alta endemicidade. Ladeia-Andrade (2005) relatou vários estudos realizados na região Amazônica, que revelaram níveis de IgG1 anti-PfMSP-1₁₉ mais elevados entre indivíduos com mais tempo de exposição e entre infectados assintomáticos do que em sintomáticos; a presença de IgG1, IgG2 e IgG3 em assintomáticos também mostrou correlação com certo grau de imunidade clínica protetora.

Apesar da imunidade humoral e celular desempenhar importante papel na proteção contra os parasitos da malária, é difícil obter uma proteção por longo tempo, mesmo com frequente exposição (GOOD et al, 1998). O hospedeiro humano também desenvolve anticorpos de bloqueio da transmissão que reconhecem moléculas expressas pelos gametócitos ou gametas extracelulares e que interferem no desenvolvimento dos parasitos no mosquito vetor, prevenindo a dispersão do parasito. Apesar deste tipo de imunidade não proteger o indivíduo infectado, contribui para a diminuição da transmissão (SNEWIN et al, 1995).

7. Infecção assintomática

Casos assintomáticos de malária são amplamente descritos: Oliveira et al (1995) relataram 20% de positividade pela gota espessa em garimpeiros de Peixoto de Azevedo, MT. Dentre os infectados, 70% eram assintomáticos e não desenvolveram sintomas nas 48 horas seguintes à coleta das amostras. Em estudo realizado em Rondônia (ALVES et al, 2002), mediante intervenção em populações ribeirinhas analisadas por gota espessa e PCR, foram detectadas infecções assintomáticas por *P. vivax* e *P. falciparum*. Os pacientes foram monitorados por dois meses. As infecções assintomáticas foram 4-5 vezes mais prevalentes que as sintomáticas: respectivamente 20% e 4,6% em Portuchuelo e 49,5% e 10% em Ji-Paraná. A descrição de casos assintomáticos em áreas de transmissão, independentemente do nível de endemicidade, representa um desafio para as estratégias de controle, tanto para a transmissão natural da doença, cujos programas se baseiam na detecção e tratamento de casos sintomáticos, como para os casos transfusionais ocorridos na Região Amazônica e na Extra-amazônica.

8. Infecções induzidas

Casos importados e induzidos por transfusão sanguínea ou por uso compartilhado de seringas também fazem parte da realidade dos

estados da Região Extra-amazônica. Dados compreendidos entre 1983 e 2006 mostram que, de 25.749 notificados no estado de São Paulo, 0,41% foram classificados como induzidos, seja pela transmissão por seringas contaminadas ou transfusão sanguínea (São Paulo, 2010a).

8.1. Acidentes hospitalares

A transmissão de malária em ambiente hospitalar no Brasil foi relatada por Kirchgatter et al (2002), quando um paciente atendido em unidade de saúde do estado de São Paulo foi infectado acidentalmente, provavelmente por meio de agulha ou luvas contaminadas, visto que permaneceu internado junto à paciente com malária importada da Região Amazônica brasileira. A genotipagem comprovou a identidade entre os dois isolados de *P. falciparum*. Outros casos de transmissão nosocomial foram descritos (ABULRAHI et al, 1997; CHEN et al, 1999).

8.2. Uso compartilhado de agulhas

A transmissão de malária por meio de agulhas contaminadas em usuários de drogas deu origem a dois focos importantes no estado de São Paulo, com a notificação de 12 casos na cidade de Presidente Prudente entre 1988 e 1989 (Lo et al, 1991) e 12 casos em Bauru, no ano de 1989 (BARATA et al, 1990). Todos os casos foram confirmados como *P.*

vivax pela gota espessa e os pacientes negaram deslocamentos por áreas com possibilidade de infecção. No foco de Presidente Prudente o exame para detecção de HIV foi positivo em cinco indivíduos.

8.3. Transplante

Receptores de transplante podem adquirir malária através do tecido enxertado, ou ainda reativar infecções latentes, decorrentes da intensa imunossupressão a que são submetidos. A malária é uma das principais doenças relacionadas a infecções induzidas por transplantes de medula, rim e fígado. Em indivíduos transplantados, especial atenção deve ser dada à febre prolongada, hepatoesplenomegalia, manifestações hematológicas e renais (BARSOUM, 2004). Relatos indicam principalmente infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*: de 29 casos em receptores de órgãos, *P. falciparum* foi responsável por 15 e *P. vivax* por oito casos, sendo o restante atribuído a *P. ovale*, *P. malariae* e infecções mistas (FISCHER et al, 1999). Estas ocorrências indicam a necessidade de investigar os antecedentes epidemiológicos do doador.

8.4. Via congênita

A malária congênita é uma condição rara, porém dados recentes indicam aumento da incidência em regiões endêmicas e não

endêmicas, variando de 0,3% a 33%, (SINGH et al, 2001). A infecção pode se dar pela transmissão de parasitos da mãe para o feto, durante a gestação ou no momento do parto. Relatos elaborados mediante análise de um período de 40 anos nos EUA mostraram 81 casos notificados, principalmente por *P. vivax* (LESKO et al, 2007). Os mecanismos implicados na transmissão congênita são a lesão mecânica no momento do parto e a febre alta da mãe, resultando numa placenta mais friável, com separação prematura (MUKHTAR et al, 2005). Recentemente foi relatado um caso de infecção por *P. vivax* no estado de São Paulo, com origem congênita, cuja mãe era proveniente de região endêmica, e assintomática no momento do parto (FERRARINI et al, 2009).

8.5. Transfusional

O primeiro caso de malária transmitida por transfusão sanguínea (TTS) foi relatado em 1911 (WOOLSEY, 1911), permanecendo no contexto mundial como uma das infecções TTS mais comuns (KITCHEN e CHIODINI, 2006). Os parasitos da malária podem sobreviver em células vermelhas estocadas a temperaturas entre 2°C e 6°C por até três semanas, sendo que o inóculo estimado nas transfusões é de um a 10 parasitos por unidade de sangue (HUTTON e SHUTE, 1939; GRANT et al, 1960; SEED et al, 2005).

O aumento de deslocamentos de indivíduos para diferentes regiões em viagens relacionadas a turismo e negócios, incluindo áreas com possibilidade de transmissão da malária, exige a atenção dos serviços de hemoterapia e de vigilância epidemiológica em áreas endêmicas e não endêmicas. Em bancos de sangue são utilizados questionários para identificar indivíduos com risco de transmitir malária, excluindo aqueles que relatem deslocamentos por áreas endêmicas, o que não evita transmissão transfusional, devido às falhas de informação. Além disso, há os casos de infecção assintomática e os semi-imunes (KITCHEN e CHIODINI, 2006), aliado ao escasso conhecimento sobre a malária em áreas sem transmissão ativa (SÁEZ-ALQUÉZAR et al, 1998). No Brasil, está em vigor a Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004 da ANVISA, D.O.U. de 24 de junho de 2004. O item “E.2.2 – Malária” determina realização de exame parasitológico-hematoscópico nas regiões endêmicas com transmissão ativa (alto risco, pelo Índice Parasitológico Anual – IPA).

Algumas tentativas para buscar agentes capazes de inativar patógenos transmitidos por transfusões podem ser citadas, como a violeta de genciana que poderia inativar formas vivas circulantes de *Trypanosoma cruzi* no sangue doado (NUSSENZWEIG et al, 1953). Porém, este composto não apresenta amplo espectro, além de ação deletéria sobre as plaquetas. A inativação de patógenos transfusionais deve ser segura para o receptor, ter atividade nas condições de temperatura e

pH em que os hemoderivados são mantidos e não interferir na fisiologia de plaquetas, hemácias e proteínas plasmáticas, condições difíceis de manter e de alto custo.

9. Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária classicamente é estabelecido através do encontro de parasitos no sangue periférico, sendo a determinação da espécie essencial para orientar o tipo de tratamento, o prognóstico e o acompanhamento do paciente.

Novas tecnologias estão disponíveis como alternativas à microscopia. Esses métodos incluem detecção de antígenos do parasito utilizando anticorpos monoclonais, microscopia de fluorescência, citometria de fluxo, análise automatizada de hemácias, concentração de hemácias por centrifugação (*quantitative buffy coat*), coloração com laranja de acridina, detecção de anticorpos por sorologia, amplificação molecular e espectrometria de massa por dessorção a laser. Também foi avaliada a microscopia remota através da telemedicina, porém a qualidade da imagem e infraestrutura necessária são obstáculos. Esses métodos apresentam várias vantagens e desvantagens, mas acima de tudo são limitados por necessitarem de equipamento e mão de obra especializada, custo alto, tempo de

processamento, suporte contínuo, disponibilidade de reagentes, entre outros (Murray et al, 2008).

9.1. Método de referência - gota espessa

O exame da gota espessa corada por Giemsa é o método de referência para o diagnóstico de malária (Ross, 1903), sendo utilizado nos programas de controle para determinar a ocorrência da infecção e mensurar os efeitos da terapêutica administrada (WHO, 1988). A detecção direta do parasito através da gota espessa permite a identificação da espécie, a quantificação da parasitemia e a distribuição das formas. Porém, sua sensibilidade depende da experiência do microscopista, podendo chegar entre cinco e 50 parasitos por microlitro, embora o mais comum seja 500 parasitos por microlitro (MILNE et al, 1994, MOODY, 2002). O tempo necessário para ler uma lâmina negativa é de 20 minutos o que, juntamente com a baixa sensibilidade, torna a técnica impraticável para o processamento de grande número de amostras. Mesmo em centros de referência qualificados, a gota espessa pode ser incapaz de diferenciar entre espécies de *Plasmodium* cuja morfologia é bastante similar, como é o caso de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (DI SANTI et al, 2004).

9.2. Métodos de detecção de antígenos

Os testes rápidos (*Rapid Diagnostic Tests* - RDTs) surgiram como uma alternativa para a detecção de antígenos do parasito (ÁVILA et al, 2002); utilizam técnica de imunocromatografia e foram introduzidos no início dos anos 90. Podem ser realizados por profissionais com treinamento mínimo e os resultados são obtidos entre 10 e 20 minutos. Porém seu alto custo e baixa sensibilidade restringem sua aplicação (MURRAY et al, 2003; BELIZÁRIO et al, 2005; SEED et al, 2005). Também foram desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos para detecção de antígenos em amostras de sangue total ou plasma, porém com sensibilidade entre 100 e 1.000 parasitos por microlitro, inferior à da gota espessa quando esta é realizada por microscopistas experientes (HUONG et al, 2002).

Muitos destes testes são facilmente introduzidos e retirados de mercado, sofrem frequentes modificações por fabricantes que não possuem um padrão consistente de qualidade, o que leva a variações na estabilidade do produto. A OMS recomenda um padrão mínimo de 95% de sensibilidade para *P. falciparum* com 100 parasitos/ μ L e especificidade de 95% (BELL et al, 2006; WHO, 2006). Nesses testes a amostra clínica migra por capilaridade através da membrana de nitrocelulose (BELL et al, 2006; WHO, 2000). Tem-se como alvo um antígeno do parasito e dois grupos de anticorpos (um de captura e outro de

detecção do antígeno). Os anticorpos usados podem ser monoclonais (alta especificidade e pouca sensibilidade) ou policlonais (alta sensibilidade e pouca especificidade). Ainda, a fonte de antígenos usada para induzir os anticorpos dos testes (proteína purificada, proteína recombinante ou peptídeos) pode apresentar diferença significativa no desempenho de cada teste. Mesmo com anticorpos monoclonais direcionados contra o mesmo antígeno, se o teste tem como alvo diferentes epítomos, pode exibir diferenças na sensibilidade e especificidade (LEE et al, 2006a). Os anticorpos fixos na membrana de nitrocelulose ligam-se aos antígenos presentes na amostra adicionada ao teste e os imobilizam em regiões específicas; um segundo grupo de anticorpos que são conjugados a um indicador, geralmente partículas de ouro, revela a reação positiva. O complexo de anticorpo indicador fixa-se ao antígeno do parasito capturado pelo primeiro grupo de anticorpos, produzindo uma linha visível se o alvo estiver presente na amostra clínica (MURRAY et al, 2008). Os antígenos do parasito usados como alvo no diagnóstico são espécie-específicos ou gênero-específicos. Os monoclonais específicos para *P. falciparum* detectam a *histidine-rich protein-2* (HRP-2) ou a lactato desidrogenase (*pfLDH*). A lactato desidrogenase de *Plasmodium* (*pLDH*) e a aldolase são alvos conservados entre todas as espécies de malária humana (BELIZÁRIO et al, 2005; SEED et al, 2005; MURRAY et al, 2009). A HRP-2 é uma proteína hidrossolúvel e específica para *P. falciparum*, localizada na superfície

da membrana do eritrócito infectado. Mutantes podem não ser reconhecidos pelo anticorpo monoclonal e resultar em testes falso-negativos (LEE et al, 2006a; BAKER et al, 2005). A pLDH é a enzima final na via glicolítica do parasito. Anticorpos monoclonais contra pLDH podem detectar as 4 espécies de malária humana ou especificamente diferenciar *P. falciparum* de malária não falcípara (MAKLER et al, 1998). Aldolase, outra enzima chave na via glicolítica, também é conservada entre as espécies de malária humana e pode ser usada como antígeno panmalárico (LEE et al, 2006b; GENRICH et al, 2007). Outros antígenos estão sendo analisados como alvo de futuros testes, porém aqueles específicos de *P. ovale* e *P. malariae* não são muito abordados (MURRAY et al, 2009).

9.3. Métodos Moleculares

9.3.1. Genes ribossomais aplicados ao diagnóstico de malária

As ferramentas moleculares surgiram como consequência de uma busca por metodologia mais sensível e específica para o diagnóstico da malária. Em 1989 Waters e McCutchan desenvolveram quatro oligonucleotídeos espécie-específicos para genes da subunidade menor do RNA ribossomal, a 18S (ssrRNA), que foram utilizados em ensaios de hibridização, como sondas capazes de detectar todas as espécies de *Plasmodium* de humanos. Embora

bastante específica esta metodologia apresentava baixa sensibilidade, além de utilizar material radioativo, exigindo condições laboratoriais especiais (BARKER, 1990; PONGLIKITMONGKOL et al, 1994).

