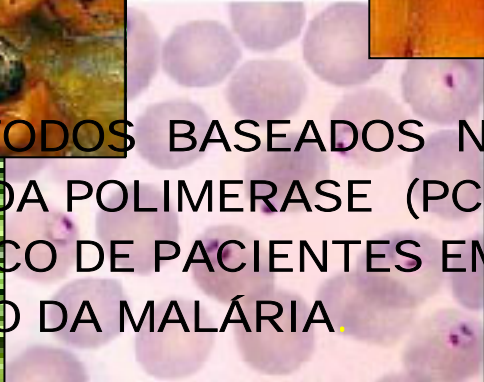


ROSANA DE ALBUQUERQUE MONTENEGRO



AVALIAÇÃO DE MÉTODOS BASEADOS NA
REACÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR),
PARA O DIAGNÓSTICO DE PACIENTES EM
TRATAMENTO DA MALÁRIA.



RECIFE
2002

ROSANA DE ALBUQUERQUE MONTENEGRO

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS BASEADOS NA REAÇÃO EM
CADEIA DA POLIMERASE (PCR), PARA O DIAGNÓSTICO DE
PACIENTES EM TRATAMENTO DA MALÁRIA.**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Biofísica e Radiobiologia
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito final para obtenção do
grau de Mestre.

**Orientadores: Dra. Haiana Charifker Schindler
Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath**

**RECIFE
2002**

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS BASEADOS NA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), PARA O DIAGNÓSTICO DE PACIENTES EM TRATAMENTO DA MALÁRIA.

ORIENTADORES:

Dra. Haiana Charifker Schindler

Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath

EXAMINADORES:

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Dra. Mércia Eliane Arruda

Dra. Teresa Jansem A. Catanho

SUPLENTE:

Dra. Constança Clara G. Simões Barbosa

Dr. Carlos Manoel Machado Carneiro

AVALIAÇÃO:

Aprovada

Reprovada

“ Só fazemos melhor aquilo que repetidamente insistimos em melhorar. A busca da excelência não deve ser um objetivo. E, sim, um hábito”.

Aristóteles (384-322 a.c)

*Dedico este trabalho ao meu
Pai, pelo seu exemplo de amor e
dedicação à medicina. Minha
profunda admiração.*

*Por trilhar os caminhos por você
ensinados, cheguei até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência e por descobrir a cada dia Sua presença em minhas conquistas;

À minha família, em especial a minha querida mãe, pelo seu amor, apoio e dedicação incondicional que dela recebi durante toda minha vida. Aos meus irmãos, minha maior torcida, pela união e amor essencial durante a jornada da vida;

À minha orientadora, Dra. Haiana Charifker Schindler, que me iniciou no “mundo” científico, obrigada pela amizade, respeito, confiança, oportunidade de trabalho e ensinamentos recebidos, ao longo de todos esses anos, e sobretudo exemplo de competência e profissionalismo, minha grande admiração;

Ao meu orientador, Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath, a quem admiro pela sua sabedoria, competência e dedicação, essenciais ao desenvolvimento dessa pesquisa, e a todo apoio, amizade e compreensão recebidos. Meus eternos agradecimentos;

À minha grande amiga e companheira Lílian Maria Lapa Montenegro, pela sua dedicação, assistência, otimismo, e convívio saudável e alegre, sobretudo pela amizade que se estabeleceu ao longo de sete anos de convivência, e por compartilhar passo a passo na construção desse trabalho, minha eterna gratidão e amizade;

Ao colaborador Dr. Marcelo Camargo, do Núcleo Avançado da USP, em Monte Negro- Rondônia, por nos ter oferecido toda a infra-estrutura do seu laboratório, pela sua disponibilidade e atenção que recebemos durante a realização do trabalho de campo. Agradeço ainda, a toda sua equipe de estudantes, futuros pesquisadores, que nos ajudaram tornando menos árduo esta etapa;

Ao Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, pela idéia inicial desta pesquisa, diretor no período da execução do trabalho e ao Dr. Rômulo Maciel Filho, atual diretor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), por facultar o uso das instalações dessa instituição;

À Coordenação do Mestrado em Biofísica e Radiobiologia (UFPE), Profa. Dra. Tereza Janssem pelo empenho na condução do curso, e à secretária Valéria pela constante disponibilidade e apoio;

Aos pesquisadores Sinval Brandão Filho e Mércia Arruda, pelo carinho, apoio científico, e constante ajuda durante a realização do trabalho .

Aos pesquisadores e técnicos do Departamento de Imunologia do CPqAM pela força e colaboração;

Aos amigos estagiários do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, pelo constante incentivo e apoio, e em especial a Eduardo Nascimento e Wagner Lucena, por ter doado sangue para esta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos;

Ao meu amigo Fábio Lopes de Melo pela grande amizade, incentivo, companheirismo, pelos momentos de descontração e contribuição para realização desse trabalho. Minha eterna amizade;

Às minhas amigas, Edeneide Xavier, Kirte Teixeira e Renata Costa Souza, pela amizade, pelo constante apoio, companheirismo em todos os bons e difíceis momentos, e pela colaboração técnica indispensável na formatação da dissertação;

A Eduardo Henrique, meu amigo-irmão, pelo seu constante estímulo, não me deixando desanimar frente às dificuldades enfrentadas;

À Andrea Santos, pela amizade, seriedade no trabalho em equipe e valiosa contribuição técnica na etapa do laboratório;

A Antônio Araújo, pelo importante incentivo e ensinamentos que foi de grande ajuda na seleção do mestrado, e pelo companheirismo nos momentos de alegria e tristeza que passamos juntos;

A Ulisses Montarroyos, do Núcleo de Informática (NICC), do CPqAM, pelo auxílio na análise estatística;

Ao motorista Müller, do Núcleo Avançado da USP, em Monte Negro-Rondônia, que bravamente nos conduziu e auxiliou no pesado trabalho de campo;

À Conceição da copiadora do CPqAM pelo empenho em sempre atender aos insistentes pedidos de cópias;

À FIOCRUZ, à CAPES e à UFPE pelo suporte financeiro indispensáveis para realização deste trabalho.

À todos os pacientes por nós atendidos, que nos ajudaram a crescer humana e profissionalmente e pela confiança depositada nos profissionais de saúde e na pesquisa.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. HISTÓRICO.....	2
1.2. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL.....	3
1.3. BIOLOGIA DO PARASITO E DO MOSQUITO VETOR.....	7
1.4. TRANSMISSÃO.....	9
1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	10
1.6. TRATAMENTO E CONTROLE.....	11
1.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA MALÁRIA.....	13
1.7.1. Clínico.....	13
1.7.2. Laboratorial.....	14
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	30
6. ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucléico trifosfato
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ES	Esfregaço Sanguíneo
Fg	Fentograma
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GE	Gota espessa
HNPCR	Hemi Nested da Reação em Cadeia da Polimerase
KCL	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ng	Nanograma
μl	microlitro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	pares de bases
pg	picograma
pmol	picomol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIACM	Programa de Controle da Malária na Amazônia Legal
USP	Universidade de São Paulo
QBC	Quantitative Buffy Coat
RNA	Ácido Ribonucléico
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico

rRNA	Ácido Ribonucléico ribossomal
SSU rRNA	Pequena Subunidade do Ácido Ribonucléico ribossomal
STHNPCR	Hemi nested da Reação em Cadeia da Polimerase em um único tubo de reação
Taq DNA Polimerase	DNA polimerase isolada de <i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCL	[Tris (hidroximetil) aminometano] com pH ajustado por HCL concentrado
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

1. REVI SÃO BI BLI OGRÃFI CA

1.1. HISTÓRICO

Relatada desde a mais remota antigüidade, a malária é atualmente uma das principais endemias conhecida pelo homem. Possivelmente seja mais antiga que a humanidade, visto que esses parasitos foram encontrados em répteis do período Permiano e Triássico. No Egito múmias com mais de 3 mil anos de idade apresentavam esplenomegalia e vários faraós morreram da “Febre do Nilo”. Pessoas como Cleópatra e o Imperador Alexandre “o Grande” contraíram essa doença, levando-o a óbito (Pessoa & Martins, 1988; Deane, 1992; Boulos, 1998; Rey, 2001a).

Em várias outras partes do mundo, como a China no ano de 2700 a.C. e a Índia entre 1500 a 800 a.C., já se mencionavam febres intermitentes terçã e quartã com esplenomegalia. Na Grécia, os relatos apontam a malária como conhecida desde 1000 anos antes de Cristo, onde foi bem caracterizada pelos médicos gregos que descreveram os tipos febris cotidiano, terçã e quartã. Nos anos entre 314 a 370 a.C., Hipócrates foi o primeiro a associar a esplenomegalia e hepatomegalia com a doença e a relacionar a cura do doente com a diminuição do baço e fígado. Ele observou também a coloração escura das vísceras, que 22 séculos depois levou Meckel em 1874 a demonstrar ser devido a um pigmento. Virchow em 1874 demonstrou ser intracelular e Laveran 1880 descobriu os plasmódios e recebeu o Prêmio Nobel de 1907 (Pessoa & Martins, 1988; Deane, 1992).

Por sua vez o médico italiano Giovanni Maria Lancisi em 1717 sugeriu que a transmissão das febres intermitentes se dava por mosquitos ligados aos pântanos. Muitos outros pesquisadores como Alphonse Laveran (1884), Robert Koch (1892) e Patrick Manson (1894) aceitaram a idéia baseados no fato de que no sangue retirado de um doente, só depois de algum tempo, aparecem os “flagelos”, que nunca se encontram na circulação sangüínea (Deane, 1992).

Ronald Golgi e colaboradores, em 1885, descreveram o ciclo assexuado do parasita e correlacionaram as várias formas, que aparecem no sangue, com os tipos clínicos da malária. O ciclo esporogônico foi demonstrado por Manson em 1894. Esse mesmo pesquisador em 1898 observou os primeiros estágios de desenvolvimento dos parasitas da malária humana em mosquitos, porém não descreveu o ciclo completo. A transmissão da malária através dos mosquitos foi elucidada por Ronald Ross em 1897. Por essa descoberta ele recebeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1902. Em 1898 os italianos, Grassi, Bastianelli e Bignami em 1899 descreveram, pela primeira vez, o desenvolvimento completo do parasito da malária nos anofelinos. Entre 1898 e 1899 conseguiram demonstrar o ciclo sexuado das três formas de malária. A descoberta dos transmissores da malária levou imediatamente a tentativas de seu controle (Pessoa & Martins, 1988; Deane, 1992).

Muito antes, porém, o mosquito era considerado apenas como possível transmissor da doença. Em Roma, a malária muitas vezes era associado ao pântano. Os romanos não só ligavam a malária aos pântanos como os drenavam para reduzir a prevalência da doença. A maior contribuição romana veio de Marcus Terentius Varro, no ano 35 a. C., que fez referência às febres intermitentes como sendo causadas por seres pequeníssimos, invisíveis, existentes no ar dos pântanos. Outro romano, Lucius Junius Columella no ano 50 d.C., usando o mesmo conceito, acrescentou que os pântanos criavam insetos que atacam com seus ferrões (Boyd, 1949, Deane, 1992).

1. 2. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

Nos últimos anos a malária adquiriu particular importância, devido à extensa distribuição geográfica e à sua atuação como fator limitante do

crescimento demográfico, cultural e econômico em vastas áreas do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (Veronesi & Focaccia, 1997).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 2,4 bilhões de pessoas, equivalente a 40% da população mundial, vivem em áreas onde há risco de transmissão da malária, abrangendo 90 países. A prevalência mundial está estimada em 300 a 500 milhões de casos clínicos por ano, sendo que noventa por cento das mortes ocorrem na África Tropical, região situada ao sul do Deserto do Saara- principalmente entre crianças pequenas (Bremen, 2001; Greenwood & Mutabingwa, 2002).