Os ensaios de PCR utilizando este alvo baseiam-se na amplificação do gene da *ssrRNA* de *Plasmodium*, que apresentam diferenças estruturais nos ribossomos nas diferentes fases do ciclo evolutivo, sendo que os transcritos do gene tipo A são dominantes na fase sanguínea assexuada e nos gametócitos na fase sexuada inicial. Com a formação do zigoto no mosquito vetor, o tipo A é substituído pelo rRNA do tipo O que está associado aos oocistos, enquanto que os genes do tipo S são transcritos nos esporozoítos, substituídos então pelo genes do tipo A quando os merozoítos se diferenciam em esquizontes maduros no estágio hepático. (LI et al, 1991; MCCUTCHAN et al, 1995; LI et al, 1997).

9.3.2. PCR convencional

Com base na descrição dos genes da *ssrRNA* de *Plasmodium*, Snounou et al (1993) desenvolveram metodologia de *nested* PCR, com alta sensibilidade e especificidade, para determinação das quatro espécies de *Plasmodium* que parasitam o homem. A reação consiste de duas etapas aninhadas: a primeira amplifica um fragmento de 1,2 Kb utilizando *primers* gênero-específicos e a segunda utiliza pares de

primers espécie-específicos, com uma reação individual para cada espécie. Os fragmentos resultantes desta segunda amplificação correspondem a 205bp para *P. falciparum*, 120bp para *P. vivax*, 144bp para *P. malariae* e 800bp para *P. ovale*, permitindo a detecção de 1 parasito por microlitro.

Em 1997 Kimura et al desenvolveram uma metodologia *seminested*, também baseada na amplificação de genes da *ssrRNA* de *Plasmodium* para determinação das quatro espécies causadoras de malária em humanos. Na primeira amplificação são utilizados *primers* gênero-específicos e na segunda amplificação são realizadas reações para cada espécie, com fragmentos amplificados de 110bp.

Outra metodologia baseada nos genes *ssrRNA* de *Plasmodium* caracteriza-se com uma PCR *seminested* em *multiplex* (RUBIO et al, 1999). A primeira amplificação emprega três *primers*: UNR (amplificação universal de *Plasmodium* e vertebrados), HUF (universal de mamíferos) e outro PLF (amplificação universal de *Plasmodium*); gerando um fragmento de 231bp para vertebrados e mamíferos e 783-821bp para *Plasmodium*. A segunda reação (*seminested multiplex*) emprega *primers* da primeira reação e *primers* espécie-específicos para cada espécie em uma mesma reação, gerando produtos de 269bp para *P. malariae*, 395bp para *P. falciparum*, 436bp *P. ovale* e 499bp para *P. vivax*.

As três metodologias apresentadas acima necessitam de eletroforese em gel de agarose e brometo de etídeo para visualização dos fragmentos amplificados, submetidos à luz UV.

A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de vantagens no diagnóstico de malária mista (BARKER et al, 1994). Sua utilização tem sido indicada em áreas endêmicas, para a detecção de assintomáticos e triagem de doadores de sangue (KITCHEN e CHIODINI, 2006). Fugikaha et al (2007) realizaram uma triagem de doadores de sangue, utilizando a técnica de *seminested* PCR, em quatro bancos de sangue de áreas distintas da Região Amazônica brasileira, obtendo uma taxa de positividade entre 1 a 3%, com uma média de 2,3%.

9.3.3. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada para detecção simultânea das espécies de *Plasmodium*. É uma técnica rápida, automatizada, acurada e eficiente, para aplicação em grandes quantidades de amostras. Estudos utilizando PCR em tempo real tendo como referência a gota espessa mostraram que a PCR alcançou alta sensibilidade e especificidade (SWAN et al, 2005). Apresenta as seguintes vantagens sobre a *nested* PCR: dispensa trabalho intenso e profissionais altamente treinados, pois envolve uma única etapa de processamento, sendo que a *nested* PCR exige no

mínimo duas; é realizada em sistemas fechados, o que diminui a ocorrência de contaminação; os resultados são obtidos em cerca de quatro vezes menos tempo que a *nested* PCR; a técnica permite simultaneamente a detecção e quantificação dos parasitos (PERANDIN et al, 2004). Farcas et al (2004) mostraram correlação entre as parasitemias obtidas na gota espessa e o número de cópias gênicas amplificadas por PCR em tempo real. Além disso, a técnica dispensa a manipulação de reagentes tóxicos e realização de eletroforese em gel de agarose.

Vários estudos tendo a gota espessa como referência mostraram que a detecção molecular apresenta maior sensibilidade, o que aponta para a pertinência da utilização de PCR. Em atividades de pesquisa e em centros de referência a discussão não é se a PCR deve ser adotada como padrão-ouro, mas qual método deve ser recomendado. Tendo como método de referência a gota espessa, um estudo comparativo entre a *nested* PCR, *multiplex* PCR e PCR em tempo real, mostrou que a última apresentou melhor desempenho em relação à sensibilidade e especificidade (BOONMA et al, 2007).

9.4. Métodos de detecção de anticorpos

A detecção de anticorpos específicos é um indicador de infecção, embora não indique necessariamente que o indivíduo esteja

parasitado. Por outro lado, um teste sorológico negativo não exclui a infecção, pois os anticorpos nem sempre são detectados no início da malária. Indivíduos que residiram em áreas endêmicas, e contraíram a doença repetidas vezes, possuem níveis de anticorpos elevados, que podem perdurar por longos períodos de tempo mesmo após a cura. Dentre as metodologias disponíveis, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é de difícil aplicação em situações que envolvam grande número de amostras; o teste ELISA, apesar de sensível e adequado para processamento de grande número de exames, carece de kits comerciais padronizados que possam superar a dificuldade de obtenção de antígenos do parasito. Portanto, o uso de testes rápidos capazes de detectar anticorpos pode ser uma alternativa para o processamento de grande número de amostras, como é a demanda em serviços de hemoterapia e em estudos epidemiológicos em áreas com diferentes endemicidades.

9.4.1. RIFI

Esta técnica consiste na detecção de anticorpos reagentes após contato com antígenos do parasito, revelados com o uso de substâncias fluorescentes, como a fluoresceína, e leitura em microscópio de fluorescência com luz UV (SULZER et al, 1969). A prevalência de anticorpos determinada pela RIFI é usada para estimar

a endemicidade da malária, mas seu uso é limitado por depender de cultura de parasitos, microscópios caros de fluorescência e da leitura subjetiva da lâmina (CORRAN et al, 2007).

9.4.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Desde o seu desenvolvimento (ENGVALL e PERLMANN, 1971; VAN WEEMEN e SCHUURS, 1971) o teste ELISA tem sido amplamente utilizado para medir títulos de anticorpos monoclonais ou policlonais, sendo empregado em estudos epidemiológicos (FERREIRA et al, 1998; LEORATTI et al, 2004), na medição de títulos de anticorpos para avaliar imunogenicidade de vacinas (MUERHOFF et al, 2010), e na triagem de doadores de sangue (CONTRERAS et al, 1999).

Entre os antígenos recombinantes utilizados na pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium*, destaca-se a proteína-1 de superfície do merozoíto (MSP-1), que está presente em todas as espécies de *Plasmodium* (HOLDER, 1988; HIRUNPETCHARAT et al, 1997) e é uma das candidatas para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas eritrocitárias (GOOD, 2005). Vários estudos foram realizados empregando a MSP-1₁₉ de *P. vivax* (PvMSP-1₁₉) e de *P. falciparum* (PfMSP-1₁₉) demonstrando que é a parte mais imunogênica da molécula e que os anticorpos específicos estão associados com episódios recentes de malária (SOARES et al, 1999; MORAIS et al, 2005; AKPOGHENETA et al, 2008).

Embora apresente boa sensibilidade e especificidade (RODRIGUES et al, 2003; KUDÓ, 2006), sendo recomendada também como método de triagem para malária em áreas não endêmicas (KITCHEN et al, 2005; KITCHEN e CHIODINI, 2006) ainda não há disponibilidade de kits comerciais validados com antígenos recombinantes para detecção de todas as espécies de *Plasmodium*.

9.4.3. Dot ELISA

O teste Dot-ELISA ou Imuno-Dot, foi desenvolvido por Hawkes et al (1982). É uma técnica rápida, específica, sensível e simples, que utiliza membrana de nitrocelulose como matriz, com pouca quantidade de antígenos e sem exigência de equipamentos de alto custo (KURSTAK, 1986). Detecta tanto anticorpos como antígenos, e tem sido utilizada em imunodiagnóstico de várias infecções e triagem de doadores de sangue (COELHO et al, 2007).

9.4.4. Testes rápidos imunocromatográficos

Testes rápidos que também utilizam o princípio da imunocromatografia para a detecção de anticorpos têm sido desenvolvidos, podendo ser úteis em estudos soroepidemiológicos (PARK et al, 2003). O SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.) é um teste rápido para detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos contra *P. falciparum* e *P. vivax* com antígenos de captura

recombinantes MSP para as duas espécies de parasitos humanos em sangue total, soro ou plasma. Em estudo realizado com amostras de soro de pacientes com gota espessa ou PCR positiva, este teste apresentou sensibilidade de 94% (COSTA-NASCIMENTO et al, 2007). Testes sorológicos apresentam boa sensibilidade em indivíduos imunes, que são os doadores de risco, visto que podem estar pauciparasitados e assintomáticos (KITCHEN et al, 2005). Em conjunto com métodos moleculares podem ser indicados para estudos epidemiológicos que processem grande amostragem.

9.5. Processamento de amostras em pool

O teste de referência para o diagnóstico de malária permanece sendo a gota espessa, porém é consenso que é preciso adotar alternativas moleculares em situações específicas, seja por necessidade de técnicas mais sensíveis, seja pela adoção de metodologias que possam ser aplicadas no processamento de grande número de amostras, como os estudos clínicos, epidemiológicos ou a triagem de doadores em bancos de sangue. O processamento de amostras como uma plataforma em pools foi realizado por Bharti et al (2009), onde dois grupos de soros, com 1% e 5% de prevalência de malária, foram testados por PCR, com detecção da infecção nas amostras das duas matrizes. Estes autores concluíram que estudos de campo eram

necessários com amostras clínicas de sangue para validar esta plataforma em *pool*.

Neste estudo, nossa proposta de analisar comparativamente técnicas moleculares (PCR em tempo real e *nested* PCR) com um teste rápido específico para detecção de anticorpos, visando à constituição de uma plataforma de diagnóstico para malária, justifica-se pela possibilidade de uso destes ensaios em grande número de amostras agrupadas em *pools*. A partir de padronização com amostras de referência e clínicas, com diagnóstico de malária realizado pelo método padrão ouro, pretendemos estabelecer alternativa diagnóstica exequível e reproduzível para uso em larga escala. O agrupamento das amostras em *pools* pode reduzir o tempo e o custo do processamento. A aplicabilidade deste estudo está associada a diferentes aspectos relacionados ao controle da malária: em áreas endêmicas estudos epidemiológicos exigem processamento de grande amostragem, com ferramentas rápidas e eficientes. Por outro lado, em áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade, as atividades de prevenção e vigilância pressupõem constante monitoramento dos focos autóctones, onde são descritos casos assintomáticos e as coletas de sangue de populações residentes envolvem grande número de amostras. Além disso, a problemática envolvendo triagem de doadores requer metodologia capaz de contemplar a densa rotina dos serviços de hemoterapia.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Optimizar o diagnóstico de malária em larga escala através da avaliação de uma plataforma de teste molecular e sorológico.

Objetivos Específicos:

1. Avaliar o desempenho da PCR em tempo real como teste para detecção de *Plasmodium* humano em amostras de sangue processadas em *pool*.
2. Avaliar o desempenho da *nested* PCR como teste para determinação de espécies de *Plasmodium* humano em amostras de sangue processadas em *pool*.
3. Avaliar o teste SD Bioline® para detecção de anticorpos em amostras de soro processadas em *pool* de pacientes com malária.
4. Comparar o desempenho dos três testes com o método de referência para diagnóstico de malária, a gota espessa.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Origem das amostras

Foram selecionadas 50 amostras de sangue positivas para *Plasmodium* pela gota espessa, de acordo com a prevalência das espécies no Brasil (*P. vivax* 75%, *P. falciparum* 22% e *P. malariae* 3%), e respectivamente foram coletadas 36 amostras de *P. vivax*, 11 de *P. falciparum* e três de *P. malariae*, com diferentes parasitemias; uma das amostras diagnosticadas pela gota espessa como *P. vivax* foi posteriormente confirmada por *nested* PCR como *P. ovale* (Tabela 3). As amostras foram coletadas de pacientes atendidos no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN mediante consentimento informado do paciente (Anexo I), para a realização de pesquisas afins, sendo coletadas em tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) com posterior separação de plasma e armazenadas a -20°C para os procedimentos posteriores.

Adicionalmente foram coletadas também 48 amostras de sangue negativas para *Plasmodium* pela gota espessa, de indivíduos sem deslocamento para área endêmica e sem relato de malária anterior. Destas, quatro são amostras com outras doenças: toxoplasmose, leishmaniose, hepatite B e doença de Chagas. Uma alíquota de cada uma das amostras de sangue e plasma foi estocada para eventual processamento.

Tabela 3. Amostras positivas para *Plasmodium* selecionadas para a montagem dos pools, segundo prevalência das espécies no Brasil.

Nº	Ficha SUCEN	Gota Espessa		Número malárias anteriores/ espécie	LPI	Observações
		P. MS	P. mm ³			
01	18/08	Pv ++/+	15120	primoinfectado	RO	Tratado com 6 dias de sintomas
02	19/08	Pv +++/++	33960	primoinfectado	AC	
03	17/08	Pv ++/++	2880	8 / Pf	Angola	
04	21/08	Pv ++/2	6480	1/ignorada	Angola	
05	1027/86	Pv +++/+	GOI	primoinfectado	MT	Tratado com 6 dias de sintomas
06	1110/86	Pv +++/+	GOI	>10/Pv e Pf	PA	Pf em 02/86
07	988/86	Pv ++/+	GOI	primoinfectado	MT	2 dias de sintoma
08	131/87	Pv +++/++	GOI	>3/ ignorada	RO	Tratado c/ 1 dia de sintomas.
09	179/87	Pv ++/+	GOI			
10	385/87	Pv ++/+	GOI	primoinfectado	SP-Pedro de Toledo	
11	391/87	Pv +++/++	GOI	3/ Pv	RO	Tratado c/ 2 dias de sintomas.
12	398/87	Pv +++/++	GOI	7/Pv	RO	
13	474/87	Pv ++	GOI	6 /Pf	RO	
14	58/04	Pm +++/+	518000	primoinfectado	Transfusional	Transfusional
15	95/07	Pm	120	ignorado/ Pv	Juquitiba - SP	Candidato a doação de sangue
16	05/09	Pm	120	primoinfectado	SP- Juquiá	Doador de sangue
17	60/04	Pf 7200/2039	9240	Associada	RO	
18	22/08	Pv 5v/2vg	240	1/ Pv	SP- S.Bento Sapucaí	Recaída
19	23/08	Pv ++/+	12960	primoinfectado	RO	Tratado 14 dias após sintomas
20	904/87	Pf 5879	5879	primoinfectado	Amazônia Legal	Tratado com 4 dias de sintomas
21	07/09	Pf 4.799	4799	ignorada	Angola	
22	11/09	Pf 360/840g	1200	2/ ignorada	Nigéria	
23	723/89	Pf 17160	17160	1 / ignorada	PA	
24	530/90	Pf 32400	32400	2/ ignorada	MT	Tratado com 1 dia de sintomas
25	20/91	Pf 11400	11400	3/ Pv	MT	
26	159/92	Pf 56880	56880	várias/ Pv	RO	
27	58/99	Pf 65000	65000	1/ ignorada	Angola	
28	32/04	Pf 28080	28080	primoinfectado	AM	Tratado com 4 dias de sintomas
29	25/08	Pv +/2/+	1920	primoinfectado	SP-Miracatu	
30	26/08	Pv +++	16800	primoinfectado	AM	Tratado com 8 dias de sintomas
31	30/08	Pv ++/+	15120	ignorada	RR	
32	30/05	Pv < +/2	120	primoinfectado	SP - Juquitiba	
33	137/06	Pv < +/2	120		SP - Juquitiba	
34	32/08	Pv ++	16320	ignorada	Suriname	
35	33/08	Pv +++/++	31920			
36	34/08	Pf 2640/3480fg	6120	ignorada	Guiné Bissau	
37	35/08	Pv ++/+	14760	1/ Pv	RO	Tratado com 4 dias de sintomas
38	40/08	Pv ++/1	1080	primoinfectado	RO	Internado com 1 dia de sintomas
39	HER	Pv +/2+/1	960			
40	04/09	Pv ++/2	8760	primoinfectado	PA	Tratado com 4 dias de sintomas
41	06/09	Pv ++/2	1920		RO	
42	09/09	Pv +++/++	16960	primoinfectado	RO	tratado com 3 dias de sintomas
43	10/09	Pv +++/++	41760	primoinfectado	RO	
44	1RO	Pv ++	GOI		RO	
45	2RO	Pv +/2	GOI		RO	
46	3RO	Pv ++	GOI		RO	
47	4RO	Pv ++	GOI		RO	
48	5RO	Pv	GOI		RO	
49	6RO	Pv +	GOI		RO	
50	7RO	Pv +	GOI		RO	

P. MS: Parasitemia padrão Ministério da Saúde
P. mm³: Parasitemia por milímetro cúbico
LPI: Local Provável da Infecção
GOI: Gota Espessa Indisponível

Pv: *Plasmodium vivax*
Pf: *Plasmodium falciparum*
Pm: *Plasmodium malariae*

2. Montagem dos pools

Do painel de 50 amostras positivas e 44 negativas pela gota espessa, foram selecionadas amostras com diferentes parasitemias e espécies de *Plasmodium* para formar pools de 10 amostras (Figura 5), sendo assim constituídos: nove amostras negativas com uma positiva ou oito amostras negativas com duas positivas, ou ainda sete amostras negativas com três positivas com diferentes parasitemias e espécies de *Plasmodium*. Também foram confeccionados pools somente com as amostras negativas para usar como controle negativo. Os pools continham 3mL de papa de hemácias com 300μL de cada amostra.

Figura 5. Montagem de pools com 10 amostras de sangue, incluindo positivas para *Plasmodium* e negativas.

3. Extração de DNA

Cada pool foi submetido à lise com saponina 1%, com duas lavagens subsequentes com água ultrapura, obtendo-se um pellet

concentrado. Desse *pellet* foram retirados 200µL para extração do DNA genômico com QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído em volume final de 50µL e estocado a -20°C para os procedimentos posteriores.

Algumas amostras tiveram alíquotas lisadas com saponina e em seguida extração com Qiagen DNA Blood Mini Kit, e suas duplicatas foram submetidas à extração diretamente com o kit, sem passar pela lise com saponina para averiguar qual metodologia era mais acurada quanto ao rendimento de DNA.

Após extração o DNA foi submetido a um quantificador automático da Eppendorf® (BioPhotometer) com leitura da densidade óptica a 260nm (DO_{260}), para avaliar a quantidade de DNA, e a 280nm (DO_{280}) para estimar a contaminação com proteínas. Todas as amostras obtiveram leitura com quociente de DO_{260} e DO_{280} entre 1,5 e 2, considerados com pureza adequada para análise.

4. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real para amplificação gênero-específica descrita por Gama et al (2007) foi submetida a modificações quanto à redução do volume de reagentes e modificação no número de ciclos, visando obter protocolo com menor custo e maior sensibilidade. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

M60 e M61 assim como da sonda M62 (Tabela 4), foram selecionadas tendo como alvo o gene que codifica a subunidade *ssrRNA* de *Plasmodium*.

A reação foi preparada com 2,5µL de DNA genômico, 12,5µL de *TaqMan*® Universal PCR Master Mix 2x, 500nM de cada *primer* gênero-específico M60 e M61, e 300nM da sonda M62 marcada FAM™ e TAMRA™. Amplificação e detecção foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 15 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram ensaiadas em duplicata no ABI PRISM 7300 da (Applied Biosystems).

Tabela 4. Sequências dos *primers* gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de *Plasmodium* e sonda FAM-TAMRA (GAMA et al, 2007) utilizados para realização de PCR em tempo real nas amostras positivas, negativas e nos pools.

Primers e Sonda	Sequência (5' – 3')
M60	ACA TGG CTA TGA CGG GTA ACG
M61	TGC CTT CCT TAG ATG TGG TAG CTA
M62	FAM™ - TCA GGC TCC CTC TCC GGA ATC GA - TAMRA

4.1. Sensibilidade analítica do controle positivo

A sensibilidade do ensaio foi avaliada utilizando-se amostras de cultura de *P. falciparum* (gentilmente fornecidas pela Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz, Fiocruz, RJ) diluídas seriadamente em sangue humano total não infectado (razão 10), e amostras clínicas de *P. vivax* e

P. malariae cujas parasitemias foram calculadas por mm³ de sangue, diluídas seriadamente até a obtenção de 1parasito/μL. As amostras foram ensaiadas em triplicata, e depois de confirmada a reprodutibilidade, foram escolhidas as amostras com detecção de 1parasito/μL para utilização como controle positivo.

4.2. Especificidade

Para avaliar a especificidade foram utilizadas amostras de DNA de outros parasitos e vírus: *Toxoplasma sp*, *Leishmania sp*, *Trypanosoma sp* e vírus da Hepatite B, em duplicata.

4.3. Controle negativo e controle interno

Como controle negativo nas reações de PCR em tempo real utilizou-se água ultra pura ou DNA extraído dos *pools* negativos, que foram ensaiados previamente por PCR em tempo real para esta finalidade. Adicionalmente, um controle interno foi incluso a fim de testar a qualidade do DNA, mediante amplificação de uma sequência do gene humano GAPDH marcada com Vic e MGB (Applied Biosystems). Posteriormente foi adotado protocolo para amplificação do gene da β-globina por PCR convencional, utilizando os *primers* GH-20 (59-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC) e PCO4 (59-CAACTTCATC CACGTCACC), produzindo um fragmento de 260bp. As condições da

reação foram 95°C por 5 min., e então 94°C por 1 min., 55°C por 1 min., 72°C por 1 min. em 40 ciclos (MELANA et al, 2001).

5. Nested PCR

Após padronização dos ensaios de PCR em tempo real, as amostras individuais foram ensaiadas com protocolo convencional de *Nested* PCR (SNOUNOU et al, 1993), usando genes de *ssrRNA* como alvo.

A primeira reação empregou *primers* gênero-específicos rPLU5 e rPLU6 que amplificam um fragmento de 1.2Kb, e a segunda reação (*nested*), *primers* espécie-específicos para cada espécie (Tabela 5).

A reação foi preparada com 25µL em cada tubo, sob as seguintes condições: 250nM de cada *primer*, 125µM dNTPs, 2mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris pH 8,3, 0,4 U de Taq polimerase e 1µL de DNA genômico. Em todos os ensaios de PCR foram incluídos controles positivos (DNA genômico de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) e negativos (água ultrapura).

As condições da primeira reação da PCR foram: 1 ciclo de denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e então 24 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Na 2ª reação foram realizados 30 ciclos de amplificação, nas mesmas condições.

Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (0,089M Trizma Base, 0,089M Ácido Bórico, 0,02M EDTA), e visualizados com brometo de etídio ou Blue Green (LGC Bio) através de luz UV. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100bp.

Tabela 5. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação por *nested* PCR, de fragmentos de genes da *ssrRNA* de *Plasmodium*. Os *primers* rPLU5 e rPLU6 são gênero-específicos e os *primers* rVIV1 e rVIV2, rMAL1 e rMAL2, rFAL1 e rFAL2, rOVA1 e rOVA2 (ou rOVA1v e rOVA2v) são espécie-específicos para *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* e *P. ovale* respectivamente. Gene *ssrRNA* esquematizado abaixo.

Primers	Sequência (5' – 3')
rPLU5	CCTGTTGTGCCTTAAACTTC
rPLU6	TTAAATTGTTGCAGTTAAACG
rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC
rVIV2	ACTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA
rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTAAGAATAACCGC
rMAL2	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA
rFAL1	TTAACTGGTTGGGAAAACCAAATATATT
rFAL2	ACACAATGAACCTAATCATGACTACCCGTC
rOVA1	ATCTCTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA
rOVA2	GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG
rOVA1v	ATCTCCTTACTTTTGTACTGGAGA
rOVA2v	GGAAAAGGACACTATAATGTATCCTAATA

6. Detecção de anticorpos

Todas as amostras de soro positivas para malária pela gota espessa bem como um painel de 10 amostras negativas, foram submetidas individualmente ao teste SD Bioline Malaria Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.). O teste foi realizado mediante adição de 10µL de soro em membrana de nitrocelulose com antígenos de captura recombinantes de *P. falciparum* (MSP) na banda teste em uma região, e com antígenos de captura recombinantes de *P. vivax* (MSP) na segunda banda teste em outra região da membrana. Foram adicionadas de três a cinco gotas de diluente e aguardado o tempo mínimo de 5 minutos e não superior a 20 minutos para visualização das bandas. A linha controle foi revelada em todos os ensaios, indicando que o teste foi realizado adequadamente. O teste também foi realizado com pools contendo amostras positivas e negativas.

7. Aspectos éticos da pesquisa

As amostras de sangue pertencentes ao Banco de Cepas do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN originaram-se de amostras de sangue de pacientes deste Laboratório e foram colhidas mediante consentimento informado do paciente, para a realização de pesquisas afins. Este procedimento cumpre as determinações da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), segundo a qual nenhuma objeção deve ser feita à utilização de material biológico estocado, originalmente colhido no contexto de pesquisas afins com o atual projeto, desde que garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originariamente envolvidos e a conservação e utilização eticamente corretas do material, bem como das informações obtidas a partir dele.

Todas as amostras de sangue coletadas especificamente para este estudo obedeceram aos critérios estabelecidos pela resolução número 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, mediante termo de consentimento informado (ANEXOS I e II).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

8. Análise estatística

Para os cálculos de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5.01. O mesmo *software* foi utilizado para o cálculo do desempenho comparativo entre os ensaios moleculares e sorológicos aplicando-se o teste χ^2 ; para o cálculo do desempenho comparativo entre dois testes (PCR em tempo real e *nested* PCR, PCR em tempo real

e SD Bioline, *nested* PCR e SD Bioline) foi aplicado o teste exato de Fisher. A concordância foi avaliada com índice Kappa (IC 95%), método 1 de Cohen (1960), disponível no sítio <http://faculty.vassar.edu/lowry/kappa.html>. Os níveis de significância dos testes foram fixados assumindo um erro tipo 1 de 5% ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS

1. Padronização dos controles positivo e negativo

1.1. Padronização do controle positivo pelas técnicas de PCR em tempo real e *nested* PCR

As amostras de cultura de *P. falciparum* diluídas seriadamente a razão 10 tinham parasitemia inicial de 3.600 parasitos/mm³ e final de 0,36 parasitos/mm³. A PCR em tempo real foi capaz de amplificar todas as amostras, sendo a de menor diluição (3.600 parasitos/mm³) detectada com *Cycle Threshold* (Ct) de 21.67 e a maior diluição (0,36 parasitos/mm³) com Ct de 34.22 (Figura 6). O limiar de detecção para ser utilizado como controle positivo no estudo foi definido pelo Ct da amostra contendo 1 parasito/μL. Esta amostra apresentou reprodutibilidade em todos os ensaios, com variação mínima nos Cts. A PCR convencional conseguiu amplificação somente até a diluição de 3,6 parasitos/mm³ (Figura 7). Para efeito de ponto de corte entre amostras positivas e negativas foi considerada a média dos Cts do controle de todos os ensaios, mais 2,00 Desvio Padrão, resultando num *cut-off* de 36,88.

Amostras clínicas de *P. vivax* e *P. malariae* diagnosticadas pela microscopia com 60 parasitos/mm³, também foram diluídas para 6 e 1 parasito/mm³. Uma alíquota foi lisada com saponina antes de usar o kit de extração e outra alíquota foi submetida diretamente ao kit de extração. Houve amplificação proporcional entre amostras lisadas com

saponina e diretamente com o kit de extração no ensaio de PCR em tempo real (Figura 8); já com as mesmas amostras ensaiadas com PCR convencional, houve amplificação em somente duas amostras de *P. malariae* com 6 parasitos/mm³ na amostra de pré-lise com saponina e diretamente com o kit (Figura 9).

Figura 6. PCR em tempo real com as diluições seriadas de amostras de *P. falciparum* de cultura, em duplicata: diluições de 3.600 parasitos/mm³ a 0,36 parasito/mm³ e Cycle Threshold (Ct) de 21,7 a 34,3, respectivamente (A). Curva mostrando o log da quantidade inicial de DNA (eixo-x) e Ct (eixo-y), com um coeficiente de determinação (R²) de 0,99 e -3,2 de inclinação (B).