Estima-se que ocorram de 1,5 a 2,7 milhões de óbitos por ano, a grande maioria na África. Aproximadamente 1 milhão destas mortes ocorrem em crianças abaixo de 5 anos de idade, sobretudo em áreas rurais distintas com acesso precário aos serviços de saúde, tendo como causa única a malária ou a mesma associada a outras doenças como diarreia, pneumonia e desnutrição. Considera-se que os países da África Tropical contribuem com mais de 90% das mortes (WHO, 2001). Nos últimos anos, várias reuniões internacionais de organismos ou financiadores de programas de saúde, liderados pela OMS, reafirmaram ser a malária questão prioritária no mundo e particularmente na África, ao sul do Saara (Rey, 2001b).

A malária mata uma criança a cada 30 segundos na África. Muitas crianças que sobrevivem a episódios de malária grave podem sofrer de incapacidades de aprendizagem ou lesões cerebrais. Mulheres grávidas e seus bebês são especialmente vulneráveis a malária, que é uma causa importante de mortalidade perinatal, baixo peso à nascença e anemia materna. O *Plasmodium falciparum* é o mais frequente na África sendo responsável em grande parte pela elevada mortalidade nesta região. Do total de número de casos registrados anualmente pela OMS (excluindo a África) mais de 2/3 estão concentrados em apenas 6 países: Índia, Brasil, Sri Lanka, Afeganistão,

Vietnã e Colômbia. Em cada um destes países a malária está concentrada em determinadas áreas (WHO, 1994; WHO, 2002).

A incidência da malária predomina nos países tropicais da África, Ásia, América Latina e Caribe, em áreas de fronteiras de desenvolvimento econômico, de conflito armado, de comércio ilegal e de movimentos migratórios de trabalhadores ou de refugiados. Predomina, ainda, em países endêmicos que nunca chegaram a desenvolver programas nacionais de controle da doença, como é o caso da maioria dos países africanos situados ao sul do Saara (Figura 1) (Veronesi & Focaccia, 1997).

De acordo com a espécie do plasmódio, a malária está distribuída em áreas distintas: nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, expostas a níveis de transmissão moderada ou baixa, os *P. vivax* e *P. falciparum* são os agentes habituais. Também no sul da Ásia, essas espécies são responsáveis por focos de transmissão estáveis, em geral com baixa taxa de incidência. Transmissão de grande intensidade, envolvendo *P. falciparum* e *P. vivax*, ocorre em quase toda África tropical, com exceção dos desertos, de lugares muito elevados e algumas zonas urbanas, ocorrem ainda o *P. malariae* e *P. ovale*. O *P. malariae* é encontrado na maioria das áreas, porém é bem menos comum. O *P. ovale* é relativamente raro fora da África (Pessoa & Martins, 1988; Rey, 2001c).

No Brasil a malária acometia cerca de seis milhões de brasileiros por ano na década de 1940, em todas as regiões do país. As mudanças sociais ocorridas e o intenso trabalho de controle desenvolvido por meio da Campanha de Erradicação da Malária – CEM, possibilitaram o relativo controle da doença, passando a apresentar uma ocorrência de menos de 100 mil casos anuais e restringindo-se às áreas de proximidade da floresta na Amazônia Legal, que corresponde aos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (FUNASA, 2001).

A penetração de grandes espaços da Amazônia foi intensificada nos anos 70 e 80, acelerando o processo migratório de indivíduos procedentes de Estados das outras macro-regiões brasileiras, atraídos por projetos de colonização, agropecuários, abertura de rodovias, hidrelétricas e pela mineração (Marques & Gutierrez, 1994).

Atualmente, a incidência da malária no país está concentrada nos estados da Amazônia Legal, com mais de 99% dos casos registrados. Trata-se de uma região onde predomina a floresta tropical úmida, intercrizada por complexa malha hidrográfica, de elevada pluviosidade, temperatura anual média elevada e de relevo pouco acidentado (Escobar, 1994). Possui características geográficas e ecológicas altamente favoráveis à interação do plasmódio e do anofelino vetor, favorecendo a transmissão perene da malária, com exacerbações da endemia e surtos epidêmicos nas áreas periféricas de ocupação (Tauil, 1986).

Nesta região, a malária não está homoganeamente distribuída, incidindo principalmente em populações vivendo em condições insatisfatórias de habitação e trabalho. Estas populações estão relacionadas à ocupação desordenada de terras, à exploração manual de minérios, à projetos de assentamento e colonização agrária e à intensa migração da zona rural para a periferia das cidades (OPAS, 2000).

Considerando-se a capacidade de combinação destes fatores que participam da transmissão e a evolução da doença, podem ser identificados estratos de risco (alto, médio, baixo e sem risco) no território brasileiro. No primeiro, a incidência é muito elevada, em torno de 70 casos por 1.000 habitantes, no de médio risco, de 5 por 1.000, no de baixo risco, esta incidência cai para 0.1 por 1.000 e é zero na região extra-amazônica, ou seja, sem risco de transmissão (Figura 2) (Marques & Gutierrez, 1994). A notificação de malária é feita com base no resultado positivo do exame periférico de sangue. O ano de 1999 apresentou uma elevação importante no número de casos de malária além das frequências mensais usuais, atingindo cerca de 73 mil casos no mês

de pico (agosto) e totalizando o ano com mais de 632 mil casos da doença. Este fato alertou as autoridades do setor saúde do Brasil e desencadeou uma série de ações intensificando o controle na região Amazônica. Essas ações inverteram a tendência de crescimento na Amazônia Legal, propiciando uma redução de 3,8% no número de casos de malária registrados no ano de 2000. Neste ano, foram notificados 608.678 casos da doença em todo o Brasil, sendo 522.539 casos somente na região Norte (Amazonas, Pará e Rondônia, responsáveis por 76% dos casos relatados) prevalecendo as infecções *pelo P. vivax* (80,8%) e *P. falciparum* (19,2%), 79.228 no Nordeste, 6.192 no Centro-Oeste, 515 no Sudeste e 204 na região Sul do país (FUNASA, 2001a,b). Em 2001, foram registrados 387.330 casos de malária no país (Agência Brasil, 2002) .

Nos estados das demais regiões do país, os casos registrados são quase totalmente importados da região amazônica ou de outros países onde ocorre transmissão (FUNASA, 2001).

1.3. BIOLOGIA DO PARASITO E DO MOSQUITO VETOR

No homem, a malária é causada por parasitos que estão classificados no filo *Protozoa*, classe *Sporozoa*, família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium*, ao qual pertencem quatro espécies: *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium vivax* (Grassi e Feletti, 1890), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897). Destas quatro espécies, o *P. vivax* é o mais amplamente distribuído pelas zonas tropicais e subtropicais do globo. O *P. falciparum* comparado às outras espécies, causa maior morbidade e mortalidade, e apresenta-se hoje com grave problema terapêutico, devido à crescente resistência à cloroquina e outras drogas, já verificada na maioria das zonas endêmicas conhecidas.

Os parasitos são transmitidos de uma pessoa a outra através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (*Diptera: Culicidae*). Só as fêmeas são transmissoras naturais pois elas são hematófagas. Os machos alimentam-se de néctar e sucos vegetais. Esse gênero compreende cerca de 400 espécies, das quais apenas 60 são transmissores naturais e 30 são de maior importância epidemiológica (Bruce Chuwatt, 1985). Na região Neotropical existem várias espécies que são vetores primários de plasmódios humanos, entre eles podemos citar: *Anopheles darlingi*, *An. deaneorum*, *An. albitarsis*, *An. trunzevari*. Na África do sul ao sul do Saara os vetores principais são *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus*. O *An. darlingi* é o de maior importância epidemiológica pela sua grande distribuição no território nacional, atingindo todo o interior do país, pelo alto grau de antropofilia e endofagia (Veronesi & Focaccia, 1997).

Os anofelinos se reproduzem na água, onde além dos ovos vivem larvas e as pupas. Têm como criadouros preferenciais coleções de água limpa ou salobra, quente, sombreada e de baixo fluxo, situação muito frequente na Amazônia.

O ciclo evolutivo de todas as espécies de *Plasmodium* é complexo. Ao picar um homem suscetível, os mosquitos do gênero *Anopheles* inoculam na corrente sanguínea, junto com a saliva, os esporozoítas (forma infectante). Esta forma permanece no sangue por até 30 minutos até alcançarem o fígado e penetrar nos hepatócitos, onde evoluem (ciclo exoeritrocitário). Este processo é concluído após um período variável, de acordo com a espécie infectante; multiplicando-se de forma assexuada, cada esquizonte dará origem a milhares de merozoítas (de 10 a 40 mil), que ganham os capilares intra-hepáticos. Os merozoítas liberados invadirão os eritrócitos, passando a denominar-se trofozoítos, multiplicam-se novamente produzindo cerca de 8-32 novos merozoítas (dependendo da espécie), dentro de um esquizonte. A esquizogonia eritrocítica requer aproximadamente 36-48 horas para *P. falciparum*, 48 horas para *P. vivax* e *P. ovale*, 72 horas para *P. malariae*.

Há, então ruptura das células infectadas, com liberação dos merozoítas, que invadem outros glóbulos vermelhos e dão origem as manifestações clínicas da doença (Figura 3). As manifestações clínicas da malária, sobretudo febre, calafrio e anemia, estão associadas com a ruptura sincrônica dos eritrócitos infectados. Porém, no caso do *P. ovale* e *P. vivax*, algumas formas – os hipnozoítas – permanecem latentes no fígado, por meses ou anos, sendo responsáveis por recaídas.

Alguns merozoítas diferenciam-se em gametócitos “femininos” e “masculinos” (macrogametócitos e microgametócitos, respectivamente). Estes gametócitos poderão ser sugados por uma fêmea do *Anopheles* durante um repasto sanguíneo, e seguirão seu desenvolvimento no mosquito vetor, produzindo um zigoto, que vai desenvolver uma forma invasiva, o oocineto, que caminha para a parede do estômago se transformando num oocisto. Com o início da fase de esporogonia, esse oocisto cresce e se divide, produzindo milhares de esporozoítas, que migram pelo corpo e invadem as glândulas salivares do mosquito, estando em condições de serem injetados, através de sua picada, em outro hospedeiro.

1.4. TRANSMISSÃO

A transmissão é produzida como resultado de fatores de natureza biológica, ambiental, socioeconômica e cultural. O parasita, o mosquito transmissor e o homem constituem-se nos elementos primários da transmissão. São influenciados pelas características do ambiente, condições de vida, moradia e trabalho das populações (Tauil, 1986).

Como vimos anteriormente, em condições naturais, a transmissão da malária ocorre por meio de picadas de mosquitos infectados. Contudo, pode ser transmitida de maneira acidental, como resultado de transfusão sanguínea

cujo doador esteja infectado ou entre dependentes de droga injetável, que partilham o uso de seringas contaminadas. Apesar de pouco freqüente, a transmissão congênita pode ocorrer em filhos de mães infectadas (Hulbert, 1992). A baixa freqüência desta transmissão tem sido explicada com base na eficiência da barreira placentária e na imunidade adquirida pelas mulheres em zonas endêmicas (Veronesi & Focaccia, 1997)

1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dependendo da espécie de plasmódio infectante e do grau de imunidade do hospedeiro humano, a malária apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas. Geralmente, as infecções causadas pelo *P. vivax*, *P. malariae*, ou *P. ovale* são benignas e com mortalidade praticamente ausente. Entretanto, as causadas pelo *P. falciparum*, apresentam um quadro clínico geralmente grave, com inúmeras complicações e significativa mortalidade, particularmente em hospedeiros não–imunes. (Kreier, 1980a) .

O período de incubação varia de acordo com a espécie de plasmódio de 8 a 30 dias. O paroxismo febril inicia-se com calafrios, de maior ou menor intensidade e duração, dependendo da gravidade do quadro e da espécie de plasmódio envolvida. Durante o período de calafrios, em geral por poucas horas, os doentes tem a sensação de mal estar, cefaléia, dores musculares e articulares generalizadas e manifestações digestivas, tais como náuseas, vômitos e dor abdominal intensa (Burattini, 1999).