Figura 7. Nested PCR realizado com as diluições seriadas de amostras de *P. falciparum* de cultura, em duplicata: diluições de 3.600 parasitos/mm³ a 0,36 parasito/mm³.

Figura 8. PCR em tempo real de amostras de *P. malariae* e *P. vivax* lisadas com e sem saponina e diluídas para 6 e 1 parasito/mm³, controle positivo amostras clínicas de *P. falciparum* (Ct 22) e *P. malariae* (Ct 19).

Figura 9. Nested PCR de amostras de *P. malariae* e *P. vivax* lisadas com (A e C) e sem (B e D) saponina e diluídas para 6 (A e B) e 1 (C e D) parasito/mm³.

1.2. Padronização do controle negativo

Todas as amostras negativas incluindo as amostras positivas para outras doenças foram testadas por PCR em tempo real e resultaram negativas (Figura 10). Oito amostras que apresentaram Ct acima de 38 (consideradas negativas) foram testadas por *nested* PCR juntamente com as quatro amostras positivas para outras patologias e em nenhuma delas houve amplificação, confirmando o resultado da PCR em tempo real. Das 44 amostras negativas para malária pela gota espessa, foi calculada uma amostragem em Excel 2007 na função ALEATÓRIO, utilizando um algoritmo de geração de 10 números randomizados para aplicação do teste imunocromatográfico SD Bioline. Este ensaio também resultou negativo.

Figura 10. PCR em tempo real realizado com amostras negativas e controle positivo com 1 parasito/mm³ (▲).

2. Controle interno

Para testar a qualidade do DNA analisou-se o desempenho de dois controles internos: o gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [*Homo sapiens*]) e β -globina [*Homo sapiens*]. O GAPDH foi inicialmente proposto visto que poderia ser inserido na mesma reação da PCR em tempo real utilizada na detecção de *Plasmodium*. Após vários testes seguindo o protocolo do fabricante (Applied Biosystems), concluiu-se que a utilização do GAPDH não seria a melhor opção para este estudo, visto que a reação de amplificação em *duplex* aumentou o Ct e poderia prejudicar a detecção de baixas parasitemias (Tabela 6 e Figura 11).

Tabela 6. PCR em tempo real realizado em triplicata com amostras de *P. falciparum* de cultura em diluições seriadas, com e sem GAPDH.

Well	Amostra	Parasitemia	Ct		Média		diferença	diferença %
			Com GAPDH 10/11/2009	Sem GAPDH 22/10/2009	Com GAPDH 10/11/2009	Sem GAPDH 22/10/2009		
A1	PFA	3.200p/μL	24,22	21,28	24,36	21,32	-3,04	14,24
B1	PFA		24,26	21,37				
C1	PFA		24,6	21,32				
D1	PFB	320p/μL	26,84	23,76	26,88	23,82	-3,06	12,85
E1	PFB		26,87	23,8				
F1	PFB		26,92	23,89				
A2	PFC	36p/μL	30,14	27,53	30,18	27,55	-2,63	9,56
G1	PFC		30,29	27,49				
H1	PFC		30,12	27,63				
B2	PFD	3,6p/μL	35,15	31,57	34,66	31,36	-3,30	10,52
C2	PFD		34,19	31,4				
D2	PFD		34,63	31,1				
E2	PFE	0,36p/μL	37,74	33,42	37,29	33,54	-3,74	11,16
F2	PFE		36,86	33,49				
G2	PFE		37,26	33,72				
A3	PFY	1p/μL	35,68	33,3	36,09	33,27	-2,82	8,47
B3	PFY		36,28	33,18				
H2	PFY		36,3	33,33				
C3	PFZ	0,5p/μL	38,03	34,3	37,32	34,43	-2,89	8,39
D3	PFZ		37,52	34				
E3	PFZ		36,42	35				
A4	(Contr.+)	1440p/μL	26,02	22,65	26,06	22,58	-3,48	15,42
H3	(Contr.+)		26,09	22,5				
F3	(Contr. +)	32.400p/μL	Undetermined	21,38	0,00	21,35	21,35	-100,00
G3	(Contr. +)		Undetermined	21,31

Figura 11. PCR em tempo real para teste do gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [*Homo sapiens*]) como controle interno, realizado com amostras contendo leucócitos e com os pools de validação. Gene esquematizado no topo.

Os resultados obtidos com a PCR convencional para amplificação do gene da β -globina como controle interno mostraram-se adequados ao estudo, com amplificação de todos os isolados, indicando que a obtenção de DNA genômico foi realizada adequadamente (Figura 12).

Figura 12. PCR Convencional para teste do gene da β -globina [*Homo sapiens*] como controle interno, realizado com amostras contendo leucócitos e com pools. Gene esquematizado no topo.

3. Desempenho da PCR em tempo real, *nested* PCR e SD

Bioline *Pf/Pv* comparados com a gota espessa

As 50 amostras positivas para malária pela microscopia, considerada o teste de referência, foram ensaiadas individualmente pela PCR em tempo real e *nested* PCR. Uma amostra foi excluída da análise dos testes realizados com as amostras individuais por problemas decorrentes da extração de DNA, mas foi mantida no agrupamento em *pools*, visto que neste caso a extração foi adequada. Ainda, 48 amostras negativas foram testadas individualmente.

Quarenta e cinco amostras foram positivas para *Plasmodium* pela PCR em tempo real, com Sensibilidade de 91,84%, Especificidade (48/48) de 100,00%, Valor Preditivo Positivo de 100,00 e Valor Preditivo

Negativo de 92,31; 46 amostras detectaram *Plasmodium* pela *nested* PCR, com Sensibilidade de 93,88%, Valor Preditivo Positivo de 100,00, Valor Preditivo Negativo de 80,00, e Especificidade de 100,00% em 12 amostras negativas ensaiadas; foram ensaiadas 46 amostras com o teste SD Bioline Pf/Pv (três amostras de *P. malariae* foram excluídas visto que o teste detecta anticorpos contra *P. vivax* e *P. falciparum*); 32 amostras foram reagentes no teste sorológico, com Sensibilidade de 69,56%, Valor Preditivo Positivo de 100,00, Valor Preditivo Negativo de 41,66 e Especificidade de 100,00% em 10 amostras testadas (Tabela 7). Uma amostra diagnosticada como *P. vivax* pela microscopia, foi confirmada como *P. ovale* associada a *P. falciparum* pela *nested* PCR; uma amostra diagnosticada pela gota espessa como *P. vivax* resultou em *P. malariae* pela *nested* PCR; uma amostra de *P. falciparum* pela gota espessa foi dada como associada de *P. falciparum* e *P. vivax* na *nested* PCR.

Tabela 7. Valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN) de PCR em tempo real, *nested* PCR e SD Bioline, comparados à gota espessa, com IC 95% de probabilidade.

Teste	S (%)	E (%)	VPP	VPN
PCR em tempo real	91,84 (80,40 - 97,73)	100,00 (92,60 - 100,00)	100,00 (92,13 - 100,00)	92,31 (81,46 - 97,86)
Nested PCR	93,88 (83,13 - 98,72)	100,00 (73,54 - 100,00)	100,00 (92,29 - 100,00)	80,00 (51,91 - 95,67)
SD Bioline	69,56 (54,25 - 82,26)	100,00 (69,15 - 100,00)	100,00 (89,11 - 100,00)	41,66 (22,11 - 63,36)

3.1. Desempenho comparativo dos ensaios moleculares e o sorológico

Comparando-se a sensibilidade dos três testes observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0.0011$, teste χ^2). Entre a PCR em tempo real e a *nested* PCR não houve diferença significativa ($p=1,000$, teste exato de Fisher); o SD Bioline *Pf/Pv* foi menos sensível que a PCR em tempo real ($p=0.0080$, teste exato de Fisher) e que a *nested* PCR ($p=0.0027$, teste exato de Fisher).

3.2. Concordância entre os testes moleculares e o sorológico

A Tabela 8 mostra os valores de κ com IC de 95% de Probabilidade. Os resultados entre a PCR em tempo real e *nested* PCR apontaram ótima concordância entre os ensaios. Entre a PCR em tempo real e o SD Bioline *Pf/Pv* a concordância foi considerada regular. Entre a *nested* PCR e SD Bioline *Pf/Pv* houve concordância regular. A interpretação dos valores utilizada foi a de Pereira (1995) e de Andrade e Zicker (1997) conforme Quadro 1.

Tabela 8. Concordância e índice Kappa (IC 95%) entre os testes moleculares e o sorológico.

Teste	Concordância	κ
PCR em tempo real Nested PCR	95,16%	0,871 (0,7286 - 1)
PCR em tempo real SD Bioline	83,05%	0,6088 (0,378 - 0,8298)
Nested PCR SD Bioline	77,96%	0,4863 (0,2397 - 0,7329)

Quadro 1. Interpretação dos valores de Kappa entre os testes moleculares e o sorológico.

Valor de kappa	Concordância
< 0,00	Ruim
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Considerável
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

4. Aspectos comparativos entre os ensaios moleculares e o sorológico considerando as amostras de *P. vivax*

Dentre as 35 amostras diagnosticadas como *P. vivax* pela gota espessa e ensaiadas por PCR em tempo real (Figura 13), *nested* PCR (Figura 14) e o teste imunocromatográfico SD Bioline *Pf/Pv* (Figura 15), três amostras (8,57%) apresentaram Ct acima do *cut-off*, resultando negativas na PCR em tempo real. A *nested* PCR também falhou em

amplificar três amostras (8,57%) e possibilitou a detecção de outras espécies em duas. Em duas das três amostras negativas houve concordância com a PCR em tempo real. Com relação ao SD Bioline, 14 soros (30,43%) não reagiram com os antígenos presentes no teste. Estes resultados são apresentados na Tabela 9.

Figura 13. PCR em tempo real realizado com amostras de *P. vivax* e controle positivo com 1 parasito/mm³ (▲).

Figura 14. Nested PCR realizado com DNA de amostras de sangue positivas para *P. vivax*, mostrando amplificação de fragmentos de 120bp.

Figura 15. A. Teste imunocromatográfico SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diag, Inc.) para detecção de anticorpos específicos contra antígenos recombinantes, realizado com amostras de soro positivas para *P. vivax*. B. Controle realizado com amostras de soro negativas para malária. Seta vermelha=controle do teste; seta azul= reação positiva.

Tabela 9. Resultados dos ensaios de PCR em tempo real (*cut-off* = 36,88), *nested* PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv em amostras de sangue positivas para *P. vivax*.

Nº Projeto	Gota Espessa		Real Time PCR Média Ct	Nested PCR	SD Bioline Pf/Pv (MSP)	
	PMS	Pmm ³			2 Pv	1 Pf
01	Pv ++/+	15120	19.22	Pv	+	Ø
02	Pv +++/++	33960	16.37	Pv	+	Ø
03	Pv ++/++	2880	19.01	Po/Pf	Ø	+
04	Pv ++/2	6480	22.57	Pm	Ø	+
05	Pv +++/+	GOI	19.95	Pv	Ø	Ø
06	Pv +++/+	GOI	19.61	Pv	+	+
07	Pv ++/+	GOI	21.27	Pv	Ø	Ø
08	Pv +++/++	GOI	34.73	neg	Ø	+
09	Pv ++/+	GOI	20.12	Pv	+	Ø
10	Pv ++/+	GOI	23.2	Pv	+	Ø
11	Pv +++/++	GOI	19.88	Pv	Ø	Ø
12	Pv +++/++	GOI	19.01	Pv	+	Ø
13	Pv ++	GOI	19.89	Pv	+	Ø
18	Pv 5v/2vg	240	39.25	neg	+	Ø
19	Pv ++/+	12960	18.12	Pv	+	Ø
29	Pv ++/2/+	1920	19.88	Pv	+	Ø
30	Pv +++	16800	18.47	Pv	+	Ø
31	Pv ++/+	15120	20.37	Pv	+	Ø
33	Pv < +/2	120	39.04	neg	Ø	Ø
34	Pv ++	16320	24.06	Pv	+	Ø
35	Pv +++/++	31920	17.86	Pv	+	Ø
37	Pv ++/+	14760	21.73	Pv	+	Ø
38	Pv ++/1	1080	39.11	Pv	Ø	Ø
39	Pv ++/2/+1	960	31.83	Pv	+	Ø
40	Pv ++/2	8760	29.79	Pv	Ø	Ø
41	Pv ++/2	1920	22.97	Pv	+	Ø
42	Pv +++/++	16960	18.16	Pv	+	Ø
43	Pv +++/++	41760	18.65	Pv	+	Ø
44	Pv ++	GOI	21.17	Pv	+	Ø
45	Pv ++/2	GOI	31.71	Pv	+	Ø
46	Pv ++	GOI	21.73	Pv	Ø	Ø
47	Pv ++	GOI	18.41	Pv	+	Ø
48	Pv	GOI	24.12	Pv	Ø	Ø
49	Pv +	GOI	21.4	Pv	+	Ø
50	Pv +	GOI	24.08	Pv	Ø	Ø

PMS: Parasitemia padrão Ministério da Saúde

Pmm³: Parasitemia por milímetro cúbico

GOI: Gota Espessa Indisponível

Ø: Negativo

Pv: *Plasmodium vivax*

Pf: *Plasmodium falciparum*

Pm: *Plasmodium malariae*

Po: *Plasmodium ovale*

5. Aspectos comparativos entre os ensaios moleculares e o sorológico das amostras de *P. falciparum* e *P. malariae*

Onze amostras de *P. falciparum* e três amostras de *P. malariae* diagnosticadas pela gota espessa foram ensaiadas por PCR em tempo real (Figura 16), *nested* PCR (Figura 17) e o teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv (Figura 18).

O resultado obtido pela PCR em tempo real mostrou que houve amplificação em 100% das amostras de *P. falciparum* e em 2 das 3 amostras de *P. malariae*, com falha na detecção de uma amostra. A *nested* PCR mostrou amplificação em 100% das amostras para as duas espécies e detectou parasitemia mista de *P. falciparum* com *P. vivax* em uma amostra. O SD Bioline Pf/Pv falhou na detecção de anticorpos em duas amostras (18,18%) de *P. falciparum*. O teste detectou anticorpos contra *P. vivax* em uma das três amostras de *P. malariae*. Estes resultados são apresentados na Tabela 10.

Figura 16. PCR em tempo real realizado com amostras de *P. falciparum* (A), *P. malariae* (B) e controle positivo com 1 parasito/mm³ (▲).

Figura 17. Nested PCR realizado com amostras de sangue positivas para *P. falciparum* (A) e *P. malariae* (B) mostrando amplificação de fragmentos de 205bp e 144bp respectivamente.

Figura 18. Teste imunocromatográfico SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diag, Inc.) para detecção de anticorpos específicos contra antígenos recombinantes, realizado com amostras de soro positivas para *P. falciparum* (n^{os}. 17,20,21,22,23 e 24). Seta vermelha=controle do teste; seta azul= reação positiva.

Tabela 10. Resultados dos ensaios de PCR em tempo real (*cut-off* = 36,88), *nested* PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv em amostras de sangue positivas para *P. falciparum* e *P. malariae*.

N ^o Projeto	Gota Espessa		Real Time PCR Média Ct	Nested PCR	SD Bioline Pf/Pv (MSP)	
	PMS	Pmm ³			2 Pv	1 Pf
14	Pm +++/+	518000	21.49	Pm	Ø	Ø
15	Pm	120	36	Pm	+	Ø
16	Pm	120	36.98	Pm	Ø	Ø
17	Pf 7200/2039	9240	21.67	Pf	+	+
20	Pf 5879	5879	20.77	Pf/Pv	Ø	Ø
21	Pf 4.799	4799	34.4	Pf	Ø	+
22	Pf 360/840g	1200	21.65	Pf	Ø	+
23	Pf 17160	17160	21.24	Pf	Ø	+
24	Pf 32400	32400	26	Pf	+	Ø
25	Pf 11400	11400	21.52	Pf	Ø	+
26	Pf 56880	56880	19.34	Pf	Ø	+
27	Pf 65000	65000	17.62	Pf	Ø	+
28	Pf 28080	28080	19.2	Pf	Ø	+
36	Pf 2640/3480fg	6120	20.13	Pf	Ø	+

PMS: Parasitemia padrão Ministério da Saúde
 Ø: Negativo
 Pv: *Plasmodium vivax*
 Pf: *Plasmodium falciparum*

Pmm³: Parasitemia por milímetro cúbico
 Pm: *Plasmodium malariae*
 Po: *Plasmodium ovale*

6. Aspectos comparativos entre os ensaios moleculares e o sorológico das amostras processadas em pool

Foram processados quinze pools contendo amostras positivas e negativas, conforme demonstrado no Item 2 de Material e Métodos, Figura 5. Doze pools continham uma amostra positiva mais nove amostras negativas cada um. Dois pools continham duas amostras positivas e oito amostras negativas. Um pool continha três amostras positivas e sete negativas. Quando processados por PCR em tempo real (Figura 19) 13 pools (86,66%) mostraram Ct menor que 36,88, considerado como o *cut-off* neste estudo. Também na *nested* PCR (Figura 20) houve amplificação gênica nos mesmos 13 pools (86,66%). O teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv apresentou Sensibilidade de 73,33% com detecção em 11 (Figura 21).

O resultado obtido pela PCR em tempo real mostrou que houve amplificação em 100% das amostras de *P. falciparum*, 90% de *P. vivax* e 2 das 3 amostras de *P. malariae*. A *nested* PCR mostrou amplificação em 100% das amostras de *P. falciparum* e 60% de *P. vivax*, porém em dois pools a *nested* revelou não tratar-se de *P. vivax*, mas sim de *P. malariae* (pool 9) e associação de *P. falciparum* com *P. ovale* (pool 14), o que eleva sua capacidade de detecção de infecção para 80%. Em 1 dos 3 dos pools contendo amostras de *P. malariae* pela gota espessa, a *nested* mostrou concordância. O SD Bioline Pf/Pv mostrou detecção de

anticorpos em cinco amostras de *P. vivax* (50%) e três de *P. falciparum* (75%). Estes resultados são apresentados na Tabela 11.

Figura 19. PCR em tempo real realizado com amostras positivas e negativas agrupadas em pools e controle positivo com 1 parasito/mm³ (▲).

Figura 20. Nested PCR realizado com amostras processadas em pools contendo amostras positivas com negativas, mostrando amplificação de fragmentos de 205bp, 120bp e 144bp respectivamente para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*.

Figura 21. Teste imunocromatográfico SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diag, Inc.) para detecção de anticorpos específicos contra antígenos recombinantes, realizado com soros processados em pools contendo amostras positivas* com negativas. * = *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*.

Tabela 11. Resultados dos ensaios de PCR em tempo real (*cut-off* 36,88), *nested* PCR e teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv (Standard Diag. Inc.) realizado com *pools* contendo amostras positivas* com negativas. * = *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*.

Nº POOL	Amostra	Gota Espessa		Real Time PCR Média Ct	Nested PCR	SD Bioline Pf/Pv (MSP)		Real Time PCR individual Média Ct
		PMS	Pmm³			2 Pv	1 Pf	
1	39 - Pos	Pv	960	29,82	Pv	+	Ø	31,83
	1 - Neg							Neg
	2 - Neg							
	3 - Neg							
	4 - Neg							
	5 - Neg							
	6 - Neg							
	7 - Neg							
	8 - Neg							
	9 - Neg							
2	18 - Pos	Pv	240	Neg	Neg	Ø	Ø	39.25
	10 - Neg							Neg
	11 - Neg							
	12 - Neg							
	13 - Neg							
	14 - Neg							
	15 - Neg							
	16 - Neg							
	17 - Neg							
	18 - Neg							
3	40 - Pos	Pv	8760	26.23	Pv	Ø	Ø	29.79
	19 - Neg							Neg
	20 - Neg							
	21 - Neg							
	22 - Neg							
	23 - Neg							
	24 - Neg							
	25 - Neg							
	26 - Neg							
	27 - Neg							
4	16 - Pos	Pm	120	Neg	Neg	Ø	Ø	36.98
	28 - Neg							Neg
	29 - Neg							
	30 - Neg							
	31 - Neg							
	32 - Neg							
	33 - Neg							
	34 - Neg							
	35 - Neg							
	36 - Neg							
5	16 - Pos	Pm	120	33.49	Pv	+	Ø	36,98
	32 - Pos	Pv	120					Não Realizado
	15 - Pos	Pm	120					36
	37 - Neg							Neg
	38 - Neg							
	39 - Neg							
	40 - Neg							
	41 - Neg							
	42 - Neg							
	43 - Neg							

Nº POOL	Amostra	Gota Espessa		Real Time PCR Média Ct	Nested PCR	SD Bioline Pf/Pv (MSP)		Real Time PCR individual Média Ct
		PMS	Pmm ³			2 Pv	1 Pf	
6	32 - Pos	Pv	120	34,06	Pv	+	Ø	Não Realizado
	1 - Neg							Neg
	2 - Neg							
	3 - Neg							
	4 - Neg							
	5 - Neg							
	6 - Neg							
	7 - Neg							
	8 - Neg							
	9 - Neg							
7	22 - Pos	Pf	1200	27.13	Pf	Ø	+	21.65
	10 - Neg							Neg
	11 - Neg							
	12 - Neg							
	13 - Neg							
	14 - Neg							
	15 - Neg							
	16 - Neg							
	17 - Neg							
	18 - Neg							
8	21 - Pos	Pf	4.800	23.13	Pf	Ø	+	34,44
	19 - Neg							Neg
	20 - Neg							
	21 - Neg							
	22 - Neg							
	23 - Neg							
	24 - Neg							
	25 - Neg							
	26 - Neg							
	27 - Neg							
9	04- Pos	Pv	6480	23.74	Pm	Ø	+	22.57
	28 - Neg							Neg
	29 - Neg							
	30 - Neg							
	31 - Neg							
	32 - Neg							
	33 - Neg							
	34 - Neg							
	35 - Neg							
	36 - Neg							
10	18- Pos	Pv	240	26.68	Pf	Ø	+	39.25
	22 - Pos	Pf	1200					21.65
	5 - Neg							Neg
	37 - Neg							
	38 - Neg							
	39 - Neg							
	40 - Neg							
	41 - Neg							
	42 - Neg							
	43 - Neg							

Nº POOL	Amostra	Gota Espessa		Real Time PCR Média Ct	Nested PCR	SD Bioline Pf/Pv (MSP)		Real Time PCR individual Média Ct
		PMS	Pmm³			2 Pv	1 Pf	
11	24 - Pos	Pf	32400	26,01	Pf	+	Ø	23,9
	1 - Neg							Neg
	2 - Neg							
	3 - Neg							
	4 - Neg							
	5 - Neg							
	6 - Neg							
	7 - Neg							
	8 - Neg							
	9 - Neg							
12	29 - Pos	Pv	1920	20,02	Pv	+	Ø	19,88
	10 - Neg							Neg
	11 - Neg							
	12 - Neg							
	13 - Neg							
	14 - Neg							
	15 - Neg							
	16 - Neg							
	17 - Neg							
	18 - Neg							
13	15 - Pos	Pm	120	34,67	Pm	Ø	Ø	36
	19 - Neg							Neg
	20 - Neg							
	21 - Neg							
	22 - Neg							
	23 - Neg							
	24 - Neg							
	25 - Neg							
	26 - Neg							
	27 - Neg							
14	3 - Pos	Pv	2880	23,37	Pf/Po	Ø	+	19,01
	28 - Neg							Neg
	29 - Neg							
	30 - Neg							
	31 - Neg							
	32 - Neg							
	33 - Neg							
	34 - Neg							
	35 - Neg							
	36 - Neg							
15	39 - Pos	Pv	960	29,61	Pv	+	Ø	31,83
	33 - Pos	Pv	120					39,04
	27 - Neg							Neg
	37 - Neg							
	38 - Neg							
	39 - Neg							
	40 - Neg							
	41 - Neg							
	42 - Neg							
	43 - Neg							

PMS: Parasitemia padrão Ministério da Saúde
 Ø: Negativo
 Pv: *Plasmodium vivax*
 Pf: *Plasmodium falciparum*

Pmm³: Parasitemia por milímetro cúbico
 Pm: *Plasmodium malariae*
 Po: *Plasmodium ovale*

DISCUSSÃO

Nos programas de controle da malária, o diagnóstico laboratorial é considerado um dos mais importantes fatores, visto que a partir da detecção dos casos são instituídas todas as estratégias aplicáveis a cada região acometida pela doença. O método de referência para a rotina de diagnóstico é a gota espessa, dada à simplicidade de realização e baixo custo. Porém, suas limitações incluem diminuição na sensibilidade em baixas parasitemias, dificuldade na detecção de infecções mistas e alterações morfológicas induzidas por medicação pregressa (MILNE et al, 1994). Embora utilizada rotineiramente em áreas endêmicas, não é indicada para processamento de grande número de amostras de sangue em estudos epidemiológicos e clínicos ou em serviços de hemoterapia, por exigir longos períodos de observação por profissionais altamente capacitados, nem sempre disponíveis principalmente em regiões não endêmicas (KAIN et al, 1998). Para superar estas dificuldades, muitos estudos sobre metodologias moleculares foram desenvolvidos, com utilização de diferentes protocolos baseados em amplificação de sequências de DNA de *Plasmodium*, tendo como alvo principal os genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal (KIMURA et al, 1997; RUBIO et al, 1999). Técnicas sensíveis e específicas foram descritas, com capacidade de detecção de 1 parasito/ μ L (SNOUNOU et al, 1993); Gama e colaboradores (2007) modificaram protocolo de PCR em tempo real (LEE et al, 2002) para uma PCR convencional gênero-

específica, com capacidade de detecção de 0,5 parasito/ μ L. O mesmo limiar de detecção foi observado com a PCR em tempo real, o que levou à escolha deste protocolo para utilização neste estudo. Buscando validar também um teste rápido para detecção de anticorpos para uso em associação com a detecção de material genômico de *Plasmodium*, adotou-se o SD Bioline Pf/Pv para ser ensaiado em amostras individuais e em amostras agrupadas em pools.

Para avaliar sensibilidade analítica da PCR em tempo real e da *nested* PCR neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue provenientes de cultivo contínuo de *P. falciparum*, o que permitiu a determinação exata do número de parasitos/ μ L. Partiu-se de uma parasitemia inicial de 3.600 até 0,36 parasitos/ μ L, sendo que a PCR em tempo real foi capaz de amplificar até esta última diluição e a *nested* PCR até 3,6 parasitos/ μ L. Visto que a diluição referente a 1 parasito/ μ L foi reprodutível em todos os ensaios de PCR em tempo real realizados, e sendo este o limiar de detecção descrito para a *nested* PCR em amostras de cultura de *P. falciparum* (SNOUNOU et al, 1993), esta diluição foi adotada como controle positivo para a PCR em tempo real, embora a *nested* PCR tenha falhado em nossos ensaios na detecção deste valor. Corrobora com este fato, a observação dos autores (SNOUNOU et al, 1993) de que, em função da dificuldade para se determinar o número de genomas parasitários nas amostras, que podem conter

esquizontes, o limiar de detecção de 10 parasitos/ μ L é o mais adequado a se considerar.

Os resultados com as diluições de duas amostras clínicas, sendo uma de *P. vivax* e uma de *P. malariae* mostraram que a PCR em tempo real foi capaz de detectar até 1 parasito/ μ L na amostra de *P. malariae*, comparável aos resultados obtidos por Perandin et al (2004) em amostras clínicas, que mostraram amplificação de 0,7 parasito/ μ L em *P. falciparum*, 4 parasitos/ μ L em *P. ovale* e 1,5 parasito/ μ L em *P. vivax* com Cts que atingiram 37,6; 39,1 e 36,8 respectivamente. Veron et al (2009) encontraram limiar de detecção de 3,1; 0,3 e 0,8 parasitos/ μ L em amostras de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente. Em nossa experiência foi considerado como *cut-off* o valor médio dos Cts na diluição de 1 parasito/ μ L, mais Desvio Padrão, resultando em ponto de corte de 36,88, o que indica um desempenho superior em relação aos valores obtidos por outros autores (PERANDIN et al, 2004; VERON et al, 2009). A falha na amplificação da amostra de *P. vivax* pode ser justificada pelo padrão de contagem de parasitos estabelecido pela OMS: o número de parasitos visualizado na gota espessa em 100 leucócitos é calculado em relação a 6.000 leucócitos/ μ L, porém este número pode variar de indivíduo para indivíduo, levando a um viés na parasitemia das amostras clínicas. Esta constatação reforça a necessidade de se utilizar como controle positivo amostras provenientes de cultura. As amostras clínicas (uma de *P. vivax* e uma de *P. malariae*)

que foram diluídas para 6 parasitos/ μ L e 1 parasito/ μ L tiveram uma alíquota submetida à lise com saponina 1% antes da extração e outra alíquota extraída diretamente com o kit, a fim de se avaliar se a pré-lise poderia influenciar positivamente (aumentando a quantidade de DNA obtido) ou negativamente (inibindo de algum modo a reação de amplificação). De acordo com o desempenho das metodologias moleculares aplicadas nestas amostras, não houve diferença no desempenho de amplificação entre as amostras lisadas previamente com saponina e as amostras extraídas diretamente com o kit.