Após a fase inicial, a febre assume um caráter intermitente, dependendo do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum* e *P. vivax* (malária terça) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã). Entretanto, a constatação desta regularidade é pouco comum

nos dias atuais, em decorrência do tratamento precoce, realizado na fase de assincronismo das esquizogonias sanguíneas, pela infecção por populações distintas de plasmódio e infecção em primo-infectados por retardo da resposta imune específica (FUNASA, 2001d).

Com a instalação do quadro infeccioso, surgem anemia e hepatoesplenomegalia, que vão acentuando-se com a evolução da enfermidade. As formas clínicas mais graves associadas ao *P. falciparum*, favorece o comprometimento do sistema nervoso central, determinando a malária cerebral, que é responsável pela maioria das mortes. A doença cursa com acentuado comprometimento do estado geral e com freqüência leva à manifestações cerebrais, renais, hepáticas, pulmonares e gastrointestinais (Philipps & Solomon, 1990).

1. 6. TRATAMENTO E CONTROLE

O tratamento da malária visa a interrupção da esquizogonia sanguínea, responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipnozoítas) da espécie *P. vivax*, evitando assim recaídas, como também à redução de fontes de infecção, pelo uso de drogas que eliminam as formas sexuadas dos parasitos (FUNASA, 2001c)

A decisão de como tratar o paciente com malária deve ser precedida de informações sobre os aspectos da gravidade da doença, espécie de plasmódio, idade do paciente, história de exposição anterior à infecção e susceptibilidade dos parasitos aos antimaláricos convencionais (FUNASA, 2001c) .

Um dos antimaláricos mais utilizados do mundo é a cloroquina, droga que atua como esquizonticida eritrocitário nas quatro espécies de plasmódio que parasitam o homem, atuando como gametocida nas infecções pelo *Plasmodium vivax* e *P. malariae* (Gomes, *et al.*, 2001). Em associação com a cloroquina, no tratamento de *P. vivax*, é utilizada a primaquina, para evitar recidivas, pois suprime as formas tissulares hepáticas nos indivíduos tratados, e é ativa contra gametócitos de todas as espécies de malária humana (WHO, 1991a).

Nas infecções pelo *P. falciparum*, em áreas que apresentam resistência a cloroquina, é recomendado o tratamento com quinino que atua como esquizonticida sanguíneo, em associação com o antibiótico doxiciclina ou tetraciclina (FUNASA, 2001c).

Na primeira década de 1980, na Amazônia brasileira, foi introduzida a mefloquina como tratamento de primeira linha de infecções por *P. falciparum*, sendo considerado o medicamento de melhor atuação pelo fato de levar ao rápido desaparecimento das formas assexuadas (Silveira & Rezende, 2001).

Os derivados da artemisina (artesanato ou artemeter), estão entre as mais novas e eficazes drogas antimaláricas. Podem levar a uma rápida diminuição da parasitemia e continuam sendo reservados para a malária grave com complicações (WHO, 1994b).

A resistência do *P. falciparum* a diversos antimaláricos, vem tornando o seu tratamento um dilema para o médico e um desafio para as autoridades de saúde responsáveis pelo controle da malária (OPAS/OMS, 2000).

Uma nova estratégia global de luta contra a malária, foi introduzida pela Organização Mundial de Saúde, durante a Conferência Ministerial em Malária, realizada na Holanda, em 1992. Os primeiros elementos básicos referidos pela OMS, foram o diagnóstico precoce e o tratamento rápido (WHO, 1992). Com esta iniciativa, é alcançada uma importante conquista no Brasil, com a redução das formas graves, associadas ao *P. falciparum*, que se reflete

no declínio da mortalidade por malária (FUNASA, 2001). Com o objetivo de reverter a tendência de crescimento dos casos de malária registrados no ano de 1999, o Ministério da Saúde, por intermédio da FUNASA, lançou um Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Região Amazônia (PIACM). O investimento total foi da ordem de R\$ 145,7 milhões, e as estratégias estão baseadas na descentralização do diagnóstico e tratamento para os estados e municípios, de forma a ampliar e tornar mais rápido o acesso das populações da Amazônia, no reforço das ações de combate ao vetor (borrifações domiciliares), além de intervenções ambientais (drenagem e limpeza de igarapés) nas áreas urbanas acometidas por malária, como Manaus e Porto Velho (FUNASA, 2001). Em 2002, a meta da FUNASA é reduzir a malária em mais 30% dos casos em relação a 2001 (Agência Brasil, 2002)

Visando obter uma medida definitiva no controle da endemia, o desenvolvimento de vacinas contra a malária tem sido, nos últimos 20 anos, um dos alvos principais da investigação científica na luta contra esta doença (Veronesi & Focaccia, 1997).

1.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA MALÁRIA

1.7.1. Clínico

Por orientação dos programas oficiais de controle, em situações de epidemia e em áreas de difícil acesso da população aos serviços de saúde, indivíduos com febre são considerados portadores de malária. Entretanto, os sintomas da malária são extremamente inespecíficos, não se prestando à distinção entre a malária e outras infecções agudas do homem. Além disso, indivíduos semi-imunes ao plasmódio podem ter parasitos da malária sem

sintomas da doença. Portanto, o fundamental no diagnóstico clínico da malária, tanto nas áreas endêmicas como nas não endêmicas, é sempre pensar na possibilidade da doença. Como a distribuição geográfica da malária não é homogênea nem mesmo nos países onde a transmissão é elevada torna-se importante, durante a elaboração do exame clínico, resgatar informações sobre a área de residência ou relato de viagens indicativas de exposição ao parasito. Além disso, informações sobre transfusão de sangue ou uso de agulhas contaminadas podem sugerir a possibilidade de malária induzida (FUNASA, 2001c).

As principais afecções que fazem parte do diagnóstico diferencial são aquelas que tem uma evolução febril, apresentam hepatoesplenomegalia e podem cursar com anemia. Os sintomas iniciais podem ser confundidos com a influenza ou outras viroses autolimitadas, bastante comuns em zonas endêmicas de malária. Da mesma forma, deve ser diferenciada da leishmaniose visceral, esquistossomose, toxoplasmose aguda, febre tifóide, hepatite infecciosa, doença de chagas aguda, tuberculose miliar, e de outros processos febris (OMS, 1991).

1.7.2. Laboratorial:

O método parasitológico da gota espessa é o mais utilizado no diagnóstico laboratorial da malária. Referido por apresentar vantagens como a possibilidade da identificação da espécie e estágio de desenvolvimento do plasmódio infectante, ser quantificável e de baixo custo, tem com o limitações, além dos problemas inerentes aos cuidados técnicos no preparo dos reagentes, a limitada sensibilidade, principalmente em amostras de sangue com baixas parasitemias, e a necessidade de microscopistas bem treinados para confiabilidade dos testes (Ávila *et al.*, 1996).

Testes imunológicos baseados na detecção de anticorpos específicos contra o parasito, tem sido propostos como alternativos à gota espessa. Entretanto, além de apresentarem sensibilidade baixa, são incapazes de discriminar uma infecção passada de uma presente. Entre os testes sorológicos mais usados para a detecção de anticorpos contra a malária estão a imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), os quais podem ser úteis para inquéritos soropidemiológicos, com a determinação da endemicidade de uma determinada área ou a identificação de um provável foco da doença (Kreier, 1980b).

Nos últimos dez anos, métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos. O primeiro deles foi o QBC[®] (Quantitative Buffy Coat). É uma técnica que combina a concentração dos parasitos pela centrifugação do sangue em tubos de micro-hematócrito e a coloração dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) do parasito pelo fluorocromo laranja de acridina. É um teste sensível e específico, útil para bancos de sangue, principalmente de áreas endêmicas, porém é uma técnica de alto custo financeiro. Embora vários estudos tenham mostrado a eficiência do QBC para o diagnóstico da malária, análises mais recentes têm demonstrado que, embora mais rápido e mais objetivo, o QBC ainda não se mostrou superior à gota espessa no diagnóstico parasitológico da malária (FUNASA, 2001).

Um grande avanço na metodologia diagnóstica da malária foi conseguido a partir de 1993, com o desenvolvimento de ensaios rápidos baseados na captura qualitativa de um antígeno de *Plasmodium falciparum*. Conhecido comercialmente como ParaSight-F[®] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.), a proteína 2, rica em histidina (HRP2Pf), detecta apenas parasitos de *P. falciparum*. O ICT Malaria Pf /P.v (ICT Diagnostic, Sydney, Austrália), detecta tanto antígenos específicos de *P. falciparum* o (HRP2) como o antígeno pan-malarial encontrado em *P. falciparum* e *P. vivax*. Os trabalhos de Tham *et al.*, (1999) e Tjtra *et al.*, (2001) demonstraram resultados falsos-positivos de pacientes assintomáticos após o término do tratamento.

O OptiMAL (Flow Inc., Portland, Oreg.) utiliza anticorpos policlonais e monoclonais marcados com ouro e dirigidos contra a enzima desidrogenase do lactato, específica do parasita (pDHL), presente no sangue total do paciente. O OptiMAL diferencia as quatro espécies de *Plasmodium* associada com a malária humana (*P. vivax*, *P. falciparum* , *P. ovale* e *P. malariae*) (Iqbal, et al ., 1999). Apesar de ser rápido, prático e não necessitar experiência do técnico laboratorial, a literatura relata casos de diagnóstico falsos-positivos (Cooke *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001).

Com o avanço no desenvolvimento de tecnologias para o diagnóstico de doenças infecciosas baseadas na detecção dos ácidos nucleicos, várias técnicas de Biologia Molecular tem sido aplicadas no diagnóstico de infecções por espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (Weiss, 1995).

O rRNA ribossomal é, geralmente, o mais abundante em ácidos nucleicos, constituindo-se em alvo lógico para sistemas sensíveis de detecção diagnóstica. A seqüência da SSU rRNA (subunidade pequena) exibe considerável diversidade espécie-específica localizada. São essas regiões que representam os alvos e a base para o desenvolvimento de várias abordagens moleculares.

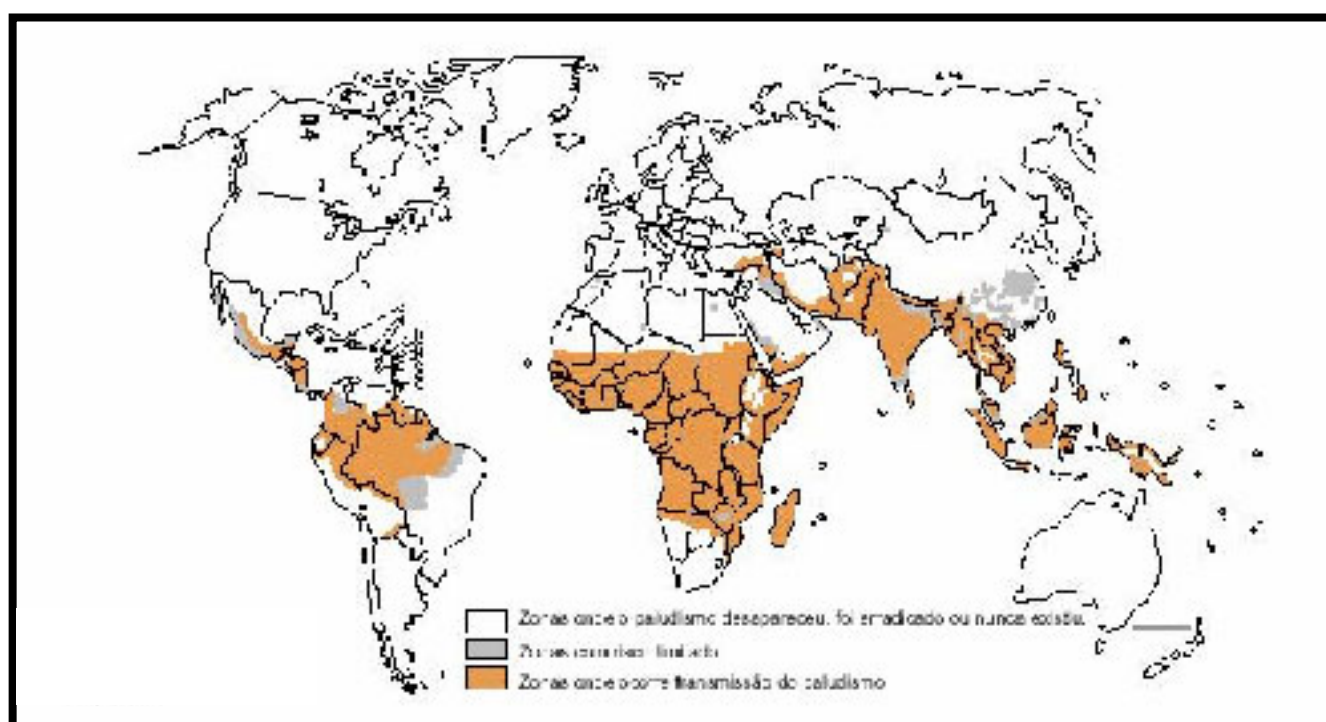
A subunidade pequena do rRNA representa cerca de 30% do RNA total e aproximadamente 70% do SSU rRNA do *Plasmodium* é diferente do SSU rRNA humano. Com a determinação da seqüência nucleotídica da subunidade pequena do ácido ribonucleico (SSU rRNA) plasmodial, foi possível o desenvolvimento de sondas espécie-específicas para a detecção de plasmódios (McCutchan *et al.*, 1988; Water & McCutchan, 1989; Snounou *et al.*, 1993).

A Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR), descrita por Kary Mullis, em 1985, é uma técnica que permite a síntese enzimática *in vitro* de seqüências específicas de DNA através do uso de dois oligonucleotídeos que hibridizam em fitas opostas. A reação consiste numa

série repetitiva de ciclos com diferentes temperaturas, às quais correspondem a desnaturação do DNA molde, ligação dos oligonucleotídeos e extensão dos mesmos pela enzima Taq DNA polimerase (Steffan & Atlas, 1991). Uma característica fundamental da PCR é que os produtos de um ciclo de amplificação servem como moldes para a síntese subsequente. Pela repetição destes ciclos, obtém-se uma síntese de DNA exponencial, já que em cada ciclo o número de segmentos de interesse é duplicado. Teoricamente, após 20 ciclos de amplificação, um milhão de cópias são obtidas (Erlich, 1989).

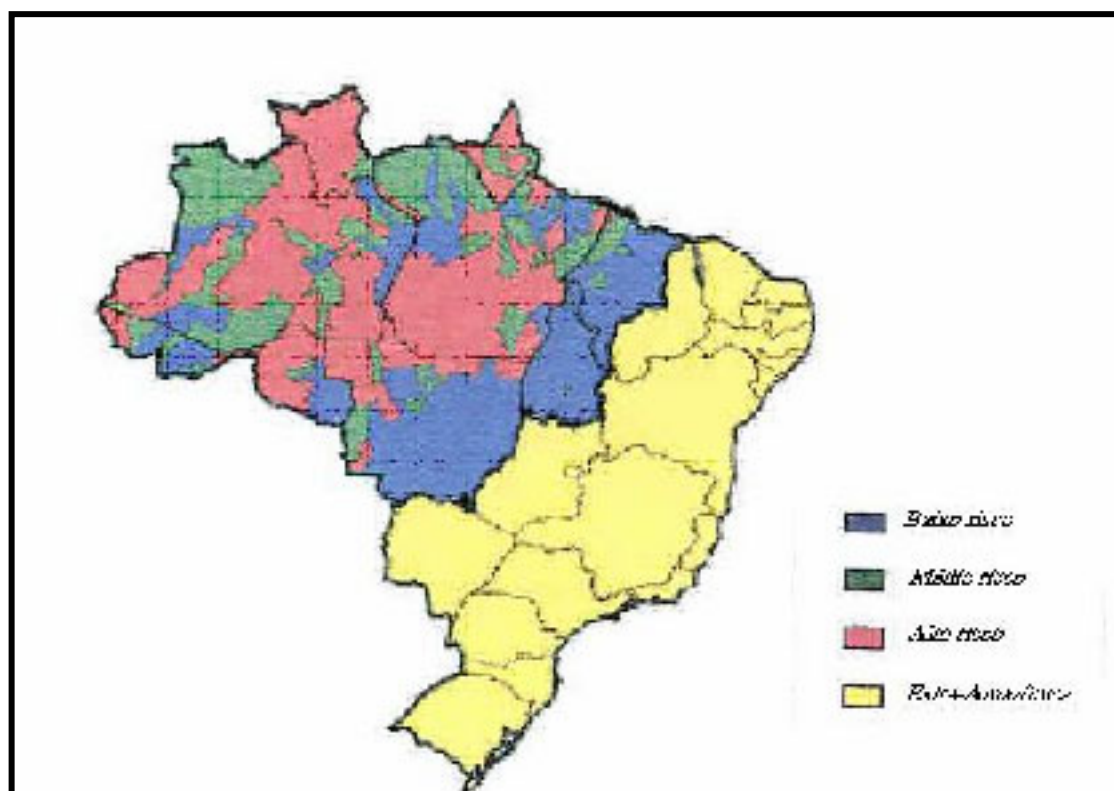
A “nested” PCR é uma variação da técnica de PCR, em que geralmente são necessários dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores da reação: na 1^o utiliza-se um par de oligonucleotídeos com homologia da região externa do DNA alvo e na segunda , que utiliza como molde o produto da 1^o reação, o outro par de oligonucleotídeos que tem homologia com a região mais interna.

As principais vantagens das técnicas baseadas em PCR na detecção de DNA são a sensibilidade com que podem detectar patógenos e a rapidez com que a identificação do parasito pode ser feita.



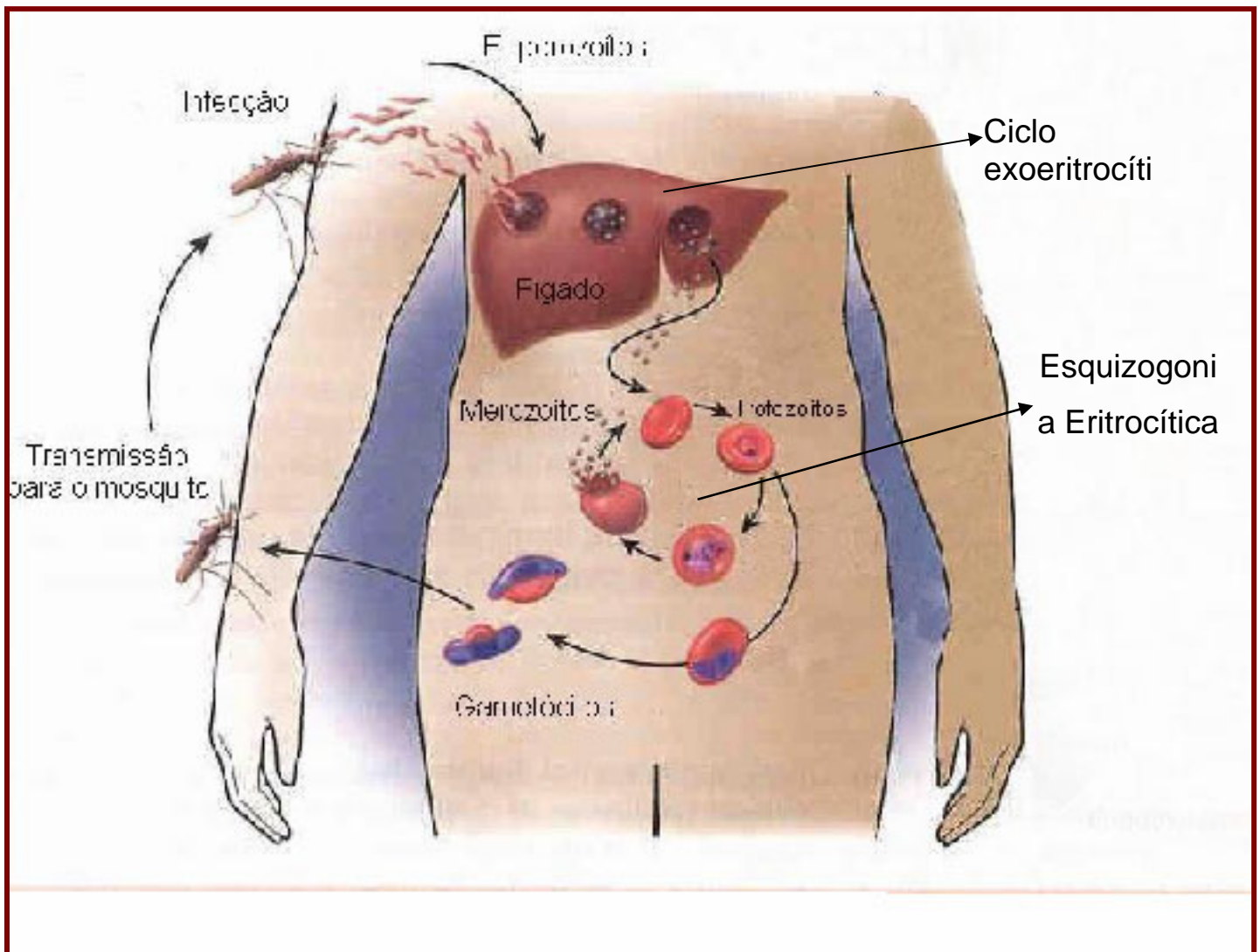
Fonte: OMS, 1999

Figura 1. Distribuição da malária no Mundo



Fonte: FUNASA, 1999

Figura 2. Situação da Malária no Brasil



Fonte: Adaptado de Miller *et al.*, 2002, *Nature*, v.415: 6872.

Figura 3. Ciclo Biológico do *Plasmodium* no homem

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA BRASIL. Saúde: Brasil reduz casos de malária em 40%. **O Povo o Jornal do Ceará**, 2002. (online) <http://www.noolhar.com/opovo/brasil/125929>.

ÁVILA, S.L.M., ARUK, V.G., BOCHETTI, M.G.G., TOZETTO-MENDOZA, T.R., SANCHEZ, M.C.A., BURLACHER, R.R., ORTIZ, M.L.N.C., FERREIRA, A.W. Avaliação de diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico de malária humana. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, a.5, n.4, p.32-43, 1996.

BOULOS, M. Desenvolvimento tecnológico não consegue deter epidemia. **Medicine: Conselho Federal**. Brasília, v.12, n.93, p.2, 1998.

BOYD, M.F. **Malariology**, Philadelphia: Saunders, 1949.

BREMEN, J. The ears of the hippopotamus: manifestation, determinants, and estimates of the malaria burden. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.64, n..(1,2)S, p.1-11, 2001.

BRUCE-CHWATT, B.L.J. **Essential Malariology**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons. 1985.

BURATTINI, M. N. Doenças Causadas por Parasitas: Malária. In:_____ **Atualização Terapêutica: Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 1999, p. 73-77.

COOKE, A.H., CHIODINI, P.L., DOHERTY, T., MOODY, A.H., RIES, J., PINDER, M. Comparasion of a parasite lactate dehydrogenase-based immunochromatographic antigen detection assay (OPTIMAL®) with microscopy fpr the detection of malaria parasite in human blood samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.60, n.2, p. 173-176, 1999.

DEANE, L.M. Os grandes marcos na História do controle da malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.25(supl. II), p.12-22, 1992.

ERLICH, H.A. **PCR technology**. Principles and applications for DNA amplification. New York: M Stockton Press, 1989, 246p.

ESCOBAR, A.L. **Malária no Sudoeste da Amazônia: uma Meta Análise**. 1994. 200f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro.

FUNASA, Situação da prevenção e controle das doenças de notificação compulsória e endêmicas no Brasil: **Malária, Brasília, DF, p.23-25, 2001**.