Para determinar e controlar a possibilidade de inibição da PCR em tempo real foi adicionado um controle interno na reação. O gene humano GAPDH tem sido utilizado para este fim (TAYLOR et al, 2010), com a vantagem de ser inserido na amostra a ser testada. Porém nossos resultados não foram satisfatórios, pois a inclusão do controle interno ocasionou aumento do Ct, o que poderia acarretar resultados falso negativos frente ao *cut-off*. Além disso, nos ensaios com os *primers* e sonda para o gene humano GAPDH, não houve amplificação em várias amostras. Como alternativa para controlar eventuais fatores de inibição da PCR em tempo real optou-se então pelo gene da β -globina como controle interno realizado com amplificação por PCR convencional (MELANA et al, 2001). O sucesso na amplificação de todas as amostras possibilitou a realização posterior da PCR em tempo real sem influência de qualquer fator de inibição.

Os ensaios de PCR em tempo real e *nested* PCR aqui utilizados baseiam-se na amplificação de sequências gênero-específicas (GAMA et al, 2007) ou espécie-específicas (SNOUNOU et al, 1993) do gene *ssrRNA* de *Plasmodium*. Os ribossomos apresentam diferenças estruturais nas diferentes fases do ciclo evolutivo (MCCUTCHAN et al, 1995), sendo que os transcritos do gene tipo A são dominantes na fase sanguínea assexuada e nos gametócitos (Li et al, 1997). Por serem muito adequados para a diferenciação entre as espécies de *Plasmodium* são bastante utilizados em ensaios moleculares aplicados ao diagnóstico de malária (KAWAMOTO et al, 1996; SINGH et al, 1999) e adotados no presente estudo.

A comparação entre a PCR em tempo real com gota espessa, considerada o teste de referência para malária, mostrou Sensibilidade de 91,84%, Especificidade de 100,00%, Valor Preditivo Positivo de 100,0 e Valor Preditivo Negativo de 92,31. Outros autores relatam valores um pouco maiores de Sensibilidade como 96,6% (BOONMA et al, 2007), 98,5% (HAN et al, 2007) e 99,41% (KHAIRNAR et al, 2009). Quanto à especificidade nossos resultados atingiram 100%, maiores que aqueles descritos, de 89,4% (BOONMA et al, 2007), 94,3% (HAN et al, 2007) e 90,88% (KHAIRNAR et al, 2009).

A *nested* PCR mostrou Sensibilidade de 93,88%, comparável a outros estudos, como 94,3% (HAN et al, 2007) e superior a valores

apresentados por outros autores, que obtiveram Sensibilidade de 96% apenas em parasitemias ≥ 500 parasitos/ μL e apenas 20% em parasitemias abaixo de 500 parasitos/ μL (COLEMAN et al, 2006). Estes autores relatam Especificidade de 98%, inferior àquela obtida em nossos ensaios, de 100%. A *nested* PCR aqui utilizada (SNOUNOU et al, 1993) possibilitou a diferenciação mais acurada das espécies de *Plasmodium*, contribuindo para detecção de infecções mistas não detectadas pela gota espessa devido à limitação desta técnica na diferenciação entre parasitos com morfologia muito semelhante. Esta vantagem da *nested* PCR faz com que este protocolo possa ser aplicado posteriormente a PCR em tempo real gênero-específica (GAMA et al, 2007) tornando a triagem de positivos em grande número de amostras mais eficaz e econômica. A possibilidade de contaminação em todas as reações foi descartada, visto que todos os experimentos foram realizados em salas separadas para cada etapa das reações moleculares, e cujos resultados foram mostrados nos controles negativos. Também a possibilidade de detecção de material genômico de parasitos não viáveis pode ser descartada, visto que somente parasitos vivos são detectados pela PCR (JARRA e SNOUNOU, 1998).

Analizando as falhas referentes à detecção molecular, observou-se que dentre as amostras ensaiadas por PCR em tempo real três amostras diagnosticadas como *P. vivax* e uma diagnosticada como *P.*

malariae pela gota espessa apresentaram Ct acima do *cut-off*, resultando negativas. Das três amostras de *P. vivax*, duas apresentavam na gota espessa parasitemia de 240 parasitos/mm³ (amostra 18) e 120 parasitos/mm³ (amostra 33), e a amostra de *P. malariae* tinha parasitemia na gota espessa de 120 parasitos/mm³ (amostra 16). As amostras de *P. vivax* e a amostra de *P. malariae* não detectadas podem ser justificadas pela discrepância que pode ocorrer nos valores de parasitemia da gota espessa, calculados com base na padronização da OMS, que considera um número constante de leucócitos de 6.000/mm³, o que acarreta diferenças entre a parasitemia real e a baseada neste método. Principalmente em parasitemias extremamente baixas, valores como 120 ou 240 parasitos/mm³ podem significar o encontro de um ou dois parasitos em grandes extensões da gota espessa, onde o examinador observa maior quantidade de material, gerando um viés no cálculo. Concordantes com esta observação são os valores de Ct em torno de 39 em três amostras e de 36,98 em outra, apontando para um deslocamento dos Cts, acima do ponto de corte. Além das baixíssimas parasitemias, problemas decorrentes da extração levaram a obtenção de DNA de má qualidade. Portanto apenas na amostra 38 de *P. vivax*, o Ct acima do *cut-off* significa uma falha intrínseca do método.

Dentre as três amostras de *P. vivax* não amplificadas por *nested* PCR, duas delas (amostras 18 e 39) também não amplificaram na PCR

em tempo real, portanto as justificativas para aquele caso aplicam-se a este. Apenas a amostra 8 resultou como uma falha da técnica.

O teste SD Bioline Pf/Pv apresentou Sensibilidade de 69,56%, Especificidade de 100,00%, Valor Preditivo Positivo de 100,00 e Valor Preditivo Negativo de 41,66. São escassos os dados sobre o desempenho do SD Bioline Pf/Pv para detecção de anticorpos. Os resultados descritos por Jeremiah et al (2007) com amostras de *P. falciparum* mostraram Sensibilidade de 47%, Especificidade de 100%, Valor Preditivo Positivo de 100% e Valor Preditivo Negativo de 83.2%. Em nossa experiência, o teste SD Bioline Pf/Pv falhou na detecção de anticorpos anti *P. vivax* ou *P. falciparum* em 14 amostras; destas, cinco eram de pacientes primo-infectados, com tratamento administrado no início dos sintomas, o que pode justificar a ausência de anticorpos específicos; em uma amostra diagnosticada como *P. vivax* pela gota espessa, a *nested* PCR detectou *P. ovale* associada a *P. falciparum*, o que justifica o SD Bioline Pf/Pv não ser reagente com antígenos recombinantes de *P. vivax* presentes no teste, visto que ocorreu a detecção de *P. falciparum*. Em outra amostra também diagnosticada como *P. vivax* pela gota espessa, a *nested* PCR detectou *P. malariae* o que explica a não detecção pelo teste SD Bioline. Seed et al (2005) encontraram valores de Sensibilidade maiores que 98% utilizando um ensaio imunoenzimático contendo antígenos recombinantes de *P. falciparum* e *P. vivax* em amostras positivas pela gota espessa para

estas duas espécies de *Plasmodium*. Embora tenham obtido alto percentual de sensibilidade, os autores relatam reação cruzada com outras espécies de *Plasmodium*, o que não deveria ocorrer em se tratando de antígenos recombinantes. O teste SD Bioline Pf/Pv mostrou-se específico para os antígenos recombinantes presentes em sua composição.

Embora a comparação entre a sensibilidade dos ensaios moleculares e o sorológico tenha apontado diferença estatisticamente significativa e concordância regular, o teste rápido aqui estudado obteve Sensibilidade de 69,56% e Especificidade de 100%, enquanto que o teste de ELISA realizado por Oh et al (2008), utilizando antígenos recombinantes de MSP1 e CSP de *P. vivax*, obteve Sensibilidade de 53,0% e Especificidade de 94%, quando comparados com a microscopia e com a *nested* PCR. Em dois estudos independentes, com um total de 39 amostras, o SD Bioline Pf/Pv foi positivo em três amostras onde a gota espessa era positiva, a *nested* PCR negativa em uma delas e a RIFI não reagente em outra; em duas outras amostras com *nested* PCR positiva e gota espessa negativa, o SD Bioline Pf/Pv confirmou o resultado da PCR. Em uma dessas amostras a RIFI foi não reagente, o que aponta para a utilidade do SD Bioline Pf/Pv de modo complementar para a detecção de malária (COSTA-NASCIMENTO et al, 2006; LIMA et al, 2009). A literatura carece de dados comparativos entre PCR em tempo real e testes sorológicos para malária.

Quando comparados os dois ensaios moleculares não houve diferença significativa estatisticamente entre eles, com ótima concordância, à semelhança dos resultados obtidos por Perandin et al (2004). Estes autores ensaiaram amostras positivas na gota espessa por PCR em tempo real com *TaqMan* e *nested* PCR com *primers* descritos por Snounou et al (1993) e todas as amostras que amplificaram na PCR em tempo real também foram positivas pela *nested* PCR.

Nos ensaios realizados com as amostras positivas e negativas agrupadas em *pools*, a Sensibilidade obtida foi de 86,66% nas duas técnicas moleculares, considerando-se como teste de referência a gota espessa de cada amostra individual. Nos agrupamentos só com amostras negativas a Especificidade foi de 100% pela PCR em tempo real. Em estudos realizados com *pools*, Taylor et al (2010), mostraram Sensibilidade de 95% e Especificidade de 99% em *pools* confeccionados com quatro amostras. Estes autores obtiveram limiar de detecção de 4 parasitos/ μ L na validação do ensaio, utilizando um *pool* com 1 amostra positiva e nove negativas. Bharti et al (2009) utilizaram uma modificação de *nested* PCR já descrita (SNOUNOU et al, 1993) em amostras de soro agrupadas em *pools* de 10 e 100, com Sensibilidade de 80% nos *pools* com 10 amostras. Em nossos ensaios para o processamento dos *pools*, utilizamos como controle positivo amostra de cultura com 1 parasito/ μ L, o que valida os resultados obtidos nos ensaios moleculares. De um total de 15 *pools* utilizados, apenas dois

foram negativos nos dois protocolos de PCR, sendo que ambos continham amostras positivas que também falharam na amplificação gênica no processamento individual. Estes resultados sugerem que, a exemplo do que foi descrito com as amostras individuais, fatores como a contagem da parasitemia das amostras clínicas tenham influenciado neste achado. Surpreendentemente o SD Bioline *Pf/Pv* mostrou Sensibilidade um pouco maior nas amostras ensaiadas em *pool*.

O diagnóstico da malária permanece como um grande desafio para os programas de controle da doença, visto que a gota espessa (Ross, 1903), ainda considerada o teste de referência, apresenta limitações. Quando examinada por microscopistas altamente treinados, a gota espessa pode detectar 20 parasitos/ μ L (JONKMAN et al, 1995) o que não se reproduz na rotina existente em áreas endêmicas, onde a detecção pode ser de 500 parasitos/ μ L (MILNE et al, 1994). O problema se agrava no processamento de grande número de amostras, visto que a gota espessa exige longo tempo de observação para apresentar razoável sensibilidade. As técnicas moleculares, apesar de sua alta acurácia, reprodutibilidade e sensibilidade, apresentam alto custo no processamento de amostras individualmente, como nos estudos epidemiológicos e em triagem de doadores em hemoterapia. A detecção de anticorpos pode ser método auxiliar no diagnóstico de malária, porém as técnicas disponíveis exigem tempo para sua

realização, como a RIFI ou carecem de kits com antígenos padronizados e com custo acessível, como para o ELISA.

Neste estudo apresentamos os resultados de validação de plataforma de testes moleculares e sorológico para diagnóstico de malária em larga escala. Com base nos resultados obtidos, sugerimos o emprego da PCR em tempo real gênero-específica para triagem de amostras, seguida de *nested* PCR para identificação das espécies de *Plasmodium*. Este procedimento minimiza a execução de ensaios de *nested* em amostras negativas, visto que estes protocolos amplificam inicialmente o fragmento de gênero, com consecutivas reações aninhadas para detecção das espécies (SNOUNOU et al, 1993). Como método complementar o teste rápido SD Bioline Pf/Pv para detecção de anticorpos pode ser indicado, porém não como única ou principal metodologia de detecção da infecção malárica.

Os resultados preliminares deste estudo com relação ao processamento de amostras em *pool* indicam sua adequação para o processamento de amostras em larga escala, com significativo impacto econômico e de tempo. Estimativas apontam para uma economia de mais de 50% quando comparados com os custos individuais (WESTREICH et al, 2008; TAYLOR et al, 2010).

Considerando que os resultados preliminares de processamento em *pool* mostraram-se comparáveis à análise individual, a proposta para a continuidade deste estudo é a aplicação desta plataforma de

diagnóstico em 13.000 amostras de sangue de hemocentros de todo o território brasileiro, agrupadas em *pool*, objetivando avaliar a prevalência de malária neste universo. Casos de malária transfusional têm sido relatados em áreas de baixa endemicidade como o Estado de São Paulo, inclusive com óbito (KIRCHGATTER et al, 2005) e o risco deste tipo de transmissão está associado a casos de infecções assintomáticas causadas principalmente por *P. malariae*, com difícil detecção pela gota espessa. A aplicação de PCR em tempo real tanto em rotina de hemoterapia como em investigação de focos autóctones (COUTO et al 2010), onde grande número de amostras são triadas, é imprescindível para a otimização do diagnóstico de malária.

CONCLUSÕES

1. A PCR em tempo real em amostras individuais de *Plasmodium*, apresentou ótimo desempenho na detecção de infecções maláricas, inclusive assintomáticos com baixa parasitemia. Foi confirmada como técnica rápida, com baixo risco de contaminação, adequada para detecção de *Plasmodium sp.*
2. A PCR em tempo real aplicada em *pools* contendo amostras de *Plasmodium* com amostras negativas tornou o processamento em larga escala mais rápido e econômico, sem comprometer seu desempenho. Foi validada como técnica a ser utilizada na triagem de grande número de amostras.
3. A *nested* PCR aplicada em amostras individuais de *Plasmodium* apresentou ótimo desempenho na identificação das espécies, inclusive infecções mistas não detectadas pela gota espessa, além de alta sensibilidade em baixas parasitemias.
4. A *nested* PCR aplicada em *pools* contendo amostras de *Plasmodium* com amostras negativas manteve a sensibilidade na detecção de baixas parasitemias e infecções mistas. Por ser mais demorada e trabalhosa, não é ideal para a triagem de amostras em larga escala, sendo indicada para a determinação de espécies, após abertura de *pools* positivos pela PCR em tempo real.

5. O teste SD Bioline®, tanto no processamento individual como em *pool* somente mostrou-se indicado como técnica complementar ao diagnóstico de amostras positivas para malária por ser específico apenas para *P. vivax* e *P. falciparum* e por sua baixa sensibilidade.

6. Os métodos foram comparados estatisticamente, concluindo-se por ótima concordância entre as ferramentas moleculares, mas regular entre estas e o teste SD Bioline. Foi validada uma plataforma para diagnóstico de malária em grande escala, constante de uma triagem inicial com PCR em tempo real em *pool* de amostras, para detecção de *Plasmodium* com *primers* gênero-específicos, seguida de *nested* PCR com *primers* espécie-específicos após abertura dos *pools* positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abulrahi HA, Bohlega EA, Fontaine RE, Al-Seghayer SM, Al-Ruwais AA. *Plasmodium falciparum* malaria transmitted in hospital through heparin locks. *Lancet* 1997; 349: 23–5.

Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, Conway DJ. Duration of naturally acquired antibody responses to blood stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun* 2008; 76: 1748-55.

Allison AC. Genetic control of resistance to human malaria. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 499-505.

Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 639-40.

Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol* 2009; 63:195-221.

Andrade ALSS, Zicker F. Métodos de investigação epidemiológicos em doenças transmissíveis. Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde/Fundação Nacional de Saúde, 1997.

Avery-Jones S, Ferreira-Neto JA. Symptomless *Plasmodium vivax* parasitaemias and malaria eradication in Santa Catarina state, Brazil. *Série Informes Técnicos WHO/Mal/469.64*. 1964; 17pp.

Avila PE, Kirchgatter K, Brunialti KCS, Oliveira AM, Siciliano RF, Di Santi SM. Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-Check™, for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Rev Inst Med trop Sao Paulo* 2002; 44: 293-6.

Barata LCB, Andriguetti MTM, Cortás MC, Meneguetti C. Note on the malaria outbreak in users of injectable drugs. *Rev Saúde públ* 1990; 24: 321-2.

Baker J, McCarthy J, Gatton M, Kyle DE, Belizario V, Luchavez J, Bell D, Cheng Q. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J Infect Dis* 2005; 192: 870-7.

Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwongtragoon K, Wirth DF. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. *Exp Parasitol* 1994; 79: 41-9.

Barker RH Jr. DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Exp Parasitol* 1990; 70: 494-9.

Barroso WJ. A malária de Mata Atlântica no Brasil. *Infarma* 2003; 15: 76-7.

Barsoum RS. Parasitic infections in organ transplantation. *Exp Clin Transplant* 2004; 2: 258-67.

Beier JC. Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1998; 43: 519-43.

Belizário VY, Pasay CJ, Bersabe MJ, Leon WU, Guerrero DM, Bugaoisan VM. Field evaluation of malaria rapid diagnostic tests for the diagnosis of *P. falciparum* and non-*P. falciparum* infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; 36: 552-61.

Bell D, Peeling RW. Evaluation of rapid diagnostic tests: malaria. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: S34–S8.

Bértoli M, Moitinho MLR. Malária no estado do Paraná, Brasil. *Rev Soc Med Trop* 2001; 34: 43-7.

Bharti AR, Letendre SL, Patra KP, Vinetz JM, Smith DM. Malaria diagnosis by a polymerase chain reaction–based assay using a pooling strategy. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 754-7.

Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* *in vitro*. *Parasitology* 1997; 115: 1–7.

Boonma P, Christensen PR, Suwanarusk R, Price RN, Russell B, Lek-Uthai U. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malaria J* 2007; 6:124.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal - PIACM – Julho de 2000 a Dez. 2002: relatório de gestão/ Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 6ª. ed. Rev.-Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão/ Situação Epidemiológica da Malária no Brasil – Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Calado DC, Navarro-Silva MA. Identification of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab and *Anopheles (Kerteszia) homunculus* Komp (Diptera, Culicidae, Anophelinae) by molecular markers (RAPD and RFLP), *Rev Bras Zool* 2005; 22: 1127-33.

Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária vivax no foco Aldeia dos Índios, Município de Peruíbe, São Paulo, 1984 a 1986. *Cad Saúde Publ* 1988; 4: 276-92.

Carvalho ME, Glasser CM, Santos LA, Ciaravolo RMC. Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária vivax por meio de técnica sorológica em São Paulo. *Cad. Saúde Públ* 1985; 1: 250-2.

Cavasini CE, Mattos LC, Couto AA, Bonini-Domingos CR, Valencia SH, Neiras WC, Alves RT, Rossit AR, Castilho L, Machado RL. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: An exception? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:1042–1044.

Cerutti CJr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MC, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J* 2007; 6: 33.

Chen KT, Chen CJ, Chang PY, Morse DL. A nosocomial outbreak of malaria associated with contaminated catheters and contrast medium of a computed tomographic scanner. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999; 20: 22–5.

Cochrane AH, Nardin EH, De Arruda M, Maracic M, Clavijo P, Collins WE, Nussenzweig RS. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43: 446-51.

Coelho JS, Soares ISS, Lemos EA, Jimenez MCS, Kudó ME, Moraes SL, Ferreira AW, Sanchez MCA. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous

detection of malaria, chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diag Microbiol Inf Dis* 2007; 58: 223-30.

Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 1960; 20: 213-20.

Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, Rachapaew N, Zollner G, Miller RS, Vaughan JA, Thimasarn K, Khuntirat B. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. *Malar J* 2006; 5: 121.

Contreras CE, Pance A, Marcano N, Gonzles N, Bianco N. Detection of Specific Antibodies to *Plasmodium falciparum* in Blood Bank Donors from Malaria Endemic and Non-endemic Areas of Venezuela. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:948-53.

Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends in Paras* 2007; 23:575-82.

Costa-Nascimento MJ, Lima GFMC, Arajo RAS, Kirchgatter K, Carvalho ME, Pereira BF, Bergara DM, Di Santi SM. Avaliao do teste imunocromatogrfico SD BIOLINE MALARIA *P.f./P.v.* para deteco de anticorpos em malria, utilizando sangue total, soro ou plasma humano. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campos do Jordo, SP. Resumos. 2007.

Costa-Nascimento MJ, Toniolo CRC, Lima, GFMC, Araújo RAS, Kirchgatter K, Wunderlich G, Di Santi SM. Malária autóctone em região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo: benignidade ou risco oculto? III Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, Ubatuba, SP. Resumos. 2006.

Couto RA, Latorre MRDO, Di Santi SM e Natal Delsio. Autochthonous malaria notified in the State of São Paulo: clinical and epidemiological characteristics from 1980 to 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:52-8.

Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shasul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 165-71.

Cox-Singh J, Hiu J, Lucas SB, Divis PC, Zulkarnaen M, Chandran P, Wong KT, Adem P, Zaki SR, Singh B, Krishna S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. *Malar J* 2010; 11: 9-10.

Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae*/*P.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 235-43.

Deane LM, Ferreira-Neto J, Lima MM. The vertical dispersion of *Anopheles (Kerteszia) cruzii* in a Forest in southern Brazil suggests that human cases

of malaria of simian origin might be expected. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984; 79: 461-3.

Di Santi SM, Boulos M. Protozoários – Malária. In *Parasitologia humana e seus Fundamentos Gerais*. (Ed. B. Cimerman and S. Cimerman), São Paulo: Atheneu; 1999; 375pp.

Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KCS, Oliveira AM, Ferreira SRS, Boulos M. PCR - Based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2004; 46:183-7.

Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science* 1975; 187: 748–50.

Engvall E, Perlman P. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8: 871-4.

Fandeur T, Volney B, Peneau C, Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology* 2000; 120:11-21.

Farcas GA, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbial* 2004; 42: 636–8.

Ferrarini MAG, Iazzetti AV, Ferreira S, Di Santi SM, Wigman LT, Silveira M B V. Congenital malaria: description of a case and review of the literature. *Pediatr Mod* 2009; 45:140-5.

Ferreira MO, Rachou RG. Data on the incidence of *Plasmodium malariae* in the state of Santa Catarina. *Rev Bras Malariol D Trop*. 1966; 18: 553-6.

Ferreira MU, Santos-Neto LL, Ferrari JO, Villalobos JM, Carvalho ME. The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum*, in relation to malaria exposure and severity. *Ann Trop Med Parasitol* 1998; 92: 245-56.

Fischer L, Sterneck M, Claus M, Costard-Jackle A, Fleischer B, Herbst H, Rogiers X, Broelsch CE. Transmission of malaria tertiana by multiorgan donation. *Clin Transplantation* 1999;13: 492-6.

Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel RSR, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT, Saraiva AS, Silva RU, Bonini-Domingos CR, Mattos LC, Rossit ARB, Cavasini CE, Machado RLD. Triagem molecular de portadores assintomáticos de *Plasmodium sp* entre Bancos de Sangue da região Amazônica brasileira. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 2007; 49: 1-4.

Gama BE, Silva-Pires FES, Lopes MNR, Cardoso MAB, Britto C, Torres KL, Lima LM, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol* 2007; 116: 427-32.

Genrich GL, Guarner J, Paddock CD, Shieh WJ, Greer PW, Barnwell JW, Zaki SR. Fatal malaria infection in travelers: novel immunohistochemical assays for the detection of *Plasmodium falciparum* in tissues and implications for pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 251–9.

Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. *Trends Parasitol* 2005; 21: 29-34.

Good MF, Kaslow DC, Miller LH: Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine. *Annu Rev Immunol* 1998, 16: 57-87.

Grant DB, Perinpanayagam MS, Shute PG, Zeitlin RA. A case of malignant tertian (*Plasmodium falciparum*) malaria after blood-transfusion. *Lancet* 1960; 2: 249-70.

Greenwood BM, Bradley AK, Greenwood AM, Byass P, Jammeh K, Marsh K, Tulloch S, Oldfield FS, Hayes R. Mortality and morbidity from malaria among children in a rural area of The Gambia, West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 478-86.

Grimberg BT, Udomsangpetch R, Xainli J, McHenry A, Panichakul T, Sattabongkot J, Cui L, Bockarie M, Chitnis C, Adams J, Zimmerman PA, King CL. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the Duffy binding protein. *PLoS Med* 2007; 4: e337.

Hadley TJ, Klotz FW e Miller LH. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40: 451-77.

Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2521-8.

Haynes JD, Dalton JP, Klotz FW, McGinniss MH, Hadley TJ, Hudson DE, Miller LH. Receptor-like specificity of a *Plasmodium knowlesi* malarial protein that binds to Duffy antigen ligands on erythrocytes. *J Exp Med* 1988; 167:1873-81.

Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 1982; 119:142–7.

Hedberg K, Shaffer N, Davachi F, Hightower A, Lyamba B, Paluku KM, Nguyen-Dinh P, Breman JG. *Plasmodium falciparum*-associated anemia in children at a large urban hospital in Zaire. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 365-71.

Hirunpetcharat C, Tian J-H, Kaslow DC, Van Rooijen N, Kumar S, Berzofsky JA, Miller LH, Good MF. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton Carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP119) of *Plasmodium yoelli* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Correlation of protection with antigen-

specific antibody titer, but not with effector CD4⁺ cells. *J Immunol* 1997; 159: 3400-11.

Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy* 1988; 41: 72-97.

Huong NM, Davis TM, Hewitt S, Huong NV, Uyen TT, Nhan DH, Cong le D. Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Trop Med Int Health* 2002; 7: 304-8.

Hutton EL, Shute PG. The risk of transmitting malaria by blood transfusion. *J Trop Med Hyg* 1939; 42: 309-12.

Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun* 1998; 66: 3783-7.

Jeremiah ZA, Uko EK, Buseri FI, Jeremiah TA. Field evaluation of SD Bioline rapid malaria diagnostic test among asymptomatic malaria infected children in Port Harcourt, Nigeria. *Res J Parasitol* 2007; 2: 39-44.

Jonkman A, Chibwe RA, Khoromana CO, Liabunya UL, Chaponda ME, Kandiero GE, Molyneux ME, Taylor TE. Cost-saving through microscopy-based versus presumptive diagnosis of malaria in adult outpatients in Malawi. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 223-7.

Kain KC, Harrington MA, Tennyson S, Keystone JS. Imported malaria: prospective analysis of problems in diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 142–9.

Khairnar K, Martin D, Lau R, Ralevski F, Pillai DR. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of *Plasmodium* spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malar J* 2009; 8: 284.

Kappe S, Bruderer T, Gantt S, Fujioka H, Nussenzweig V, Menard R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol* 1999;147: 937–44.

Kappe SH, Kaiser K, Matuschewski K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol* 2003; 19: 135-43.

Kawamoto F, Miyake H, Kaneko O, Kimura M, Nguyen TD, Nguyen TD, Liu Q, Zhou M, Le DD, Kawai S, Isomura S, Wataya Y. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2287-9.

Kimura M, Kaneko O, Qing L, Mian Z, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitol Internat* 1997; 46: 91-5.

Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *British Med J* 2005; 331: 576-b.

Kirchgatter K, Wunderlich G, Branquinho MS, Salles TM, Lian YC, Carneiro-Junior RA, Di Santi SM. Molecular typing of *Plasmodium falciparum* from Giemsa-stained blood smears confirms nosocomial malaria transmission *Acta Trop* 2002; 84:199-203.

Kitchen A, Mijovic A, Hewitt P. Transfusional transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient. *Vox Sanguinis* 2005; 88: 200-1.

Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sanguinis* 2006; 90: 77-84.

Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog. Clin. Parasitol* 1989; 1: 1-19.

Kudó ME. Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de *P. vivax* (MSP119) em grupos populacionais expostos à malária [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.

Kurstak E. Enzyme Immunodiagnosis. Orlando: Academic Press; 1986. 235 pp.

Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 171-92.