FUNASA, **Boletim eletrônico epidemiológico**. Doenças transmitidas por vetores. Brasília, DF, ano1, n.1, p.4, mar. 2001a.

FUNASA, **Boletim eletrônico epidemiológico**. Doenças de notificação compulsória. Brasília, DF, ano1, n.1, p.8, mar. 2001b.

FUNASA, **Vigilância epidemiológica**. Manual de Terapêutica da Malária. Malária. In: Brasília, DF. 2001c

FUNASA, **Malária**. 2001d (Online)

http://funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/malaria/index.htm.

GREENWOOD B., MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v.415, p. 670-672, 2002

GOMES, A . P., BATISTA, R. S., GONÇALVES, M. L. C., IGREJA, R. P. Malária. In:_____ **Medicina Tropical – Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica, 2001. Cap. 17, p. 149-163.

HULBERT, T.V. Congenital malaria in the United States: report of cases and review. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v,14, p.922-926, 1992.

IQBAL, J.; SHER, A.; HIRA, P.R.; AL-OWAISH, R.; Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3644-3646,1999.

KREIER, J.P. Malaria: epidemiology, chemotherapy, morphology, and metabolism. New York: **Academic Press**, v.1, 1980a.

KREIER, J.P. Malaria: immunology and immunization. New York: **Academic Press**, v.3, 1980b.

MARQUES, A.C., GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.27(suplemento III), p.91-108, out-dez, 1994.

McCUTCHAN, T.F., DE LA CRUZ, V.F., LAL, A.A., GUNDERSON, J.H., ELWOOD, H.J., SOGIN, M.L. Primary sequences of two small subunit ribosomal

RNA genes from *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.28, p.63-68, 1988.

PESSOA, S.B., MARTINS, A.V. Gênero *Plasmodium* – Parasitas da Malária: Histórico –Evolução – Cultura. In:____. **Parasitologia Médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. Cap.27, p.280.

PHILIPPS, R.E.; SOLOMON, T. Cerebral malaria in children. **Lancet**, London, v.336, p.1355-1360, 1990.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Diagnósticos da malária. In:____ **Tratamento da malária grave e complicada: Conduas Práticas**, Geneva, 1991. p. 39-47.

OPAS/OMS. Malária. **126ª Sessão do Comitê Executivo**, Washington, 2000.

SILVEIRA, A. C., REZENDE, D. F., **Avaliação da Estratégia Global de Controle Integrado da Malária no Brasil** – Brasília: Organização Pan-americana da Saúde 2001, p.120.

REY, L. Os Plasmódios e a Malária: II. A Doença. In:____ **Parasitologia**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b. Cap. 27, p.349-370.

REY, L. Os Plasmódios e a Malária: Ecologia e Epidemiologia. In:____ **Parasitologia**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001c. Cap. 28, p.371-385.

RUBIO, J.M., BUHIGAS, I., SUBIRATS, M., BAQUERO, M., PUENTE, S., BENITO, A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests

for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.7, p.2736-2737, 2001.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., JARRA, W., THAITONG, S., BROWN, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.58, p.283-292, 1993a.

TAYLOR, D.W., VOLLER A. The development and validation of a simple antigen detection ELISA for *Plasmodium falciparum* malaria. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 87 : 29-31, 1993.

TAUIL, P.L. Comments on the epidemiology and control of malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81, suppl. II, p.39-41, 1986.

THAM, J.M., LEE, S.H., TAN, T.M.C., TING, R.C.Y., KARA, U.A.K. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: Comparasion with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf testes in a clinical environment. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, v. 37, n.1, p. 1269-1273, 1999.

TJITRA, E., SUPRIANTO, S., McBROOM, J., CURRIE, B.J., ANSTEY, N.M. Persiste ICT Malaria P.f/P.v Panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of *Plasmodium vivax* in convalescence. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.3, p.1025-1031, 2001.

VERONESI, R. & FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1997. p.1260-1501.

WEISS, J.B. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.1, p.115-118, 1995.

WATERS, A.P., McCUTCHAN, T.F. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. **Lancet**, London, v.8651, p.1343-1346, 1989.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Management of severe and complicated malaria: a practical handbook**. Geneva, 1991.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **World malaria situation in 1990**. **World Health Statistic Quartely**, Geneva, v.42, p.257-266, 1992.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **The role of artemisina and its derivatives in the current treatment of malaria**, Geneva, 1994a

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **World malaria situation in 1992**. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v.69, n.42, p.309-330, 1994b.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **O que é o Paludismo, 2001. Roll Back Malaria – Fazer Recuar o Paludismo**, 2002 . (Online) <http://www.rbm.who.int>,

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação de métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para o diagnóstico de pacientes em tratamento da malária.

Montenegro, R. A.^{1,2}; Montenegro, L. L.^{1,2}; Lima, A. S.¹; Carvalho, A. B.¹; Abath, F. G. C.¹ & Schindler, H. C.¹

¹ *Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –FIOCRUZ, Recife*
e ² *Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco.*

RESUMO

No presente estudo, abordagens moleculares foram utilizadas para o diagnóstico gênero-específico da malária em pacientes submetidos a tratamento, nos municípios de Monte Negro e Campo Novo no Estado de Rondônia. Avaliamos o limite de detecção de DNA através das técnicas de PCR simples, “hemi nested” PCR (HNPCR) e “hemi nested” PCR em um único tubo (STHNPCR) em ensaios realizados com diluição seriada de sangue de pacientes infectados com *Plasmodium falciparum*. Comparamos a sensibilidade dos testes utilizando duas metodologias de extração na preparação das amostras sanguíneas para serem processadas através da PCR: o Chelex e a Saponina. Com o Chelex, a PCR simples mostrou um limite de detecção de 700 parasitos/ μ l, enquanto que com a Saponina o limite de detecção foi de 70 parasitos/ μ l. A HNPCR e a STHNPCR apresentaram limites semelhantes de detecção sendo de 7 parasitos/ μ l através da extração do Chelex e de 0,007 parasitos/ μ l pela Saponina. Para os experimentos subsequentes, foi selecionada a extração pela Saponina, em vista da obtenção de melhores

resultados. As amostras sanguíneas de 30 pacientes em tratamento para malária foram estudadas através da microscopia ótica, PCR simples e HNPCR. De cada paciente foram coletadas duas amostras em ocasiões diferentes. A 1ª coleta foi realizada no 4º e 8º dia de tratamento antimalárico, enquanto que a 2ª amostra foi coletada 48 horas após. Todos os pacientes deram resultados negativos tanto para microscopia ótica quanto para PCR simples. O percentual de positividade da HNPCR manteve-se em torno de 50% nas duas coletas pós-tratamento, sendo capaz de detectar o DNA do parasito mesmo em pacientes que se tornaram assintomáticos. Não foi demonstrado associação significativa entre a presença de manifestações clínicas e a positividade pela HNPCR. Os resultados desta pesquisa sugerem que abordagens sensíveis como a nested PCR poderão ser úteis no monitoramento da parasitemia e resposta clínica de indivíduos em tratamento específico, nas situações de oligoparasitemia e na intercepção da cadeia de transmissão epidemiológica da doença.

ABSTRACT

In the present study, molecular approaches were for the genus specific diagnosis of *Plasmodium* in patients under malaria treatment from the municipalities of Monte Negro and Campo Novo, Rondonia State. The detection limit of the simple PCR, heminested PCR (HNPCR) and single tube hemi nested PCR (STNPCR) were determined using serial dilutions of blood from patients infected with *Plasmodium falciparum*. Two techniques for DNA extraction were compared: Chelex and Saponine. When the samples were processed with Chelex the simple

PCR was able to detect 700 parasites/ μ l. In contrast, when the samples were processed with Saponine the detection limit was 70 parasites/ μ l. The detection limit presented by both HNPCR and STHNPCR were similar, although Chelex was less effective than Saponine (detection limits of 7 parasites/ μ l and 0.007 parasites/ μ l, respectively). Thus, the samples were processed by Saponine in the subsequent experiments. Blood samples from 30 patients being treated against malaria were tested by optical microscopy, simple PCR, and HNPCR. Two samples were collected from each patient in different time points. The first sample was collected 4-8 days after treatment and the second, 48 h later. During treatment, all patients were negative concerning optical microscopy and simple PCR. HNPCR was positive in 50% of the patients in both time points, being able to detect DNA even in asymptomatic patients. There was no significant association between presence of clinical manifestations and positivity by HNPCR. The results suggest that HNPCR may be useful for monitoring treatment and detecting oligoparasitemic patients, contributing for interruption of the transmission of malaria.

INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. É talvez a mais antiga das doenças parasitárias que acometem o homem (Veronesi & Focaccia, 1997).

A microscopia direta, historicamente têm sido o principal método utilizado no diagnóstico laboratorial da malária. A gota espessa e o esfregaço sanguíneo apesar de terem custo reduzido, permitirem a diferenciação da espécie plasmodial bem como a determinação quantitativa da parasitemia, apresentam fatores limitantes, especialmente quando usados em indivíduos oligoparasitados, pois apresentam baixa sensibilidade (Ávila *et al.*, 1996).

Recentemente, foi desenvolvido o teste do tubo QBC (Quantitative Buffy Coat), que apesar de ser mais rápido e prático do que os exames microscópicos convencionais, apresenta algumas dificuldades em distinguir a espécie de plasmódio (Ciceron, 1999). Testes imunocromatográficos de execução simples e rápida estão sendo desenvolvidos e aplicados no diagnóstico da malária, porém esses testes detectam antígenos circulantes no sangue mesmo após o tratamento antimalárico e não possuem alta sensibilidade (Tjitra *et al.*, 2001).

Com o avanço no diagnóstico de doenças infecciosas através do método baseado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), inclusive no diagnóstico da malária, foi desenvolvido a técnica de nested-PCR, que é uma variação da PCR clássica. Nessa abordagem, bastante sensível, geralmente são necessários dois conjuntos de oligonucleotídeos em reações subseqüentes: na primeira reação utiliza-se uma par de oligonucleotídeos com homologia em região externa ao DNA alvo e na segunda, utiliza-se como molde o produto da primeira reação. Esta tecnologia aumenta a sensibilidade do teste e diminui a quantidade de inibidores presentes na amostra (Schindler *et al.*, 2001).

Devido ao crescente número de casos diagnosticados nos últimos anos, a resistência de algumas espécies de plasmódio às drogas antimaláricas, e à

detecção dos parasitos em indivíduos assintomáticos, o diagnóstico rápido e um tratamento precoce e eficaz tornaram-se elementos fundamentais para o controle da malária (WHO, 2000). Além disso, dada a possibilidade de transmissão da malária a partir de pacientes oligoparasitêmicos, é relevante o desenvolvimento de testes diagnósticos sensíveis.

No presente trabalho, abordagens moleculares foram utilizadas para o diagnóstico gênero-específico da malária humana em pacientes submetidos a tratamento, provenientes de uma zona endêmica do Estado de Rondônia. Avaliamos três métodos de diagnóstico baseado na PCR: PCR simples, “hemi-nested” PCR e a “hemi-nested” PCR em um único tubo.

Esperamos assim, validar um método para o diagnóstico da malária, que seja de grande auxílio na detecção de indivíduos oligoparasitados, podendo ser utilizado na triagem de doadores de sangue de áreas endêmicas, monitoramento da resposta clínica e terapêutica em pacientes sintomáticos e identificação de portadores assintomáticos e que possa contribuir na intercepção da cadeia de transmissão epidemiológica.

OBJETIVO GERAL

Avaliação de um método diagnóstico baseado em PCR para detecção de indivíduos oligoparasitados e na resposta terapêutica antimalárica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar dois diferentes métodos de extração do DNA para a preparação de amostras de sangue, para utilização em PCR;
- ✓ Definir o limiar de detecção da PCR simples, “hemi-nested” PCR, e “hemi-nested” PCR em um único tubo, utilizado amostra sangüínea infectada com *Plasmodium falciparum*;
- ✓ Validar o método da “hemi-nested” PCR em amostras de sangue coletadas em pacientes submetidos a tratamento antimalárico.