Ladeia - Andrade S. Aspectos epidemiológicos da malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz; 2005.

Lee MA, Tan CH, Aw LT, Tang CS, Singh M, Lee SH, Chia HP, Yap EP. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4343-5.

Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, McCarthy J. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J Clin Microbiol* 2006a; 44: 2773–8.

Lee N, Baker J, Bell D, McCarthy J, Cheng Q. Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests. *J Clin Microbiol* 2006b; 44: 4547–9.

Leoratti FMS. Resposta imune humoral na malária humana: quantidade e qualidade de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

Lesko CR, Arguin PM, Newman RD. Congenital malaria in United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161:1062-7.

Li J, Collins WE, Wirtz RA, Rathore D, Lal A, McCutchan TF: Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg Infect Dis*. 2001; 2: 35-42.

Li J, Gutell RR, Damberger SH, Wirtz RA, Kissinger JC, Rogers MJ, Sattabongkot J, McCutchan TF. Regulation and trafficking of three distinct 18 S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite. *J Mol Biol* 1997; 269: 203-13.

Li J, Zhu JD, Appiah A, McCutchan TF, Long GW, Milhous WK, Hollingdale MR. *Plasmodium berghei*: quantitation of in vitro effects of antimalarial drugs on exoerythrocytic development by a ribosomal RNA probe. *Exp Paras* 1991; 72: 450-8.

Lima GFMC, Inoue J, Carvalho ME, Nascimento LG, Sanchez MCA, Toniolo CRC, Nascimento MJC, Di Santi SM. Infecção plasmodial assintomática em candidatos a doação de sangue: detecção sorológica e molecular. XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Recife, PE. Resumos. 2009.

Lo SS, Andrade JCR, Condino MLF, Alves MJCP, Semeghini MG, Galvão EC. Malária em usuários de drogas de administração endovenosa associada à soropositividade para HIV. *Rev Saúde públ* 1991; 25: 17-22.

Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, de Matos GJ, Boulos M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 2005; 9: 425-30.

Luzzatto L. Genetics of red cells and susceptibility to malaria. *Blood* 1979; 54: 961–76.

MacDonald G. Eradication of Malaria. *Public Health Rep* 1965; 80: 870-9.

Makler MT, Piper RC, Milhous WK. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of malaria. *Parasitol Today* 1998; 14: 376–7.

Marsh, K . Malaria—a neglected disease? *Parasitology* 1992; 104: 53–69.

McCutchan TF, Li J, McConkey GA, Rogers MJ, Waters AP. The cytoplasmic ribosomal RNAs of *Plasmodium* spp. *Parasitol Today* 1995; 11: 134-8.

Melana SM, Holland JF, Pogo BGT. Search for Mouse Mammary Tumor Virus-like env Sequences in Cancer and Normal Breast from the Same Individuals. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 283–4.

Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64: 97-106.

Ménard D, Barnadas C, Bouchier C, Henry-Halldin C, Gray LR, Ratsimbao A, Thonier V, Carod JF, Domarle O, Colin Y, Bertrand O, Picot J, King CL, Grimberg BT, Mercereau-Pujalon O, Zimmerman PA. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *PNAS* 2010; 107: 5967-71.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002; 415 : 673-9.

Miller LH, Mason SJ, Dvorak JA, McGinniss MH, Rothman IK. Erythrocyte receptors for *Plasmodium knowlesi* malaria: Duffy blood group determinants. *Science* 1975; 189: 561–3.

Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol* 1994; 47: 740-2.

Moody A. Rapid Diagnostic Test for Parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1): 66-78.

Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettly AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res* 2005; 95: 420-6.

Muerhoff AS, Birkenmeyer LG, Coffey R, Dille BJ, Barnwell JW, Collins WE, Sullivan JS, Dawson GJ, Desai SM. Detection of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae* merozoite surface protein 1-p19 antibodies in human malaria patients and experimentally infected nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1631-8.

Mukhtar MY, Lesi FEA, Iroha EU, Egri-Okwaji MTC, Mafe AG. Congenital malaria among inborn babies at tertiary centre in Laos, Nigeria. *J Trop Pediatr* 2005; 52:19-23.

Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Intern Health* 2003; 8: 876-83.

Murray CK, Jr Gasser RA, Magill AJ, Miller RS. Update on RDT Mal. *Clin Microbiol Review* 2008; 21: 97-110.

Murray CK, Bennett JW. Rapid Diagnosis of Malaria. *Interd Persp Inf Dis* 2009; 2009: 1-7.

Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A, Freitas JLP, Amato Neto V. Ação da violeta de genciana sobre o *T. cruzi* in vitro: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. *Rev Paulista Med* 1953; 42: 57-8.

Oh JS, Kim JS, Lee CH, Nam DH, Kim SH, Park DW, Lee CK, Lim CS, Park GH. Evaluation of a malaria antibody enzyme immunoassay for use in blood screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103: 75-8.

Oliveira JPA, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infec Dis* 1995; 20: 15.

Park SK, Lee KW, Hong SH, Kim DS, Lee JH, Jeon BH, Kim WS, Shin HJ, An SH, Park H. Development and evaluation of an immunochromatographic kit for the detection of antibody to *Plasmodium vivax* infection in South Korea. *Yonsei Med J* 2003; 44: 747-50.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1214–9.

Pereira MG. Epidemiologia: teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. 583pp.

Ponglikitmongkol M, Nicomrat D, Boonsaeng V, Wilairat P, Panyim S. Field evaluation of simplified radioactive and nonradioactive DNA probe methods for the diagnosis of *falciparum* malaria. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1994; 25: 430-5.

Price L, Planche T, Rayner C, Krishna S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007;101: 655-9.

Prudêncio M, Rodríguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoítos: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Rev Microb* 2006; 4: 849-56.

Rachou RG, Ferreira MO. *Kerteszia* as the group most responsible for malaria in the state of Santa Catarina. *Rev Bras Malariol D Trop* 1966; 18: 691-7.

Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira Jr OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* using recombinant of the merozoite surface protein-1. *Malaria J* 2003; 2: 39-45.

Ross R. An improved method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. *Lancet* 1903; 1: 86-7.

Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, Lopez-Velez R, Garcia L, Alvar J. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3260-4.

Ryan JR, Stoute JA, Amon J, Dunton RF, Mtalib R, Koros J, Owour B, Luckhart S, Wirtz RA, Barnwell JW, Rosenberg R. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75:575–581.

Sáez-Alquézar A, Ramos AMSV, Di Santi SM, Branquinho MS, Kirchgatter K, Cordeiro IAC, Murta M, Saraiva JCP, Oliveira SG, Bochetti MGG, Pirolla JA, Guerzoni D, Chamone DAF. Controle da malária transfusional em região endêmica e não-endêmica no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 27-34.

São Paulo. 2010a. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Malária: Tabelas. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/malaria8306_cepid.htm. Acesso em junho de 2010.

São Paulo. 2010b. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Malária: Tabelas. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/malaria_cautoctone.htm.

Acesso em junho de 2010.

Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanches EM, Lima GFMC, Inoue J, Sanchez MCA, Di Santi SM. Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011; 53: 55-9.

Seed CR, Kitchen A, Davis TM. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfus Med Rev* 2005; 19: 229-40.

Sharma A, Khanduri U. How benign is benign tertian malaria? *J Vector Borne Dis* 2009; 46: 141-4.

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 687-92.

Singh L, Sung A, Matusop A, Radhakrishnan S, Shamsul J, Cox-Singh A, Thomas D, Conway DJ. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 2004; 363: 1017-24.

Singh N, Mehra RK, Srivastava N. Malaria during pregnancy and infancy, in an area of intense malaria transmission in central India. *Ann Trop Med Parasitol* 2001; 95:19-29.

Snewin VA, Premawansa S, Kapilananda GM, Ratnayaka L, Udagama PV, Mattei DM, Khouri E, Del Giudice G, Peiris JS, Mendis KN, David PH. Transmission blocking immunity in *Plasmodium vivax* malaria: Antibodies raised against a peptide block parasite development in the mosquito vector. *J Exp Med* 1995; 181: 357–62.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 315–20.

Snow RW, Craig M, Deichmann U, Marsh K. Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's nonpregnant population. *Bull World Health Organ* 1999; 77: 624-40.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of the naturally acquired antibody responses to the N-and C-terminal regions of *P. vivax* MSP1. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 357-63.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 169-80.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, Krueger A, Pollok JM, Menard R, Heussler VT. Manipulation of host

hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 2006; 313: 1287-90.

Sulzer AJ, Wilson M, Hall EC. Indirect fluorescent-antibody tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malaria antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1969; 18: 199-205.

Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalishewinkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, Wilairatana P, Looareesuwan S, Rosenblatt J. Evaluation of a real-time polymerase chain reactions assay for diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 850–4.

Taylor SM, Juliano JJ, Trottman PA, Griffin JB, Landis SH, Kitsa P, Tshefu AK, Meshnick SR. High-Throughput Pooling and Real-Time PCR-Based Strategy for Malaria Detection. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 512–9.

Van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971; 15: 232—6.

Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and hiding. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 209–18.

Veron V, Simon S, Carme B. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol* 2009; 121: 346-51.

Vivier E, Desportes I. Apicomplexa. In *Handbook of Protoctista* (Ed. L. Margulis, J. Corliss, M. Melkonian, and D. Chapman), Boston: Jones and Bartlett; 1989.

Waters AP e McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet* 1989; 1: 1343-6.

Welch SG, McGregor IA, Williams K . The Duffy blood group and malaria prevalence in Gambian West Africans. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1977; 71: 295–6.

Westreich DJ, Hudgens MG, Fiscus SA, Pilcher CD. Optimizing screening for acute human immunodeficiency virus infection with pooled nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1785-92.

White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 172-3.

WHO. Malaria diagnosis; memorandum from a WHO meeting. *Bull WHO* 1988.

WHO. 2000. New perspectives. Malaria. Diagnosis. Report of a joint WHO/ USAID informal consultation, 25–27 October 1999. WHO, Geneva, Switzerland.

WHO. World Malaria Report 2009. World Health Organization 2009; 66.

WHO, Western Pacific Region. Towards quality testing of malaria rapid diagnostic tests: evidence and methods. WHO, Western Pacific Region, Manila, Philippines. 2006.

Woolsey G. Transfusion for pernicious anaemia: two cases. *Ann Surg* 1911; 53: 132-5.

ANEXOS

ANEXO I

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:..... CEP:..... FONE:DDD(.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:..... CEP:..... FONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Validação de PCR em tempo real e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala.

PESQUISADOR : Silvia Maria Di Santi

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Científico

INSCRIÇÃO CRBio: 01078-01

UNIDADE DO HCFMUSP: Moléstias Infecciosas e Parasitárias

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X) RISCO MÉDIO () RISCO BAIXO () RISCO MAIOR ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a obter um método de diagnóstico de malária para grande número de amostras. Na parte inicial deste estudo, precisamos avaliar se os testes que vamos utilizar são adequados, e para isso serão realizados exames com sangue colhido de pacientes com malária, como é o seu caso.

2 – Serão realizados exames com novas técnicas chamadas PCR, além de testes para verificar a presença de anticorpos que existem em pessoas que tiveram ou têm malária. Estes tipos de exames são diferentes daqueles que são utilizados para diagnóstico de malária rotineiro, sendo utilizados somente em estudos.

3 – Será coletado um tubo de 5 ml de sangue da veia do antebraço, e todo o material utilizado é descartável.

4 – O senhor (a) sentirá apenas o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado;

5 – Embora não haja benefício direto para o participante, trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que algumas técnicas poderão ser usadas para detectar malária em grande número de amostras, e somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício;

6 – Não há outro procedimento que possa ser vantajoso para o senhor (a) optar quanto à coleta de sangue.

7 – Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Silvia Maria Di Santi, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 4º andar, Ambulatório dos Viajantes, no Laboratório de Malária, no telefone 3069-8025. Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26, Email: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – o senhor (a) terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa;

11 – Não há despesas pessoais para o senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo, porém solicitamos sua concordância em armazená-la para eventuais estudos posteriores, assegurando que estes serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa.

"Estou ciente das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Validação de PCR em tempo real e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala." Eu discuti com a Dra. Silvia Maria Di Santi sobre a minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Concordo que a amostra de sangue colhida seja armazenada para eventuais estudos, respeitadas as normas para tanto".

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO II

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE: CEP: FONE: DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº: APTO:
BAIRRO: CIDADE: CEP: FONE: DDD(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Validação de PCR em tempo real e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala.

PESQUISADOR : Silvia Maria Di Santi

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Científico

INSCRIÇÃO CRBio: 01078-01

UNIDADE DO HCFMUSP: Moléstias Infecciosas e Parasitárias

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X)

RISCO MÉDIO ()

RISCO BAIXO ()

RISCO MAIOR ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a obter um método de diagnóstico de malária para grande número de amostras. Na parte inicial deste estudo, precisamos avaliar se os testes que vamos utilizar são adequados, e para isso serão realizados exames com sangue colhido de pessoas sem malária, como é o seu caso, como controle negativo.

2 – Serão realizados exames com novas técnicas chamadas PCR, além de testes para verificar a presença de anticorpos que existem em pessoas que tiveram ou têm malária. Estes tipos de exames são diferentes daqueles que são utilizados para diagnóstico de malária rotineiro, sendo utilizados somente em estudos.

3 – Será coletado um tubo de 5 ml de sangue da veia do antebraço, e todo o material utilizado é descartável.

4 – O senhor (a) sentirá apenas o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado;

5 – Embora não haja benefício direto para o participante, trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que algumas técnicas poderão ser usadas para detectar doadores de sangue com malária, e somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício;

6 – Não há outro procedimento que possa ser vantajoso para o senhor (a) optar quanto à coleta de sangue.

7 – Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Silvia Maria Di Santi, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 4º andar, Ambulatório dos Viajantes, no Laboratório de Malária, no telefone 3069-8025. Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, tel: 3089-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3089-6442 ramal 28, Email: cappesq@hcnnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles;

10 – O senhor (a) terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

11 – Não há despesas pessoais para o senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo, porém solicitamos sua concordância em armazená-la para eventuais estudos posteriores, assegurando que estes serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Estou ciente das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Validação de PCR em tempo real e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em pool, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala". Eu discuti com a Dra. Silvia Maria Di Santi sobre a minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Concordo que a amostra de sangue colhida seja armazenada para eventuais estudos, respeitadas as normas para tanto".

Assinatura do participante/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____