MATERIAIS E MÉTODOS

DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A pesquisa foi realizada no município de Monte Negro e Campo Novo de Rondônia, localizados no Estado de Rondônia, na Amazônia Ocidental, a cerca de 250km e 306Km da capital Porto Velho, respectivamente. De acordo com suas características epidemiológicas, essas regiões são consideradas de alto risco para transmissão da malária (FUNASA, 2001).

SELEÇÃO DOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE

O estudo foi realizado em 60 pacientes, sendo 30 residentes de área endêmica selecionados através de fichas de notificação da FUNASA, de ambos os sexos, com idade entre 8 e 66 anos, com diagnóstico parasitológico de malária. Esses pacientes tinham ocupações variadas, sendo colonos, invasores da periferia da cidade, migrantes, garimpeiros e agricultores, residentes em áreas ecologicamente afetadas. E 30 indivíduos de área não endêmica para compor o grupo controle negativo da pesquisa.

Os indivíduos ou os seus responsáveis deram seu consentimento por escrito e responderam a um questionário para obtenção de dados da história pessoal e epidemiológica.

Os 60 indivíduos foram distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo I (Pacientes em tratamento): Constituído de 30 pacientes de área endêmica, submetidos a vários dias de tratamento antimalárico, apresentando nos dias da coleta parasitemia negativa através dos exames microscópicos diretos (Gota Espessa e Esfregaço Sanguíneo). Como veremos a seguir foram testados duas amostras sanguíneas de cada paciente a primeira entre o 4º e 8º dias de tratamento, e segunda, 48hs após a primeira coleta.

Grupo II (Controle negativo): 30 indivíduos residentes em área não endêmica, sem sintomas nem história passada de malária e com parasitemia negativa, compreendendo voluntários, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz, Recife - PE .

DESCRIÇÃO DO TRATAMENTO

Após a identificação do parasito através do exame da gota espessa, observou-se as seguintes frequências de infecção: *P. vivax* (73,3% dos pacientes), *P. falciparum* (20,0%), e infecção mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) (6,7%). Os pacientes receberam a medicação através dos técnicos e agentes de saúde da FUNASA, seguindo as normas terapêuticas recomendadas pelo Ministério da Saúde e Governo de Rondônia. Os pacientes infectados com *Plasmodium vivax* eram tratados com Cloroquina (3 dias) e Primaquina (14 dias), com *Plasmodium falciparum*, Mefloquina (dose única) e Primaquina (dose única), e com infecção mista eram tratados com Quinino (3 dias), Doxiciclina (5 dias) e Primaquina (7 dias).

COLETAS DE SANGUE

Como já mencionamos, de cada indivíduo submetido a tratamento antimalárico (Grupo I), foram feitas duas coletas de sangue em intervalos de 48hs de uma coleta para outra, como mostra a tabela abaixo.

Pacientes (30)	1º coleta	2º coleta
15 pacientes	4º dia de tratamento	6º dia de tratamento
15 pacientes	8º dia de tratamernto	10º dia de tratamento

As coletas foram realizadas através de punção venosa usando tubos de 4,5 ml (Vacutainer®, Becton and Dickinson, England) para serem processadas através da Saponina e 20 µl de sangue através de punção digital em papel de filtro tipo (Whatman 3MM), para extração com o Chelex ®. O processamento das amostras dos pacientes em tratamento (Grupo I), para serem processadas através da Saponina, foi realizada no laboratório do Núcleo Avançado da USP (Universidade de São Paulo), em Monte Negro-RO. A coleta e o processamento das amostras do grupo controle foram realizados no CPqAM .

EXAMES PARASITOLÓGICOS

Gota Espessa (GE) e Esfregaço Sanguíneo (ES)

Os exames microscópicos de gota espessa e esfregaço sanguíneo foram realizados em todos os indivíduos envolvidos na pesquisa através da sangue coletado por punção digital. Posteriormente, as lâminas foram coradas com uma solução de Giemsa (MERCK) e água tamponada pH 7,2 (Na_2HPO_4 0,4%; KH_2PO_4 0,5%) durante 25 minutos, depois lavadas em água corrente, com o objetivo de retirar o excesso do corante, e secas numa estufa a 37°C por aproximadamente 5 minutos. Segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde, foram examinados cerca de 100 campos microscópicos em óleo de imersão, a uma resolução de 1000 vezes, por um tempo mínimo de 10 minutos, antes de considerar a amostra negativa (WHO, 1978). No caso do paciente infectado com *Plasmodium falciparum*, os parasitas foram quantificados através da contagem do número de eritrócitos por 200 leucócitos. A densidade parasitária foi expressa por microlitro, assumindo 8×10^3 de leucócitos e 5×10^6 de eritrócitos sanguíneos/ μl (Wilcox, 1960 & WHO, 1991b). Nos casos em que houve discrepância entre os resultados, foram re-examinados 200 campos microscópicos das mesmas. A leitura das lâminas foi realizada em duplicata, por um técnico capacitado da Fundação Nacional de Saúde de Monte Negro - RO e um dos autores do trabalho, previamente treinados, de modo duplo-cego.

EXTRAÇÃO DO DNA PARA UTILIZAÇÃO EM PCR

Extração com a Saponina

As amostras coletadas em tubos Vacuntainer foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O plasma foi removido e o sedimento lisado e homogenizado com 5ml de Saponina a 0,04%. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos para remoção da hemoglobina α . O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento lavado por 2 vezes com PBS 0,15M, pH 7,2 e centrifugado novamente a 12000 rpm por 15 minutos (Tirasophon *et al.*, 1991; Barker Jr. *et al.*, 1992). Após a ressuspensão do sedimento em 50 μ l de água milli-Q, utilizou-se 20 μ l do material para PCR e o restante foi estocado a -20°C , até a ocasião de uso.

Extração com o Chelex® (Bio –Rad Laboratories)

Amostras coletadas em papel de filtro Whatman (3MM), contendo 20 μ l de sangue total, depois de secas foram estocadas em sacos plásticos e transportadas à temperatura ambiente para o Recife, onde foi realizado o isolamento do DNA usando a extração do Chelex®.

Em um microtubo (1,5ml) foi adicionado 1ml de água destilada e o papel de filtro com o sangue seco, incubando-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado durante 3 minutos a 14,000 rpm. O sobrenadante foi removido, e ao pellet se adicionou 5% do Chelex® em um volume final de 200 μ l. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 56°C e agitadas por 10 segundos, em seguida aquecidas em água fervente por 10

minutos, novamente agitadas por 10 segundos e centrifugadas por 2-3 minutos a 14,000 rpm. Em seguida, 20µl do sobrenadante foi usado na PCR e o restante estocado a – 20°C.

ABORDAGENS MOLECULARES

Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR

Nas reações de amplificação, três oligonucleotídeos foram utilizados:

GJ1: 5" - GGCTTAGTTACGATTAATAG - 3"

HR842 : 5" - CTAAACTTCCTTGTGTTAG - 3"

PGFO3 5" - ACTAGTTTAAGACAAGAGT - 3"

Os oligonucleotídeos GJ1 e HR842 gêneros-específicos, utilizados na 1ª reação de amplificação, chamada de PCR Simples, já haviam sido descritos anteriormente por Jaureguiberry *et al.* (1990) e Schindler *et al.* (2001), respectivamente. Na 2ª reação, para a “Hemi-Nested” PCR (HNPCR), foi utilizado o oligonucleotídeo PGFO3, construído por Montenegro *et al.*, (2000), para ser utilizado como oligonucleotídeo interno, visando a detecção do gênero *Plasmodium* (1A) .

Os três oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência primária do gene codificando o SSU rRNA de *P. falciparum* (McCutchan *et al.* 1988), de forma a encontrar sequências diagnósticas não presentes no rRNA humano. Essas regiões do gene codificando o SSU rRNA, apresentaram total

homologia com o DNA de todas as espécies de plasmódio humano, servindo de base para o desenho dos oligonucleotídeos.

Reações de Amplificação do DNA através da PCR

PCR Simples: Foi utilizado apenas um par de oligonucleotídeos, GJ1 e HR842. Foi retirado 20 μ l da amostra contendo o DNA para ser submetido a amplificação em um termociclador automático (Perkin Elmer, modelo 4800). A mistura da 1ª reação de amplificação consistiu em KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,3, MgCl₂ 2,5mM, dNTP (200 μ M cada), 20 pmoles de cada oligonucleotídeo (GJ1 e HR842) e 1,0 unidade de Taq DNA polimerase (Gibco BRL, Califórnia, USA) em um volume final de 50 μ l. A fase de desnaturação foi feita a 94° por 30s, a de anelamento a 58° por 30s e a de extensão a 72° por 45s, em um total de 30 ciclos.

“Hemi-Nested PCR” (HNPCR): Utilizou-se três oligonucleotídeos em duas reações seqüenciais, em um total de 60 ciclos. Foi adicionado 1 μ l do produto da 1ª reação (PCR simples), nas mesmas concentrações e condições de amplificação da anterior, porém utilizando um oligonucleotídeo que anela em região mais interna, o PGFO3, e adicionando o oligonucleotídeo HR842. Os tubos eram abertos para que os amplicons gerados na primeira PCR fossem introduzidos na segunda reação.

“Hemi-Nested PCR” em um único tubo de reação (STHNPCR): A concepção da abordagem é diferente da HNPCR, permitindo que as duas reações de amplificação sejam realizadas em um único tubo, não ocorrendo a abertura dos tubos antes da finalização das amplificações. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador automático (Touchdown™ Thermal Cycler da Hybaid Limited). A primeira etapa de PCR consistiu em 15 ciclos (92°C, 30s; 58°C, 30s e 72°C, 45s), enquanto que a segunda etapa de PCR consistiu em 45 ciclos com as mesmas características. Os primeiros 15 ciclos da reação continham apenas 4 pmoles de oligonucleotídeos externos em um volume final de 50 µl contendo Tris-HCl 10 mM, pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 200 µM, e 1.0 U de Taq DNA Polimerase (Gibco BRL, Califórnia, USA). A mistura de reação foi recoberta com 30 µl de óleo mineral. Os oligonucleotídeos internos, antes do início da PCR, foram diluídos em partes iguais com água e bromophenol blue (2µg/ml), contendo 40 pmoles de cada oligonucleotídeo e em seguida esta mistura foi colocada na superfície interna da tampa dos microtubos estéreis abertos, numa estufa a 37°C, para permitir a fixação dos oligonucleotídeos. Para que os oligonucleotídeos internos passassem a fazer parte dos 45 ciclos finais da PCR, os mesmos foram eluídos da superfície interna do microtubo através de interrupção breve da PCR após o 15º ciclo de reação e feitas repetidas inversões dos tubos para que entrassem em contato com a mistura de reação e passassem a participar dos ciclos subsequentes da PCR. Esta metodologia é nova e encontra-se em processo de patenteamento (Abath et al., 2001).

Para avaliar a qualidade individual das amostras de DNA, estimando a presença de inibidores, foram introduzidos na 1ª PCR, os oligonucleotídeos HUF e UNVRE16 (Fig. 1B) (descritos por Rubio et al., 1999 e Abath et al., 2001, respectivamente), que amplificam apenas rDNA de mamíferos. Dois pmoles desses oligonucleotídeos participaram dos primeiros 15 ciclos da reação de heminested PCR em um único tubo, juntamente com os iniciadores específicos para *Plasmodium sp* (GJ1 e HR842).

Análise dos produtos da PCR

Dez µl dos produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio. As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em um transluminador de luz ultravioleta e fotografados com um sistema de documentação polaroide (MP4+ system).

Determinação do limite de detecção dos métodos moleculares no sangue infectado com *Plasmodium falciparum*.

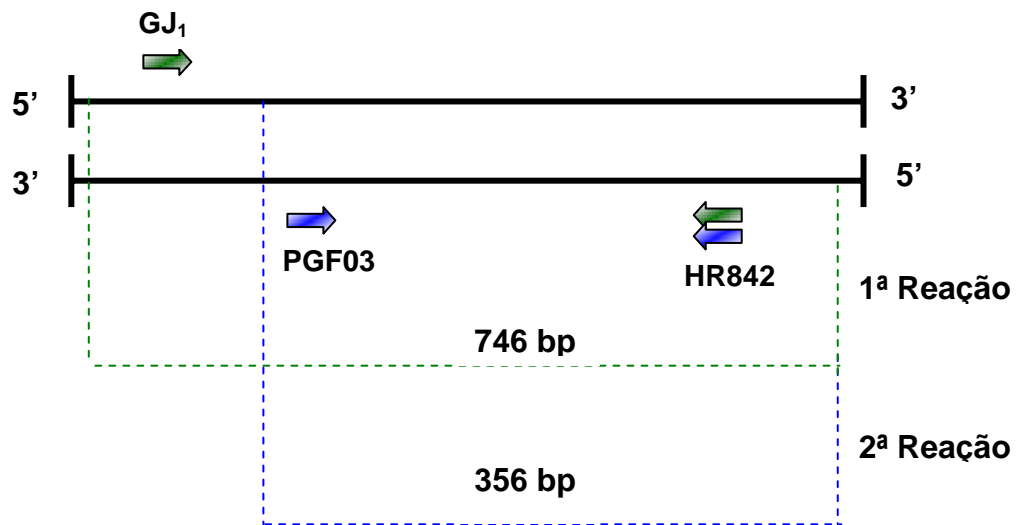
Para avaliar os dois diferentes métodos de extração de DNA (a Saponina e o Chelex), e definir o limiar de detecção de parasitos através dos sistemas baseados em PCR, utilizamos sangue de um paciente hospitalizado, infectado com *P. falciparum*, com parasitemia inicial de 7.000 parasitos/µl. O sangue total infectado foi diluído com sangue de um doador sadio, de área não endêmica da

malária. Foram feitas diluições de fator 10, seriadas, correspondendo a: 7×10^3 , 7×10^2 , 7×10^1 , 7×10^0 , 7×10^{-1} , 7×10^{-2} , 7×10^{-3} , 7×10^{-4} , 7×10^{-5} , 7×10^{-6} parasitos/ μ l. As amostras de sangue diluída foram processadas pela extração da Saponina e de cada diluição foi coletado 20ul em papel de filtro e extraído o DNA das amostras diluídas, através do Chelex[®]. O processamento dessas amostras de sangue foi realizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-PE.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Software utilizado foi o EPI INFO na versão 6.04. Aplicou-se o teste Qui-quadrado para verificar associação e diferença entre proporções das variáveis estudadas. Todos os testes foram analisados ao nível de 95% de confiabilidade.

A) “Hemi-Nested” PCR



B) Avaliação da qualidade da amostra na STHNPCR

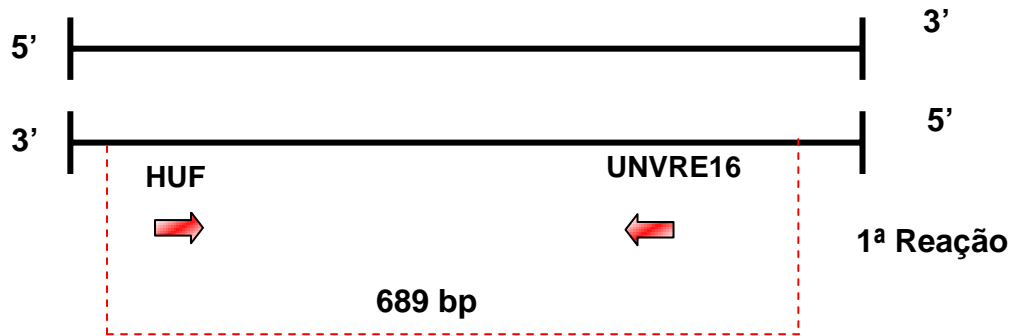


Figura 1 . Representação esquemática dos sistemas de amplificação baseados em PCR. A) Os oligonucleotídeos GJ1 e HR842, utilizados na 1ª reação, produziram um fragmento de 746 pb. A partir da introdução do PGFO3 com o seu par HR842 caracterizando a 2ª reação foi formado um amplicon de 356 pb. B) Oligonucleotídeos HUF e UNVRE16, utilizados na 1ª reação da STHNPCR, para avaliar a qualidade da amostra individual, produziram um amplicon de 689 pb.

RESULTADOS

Determinação do limite de detecção de DNA através da PCR simples, HNPCR e da STHNPCR.

O limite de detecção da PCR Simples, HNPCR e da STHNPCR, foi determinado através da análise seriada de diluições de fator 10, utilizando sangue de paciente infectado pelo *P. falciparum* com parasitemia inicial de 7000 parasitos/ μ l (7×10^3 parasitos/ μ l) de sangue. Para melhor avaliação da sensibilidade dos testes as amostras foram submetidas, antes de serem processadas pela metodologia da PCR, a duas técnicas de extração: pelo Chelex 100[®] (Walsh *et al.*, 1991) e pela Saponina (Tirasophon *et al.*, 1991; Barker Jr *et al.*, 1992).

Quando a extração foi realizada com o Chelex 100[®] na preparação das amostras, a PCR simples conseguiu detectar até 700 parasitos/ μ l (70×10^2 p/ μ l), enquanto que a HNPCR e a STHNPCR, apresentaram limites semelhantes de detecção, de até 7 parasitos/ μ l (7×10^0 p/ μ l) de sangue (Figuras 2A, 2C e 2E). A PCR simples promoveu a amplificação de um fragmento de DNA de 746 pb (Figura 2A e 2E) e com as técnicas de HNPCR e a STHNPCR os amplicons diagnósticos foram de 356 pb (Figura 2C, 2D, 2E e 2F). Utilizando a Saponina, a quantidade mínima de parasitos detectados pela PCR simples foi de 70

parasitos/ μl (7×10^1 p/ μl) e 0,007 parasitos/ μl (7×10^{-3} p/ μl) pelas técnicas de HNPCR e STHNPCR (Figuras 2B , 2D e 2E).

Para avaliar melhor os resultados da amostra, sobretudo em relação a presença de inibidores sanguíneos da PCR, incluiu-se na reação da STHPCR um par de oligonucleotídeos específicos para o rDNA de mamíferos. Esse par de oligonucleotídeos produzia um amplicon de 689 pb (Figuras 2E e 2F), mesmo na ausência de DNA do parasita.

Devido ao aumento na sensibilidade das abordagens baseadas em PCR, quando as amostras sanguíneas foram processadas pelo método da Saponina, esta tecnologia de extração foi utilizado nos experimentos subseqüentes.

Avaliação da HNPCR e manifestações clínicas, durante o tratamento de malária.

Para avaliar a sensibilidade da HNPCR foram coletadas 30 amostras sanguíneas de pacientes que estavam sendo submetidos a tratamento antimalárico. Todos os pacientes estavam infectados com alguma das espécies de Plasmodium: *P. vivax*, *P. falciparum* ou infecção mista, antes do tratamento, como comprovado através da microscopia direta, apresentando níveis de parasitemia em decréscimo após o início do tratamento específico para malária. Durante o período das coletas estes pacientes apresentaram resultados negativos através da microscopia ótica e pela PCR simples.

Dentre as amostras analisadas pelo teste da HNPCR, 16/30 (53,5%) foram positivas na 1^o coleta e 15/30 (50%) na 2^o coleta. Porém, a positividade da

HNPCR não sofreu influência significativa do tempo de coleta após o início do tratamento. Por outro lado, observou-se que as manifestações clínicas estavam presentes em 43,3% dos pacientes na primeira coleta, e apenas 6,7% na segunda coleta (48 horas após a 1^o coleta). A comparação mostrou que essa diferença era significativa ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Apesar de ter sido constatado que os limites de detecção da STHNPCR e HNPCR foram equivalentes (Figura 2), os resultados da STHNPCR, nos pacientes com sintomatologia clínica em tratamento antimalárico, não estão incluídos nesta tese, pois os testes ainda não foram realizados.

Tabela 1. Resultado da freqüência de positividade da HNPCR e das manifestações clínicas em pacientes durante o tratamento da malária.

Diagnóstico	Tempo de exame			
	1º coleta		2º coleta	
	freq	%	freq	%
HNPCR	16/30	53,3	15/30	50,0
Manifestações clínicas	13/30	43,3	2/30	6,7

Todos os pacientes na 1º e 2º coletas eram negativos através do exame da microscopia ótica e PCR simples.

A 1º coleta dos pacientes foi realizada no 4º e 8º dia após o início do tratamento, e a 2º coleta foi realizada no 6º e 10º dia.

Relação entre os resultados da HNPCR e as manifestações clínicas durante o tratamento de malária.

Analisando o resultado da 1^o coleta, 50% dos pacientes positivos através da HNPCR, também apresentaram manifestações clínicas. Nos pacientes assintomáticos 64,3% foram negativos quando analisados pela metodologia da HNPCR. Contudo, não houve associação significativa ($p>0,05$) entre as variáveis. Na 2^o coleta, 13,3% dos pacientes positivos na HNPCR também apresentaram manifestações clínicas, enquanto que todos os pacientes que foram negativos (100%) pela HNPCR foram assintomáticos. Entretanto, também não houve nenhuma associação significativa ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Tabela de contingência para avaliação da associação entre a presença de manifestações clínicas e o resultado da HNPCR, durante a 1º e 2º coletas em pacientes.

Manifestações Clínicas	HNPCR							
	1º coleta				2º coleta			
	Positiva		Negativa		Positiva		Negativa	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	08	50	09	64,3	13	86,7	15	100
Presente	08	50	05	35,7	02	13,3	00	0,0
Total	16	100,00	14	100	15	100,00	15	100,0

1º coleta: $\chi^2 = 0,62$, $p = 0,430$

2º coleta: $\chi^2 = 0,54$, $p = 0,464$

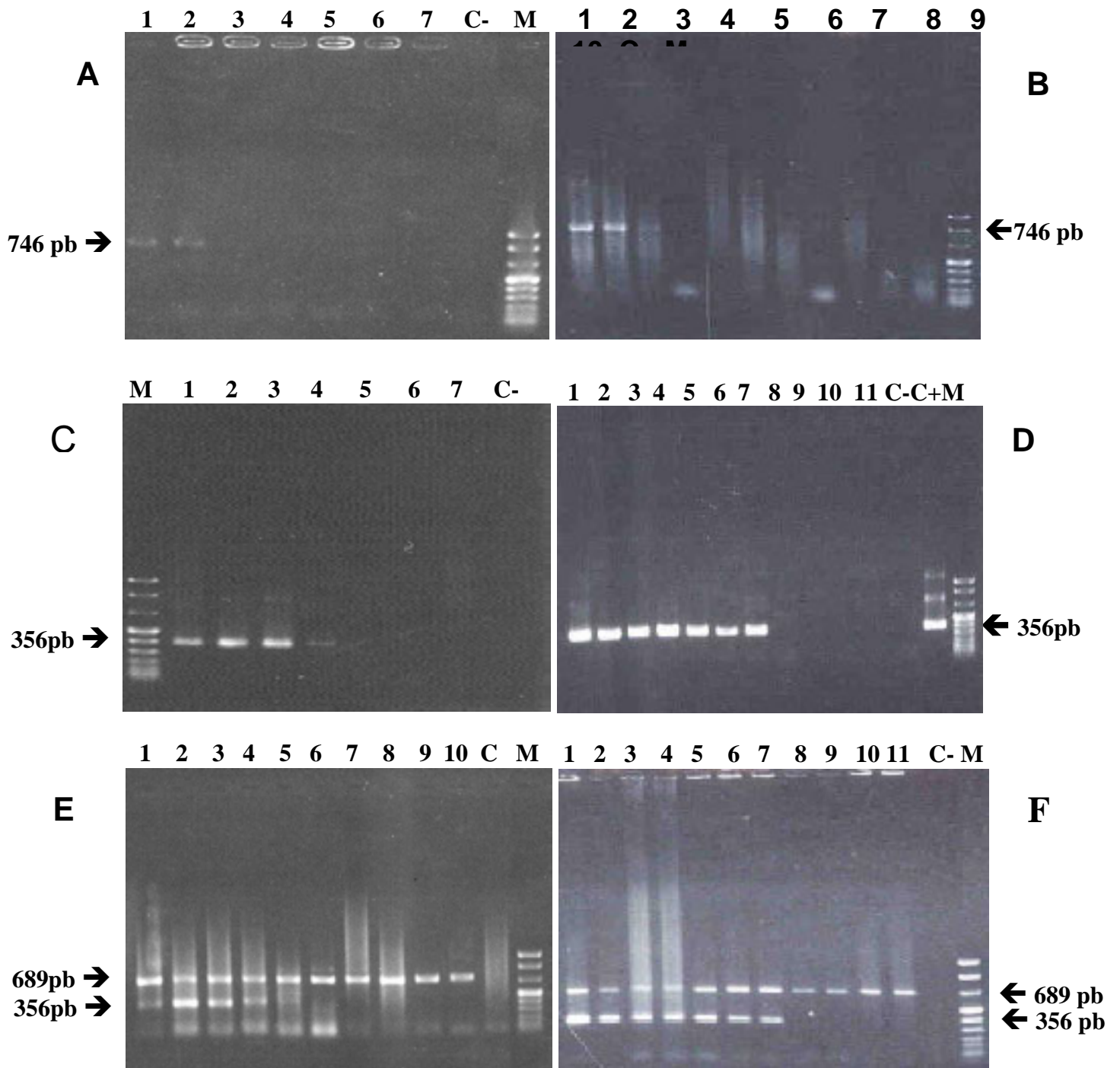


Figura 2. Análise em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR, HNPCR e STHNPCR, extraído pelo Chelex e pela Saponina. **A-** PCR e Chelex; **B-** PCR e Saponina; **C-** HNPCR e Chelex; **D-** HNPCR e Saponina; **E-** STHNPCR e Chelex; **F-** STHNPCR e Saponina. As faixas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, correspondem a 7×10^3 , 7×10^2 , 7×10^1 , 7×10^0 , 7×10^{-1} , 7×10^{-2} , 7×10^{-3} , 7×10^{-4} , 7×10^{-5} e 7×10^{-6} parasitas/ μ l, respectivamente. Os pesos moleculares correspondentes aos amplicons obtidos através da PCR simples (746 pb), HNPCR e STHNPCR (356 pb) e utilização de oligonucleotídeos específicos para DNA de mamíferos (689 pb), estão indicados por setas. C-, controle negativo e M, marcador de peso molecular (114-692, 501-320, 242-190, 147-110, 67, 37-19pb)

DISCUSSÃO

A malária continua sendo um grave problema de saúde pública em diferentes regiões do mundo, particularmente na África. Além de ser uma causa importante de mortalidade, constitui uma grande limitação para o desenvolvimento social e econômico dos países onde a doença é endêmica, (WHO, 2000).

Nas zonas altamente endêmicas (maior parte na África do Sul), com elevado número de doentes e de portadores assintomáticos é freqüente ocorrerem infecções sucessivas por plasmódios, o indivíduo pode permanecer vários anos sem apresentar manifestações clínicas, porém com parasito circulante (Bohlke, M., 1998). Essas infecções com parasitemia persistente e não detectadas microscopicamente geralmente passam despercebidas ou são tratadas incorretamente, contribuindo para a resistência do parasito (Jarra & Snounou, 1998). Muitos casos de resistência ao tratamento com medicamentos específicos foram registrados no Brasil e no mundo e a inexistência, até o momento, de um tratamento efetivo contra as espécies plasmodiais de maior prevalência no Brasil (*P. vivax* e *P. falciparum*) levam a necessidade de um diagnóstico laboratorial mais eficiente (Kain *et al.*, 1994., Veronesi & Focaccia, 1999, OMS, 1999, FUNASA, 2001).

Indivíduos portadores de baixa parasitemia, que apesar de freqüentemente não apresentarem quadro clínico sugestivo, são capazes de disseminar a doença pela picada do mosquito vetor e principalmente através de transfusão sanguínea em áreas endêmicas. Podendo, desta forma, contribuir para a manutenção dos

índices de morbimortalidade por malária (Kiesslich *et al.*, 1997, Hang *et al.*, 1995).

A microscopia direta (método parasitológico da gota espessa) é o teste mais utilizado no diagnóstico laboratorial da malária, sendo considerado como padrão-ouro. Apresenta algumas vantagens como a possibilidade de identificação das espécies e estágios de desenvolvimento do plasmódio infectante, ser quantificável e ter baixo custo (US\$ 0,12- 0,40). Porém, sua limitação principal está relacionada com a incapacidade de detectar o plasmódio em indivíduos oligoparasitados, devido a sua baixa sensibilidade (10-30 parasitas/ μ l), além da necessidade de microscopistas bem treinados para a confiabilidade dos resultados (Ávila *et al.*, 1996; Kimura *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1999; Schoone *et al.*, 2000). Pode-se obter resultados falso-negativos nos casos oligoparasitêmicos ou falso-positivos pela presença de resíduos nas lâminas (Grant *et al.*, 1960).

Nos últimos dez anos, vários métodos foram desenvolvidos para suprir as limitações da microscopia direta. O teste do Quantitative Buffy Coat - QBC (Rickman *et al.*, 1989), é uma técnica que combina a concentração dos parasitas pela centrifugação do sangue em tubos de micro-hematócrito e coloração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) do parasito pelo fluorocromo chamado laranja de acridina, mas esse fluorocromo não é específico e cora ácidos nucleicos de outros tipos de células, podendo dar resultados falso-positivos como também, dificulta a diferenciação da espécie (Kain *et al.*, 1994; Ciceron *et al.*, 1999; Gay *et al.*, 1996). A imunofluorescência indireta e o imunoensaio ELISA (Ávila *et al.*, 1996) os quais podem ser úteis na determinação da endemicidade de uma área específica e identificação de um provável foco da doença. Recentemente foram

desenvolvidos os testes imunocromatográficos (ParaSight-F[®], ICT Malaria Pf /P.v, OptiMal) (Iqbal *et al.*, 1999; Tjitra *et al.*, 2001). Estes testes devido a sua simplicidade e rapidez se tornaram bastante atraentes para utilização em áreas endêmicas. Porém, vários autores observaram nos testes imunocromatográficos que o baixo nível de parasitemia (<100 parasitas/ μ l) diminui a sensibilidade dos testes (Rubio *et al.*, 2001., Aslan, *et al.*, 2001., Makler *et al.*, 1998).

Os métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm se mostrado mais específicos e sensíveis do que a microscopia convencional, sendo alguns capazes de detectar um único parasita de *Plasmodium falciparum* em 20 microlitros de sangue humano (Barker Jr *et al.*, 1992 ; Tirasophon *et al.*, 1994 ; Kimura *et al.*, 1995). A metodologia da PCR está sendo avaliada por vários autores utilizando hibridização com sonda radioativa e sonda fria. No entanto estas técnicas são bastante demoradas, necessitando de várias etapas de manipulação, tornando-as pouco práticas e limitando seu uso no monitoramento do tratamento antimalarial, e diagnósticos de oligoparasitêmicos (Kain *et al.*, 1994; Jarra *et al.*, 1998; Ciceron *et al.*, 1999).

O RNA ribossomal, particularmente a pequena subunidade (SSU) rRNA, tem sido proposta como um alvo molecular ideal para a identificação dos parasitas da malária. É composta por um mosaico de regiões conservadas e variáveis, permitindo a identificação de sequências apropriadas para o diagnóstico ao nível de gênero ou espécie (Waters and McCutchan, 1989; Jaureguiberry *et al.*, 1990; Snounou *et al.*, 1993a; Li *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 1999; Schindler *et al.*, 2001; Laoboonchai *et al.*, 2001). O uso mais extensivo do rRNA como alvo para o diagnóstico de doenças infecciosas dependerá da identificação de regiões

apropriadas da molécula, do desenvolvimento de procedimentos apropriados para a detecção de amostras biológicas (Waters & McCutchan, 1989). Diferentemente da maioria dos organismos eucariotas, que apresentam grande número de genes codificantes de rRNA, o *Plasmodium* contém cerca de quatro genes ribossomais (McCutchan *et al.*, 1986). Dessa forma, justifica-se a utilização da “nested” PCR como uma maneira de aumentar a sensibilidade de detecção.

Embora haja situações em que o diagnóstico de malária ao nível da espécie causadora seja importante, por outro lado, muitas vezes o diagnóstico gênero-específico de *Plasmodium* é satisfatório, como por exemplo, nas triagens em banco de sangue. Neste sentido, no presente estudo utilizamos os oligonucleotídeos: GJ1 (Jaureguiberry *et al.*, 1990), HR842 (Schindler *et al.*, 1998) e PGFO3 (Montenegro *et al.*, 2000), para serem empregados em sistemas diagnósticos sensíveis e específicos baseados na metodologia da “nested” PCR.

As vantagens da “nested” PCR incluem o aumento da sensibilidade, especificidade e a diluição de eventuais inibidores presentes em amostras clínicas. Por outro lado, a maior desvantagem é o aumento da probabilidade de contaminação de amostras negativas com amplicons produzidos em amplificações positivas, pois o tubo de reação contendo uma grande quantidade de produtos da 1ª amplificação tem que ser aberto e manipulado para a preparação da 2ª reação (Picken *et al.*, 1996). Vários métodos baseados no princípio da “nested PCR” em um único tubo já foram descritos para a detecção de patógenos infecciosos (Ylitalo *et al.*, 1995; Noyes *et al.*, 1998). Entretanto muitos desses métodos utilizam conjuntos de oligonucleotídeos com diferentes temperaturas de anelamento, o qual restringe a sua utilização, nas situações em

que há dificuldades para a identificação de regiões alvo. Outros métodos propõem a separação física dos componentes da 1^o e 2^o reação através de abordagens complexas.

Dessa foi avaliado um sistema baseado em “nested” PCR onde as duas reações ocorrem em um único tubo (STHNPCR), com separação física dos conjuntos de oligonucleotídeos externos e internos, desenvolvido em nosso laboratório por Abath, *et al.*, 2002. O método é simples e eficiente. O resultado obtido por Montenegro *et al.*, (2002), utilizando-se a técnica de HNPCR convencional, demonstrou um aumento de 10X na sensibilidade em relação a STHNPCR utilizando DNA purificado de *P. falciparum*. No entanto, a STHNPCR apresenta vantagens compensatórias, haja visto que o risco de contaminação é significativamente menor, pois o tubo de reação só é aberto uma única vez para a introdução da amostra de DNA com os reagentes, permanecendo subsequenteiramente fechado até a finalização da amplificação. Além disso, consome menos tempo e reagentes. A contaminação cruzada durante a preparação das duas etapas na “hemi-nested” PCR é um grave problema, havendo o risco de diagnósticos falsos positivos (Singh *et al.*, 1999).

Para se obter melhor desempenho das técnicas de amplificação de DNA deve-se considerar: a forma como as amostras são coletadas, estocadas e processadas para extração de DNA (Farnert *et al.*, 1999). A maioria dos métodos de diagnóstico pela PCR usam extração orgânica com fenol clorofórmio e precipitação com etanol na preparação da amostra sanguínea. Esse método não é prático e quando trabalha-se com um grande número de amostras, além de consumir muito tempo, requer o uso de produtos químicos perigosos (Snounou *et*

al., 1993a; Snounou *et al.*, 1993b; Ciceron *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999). Para superar este problema foi utilizado em nossos estudos dois métodos de extração de DNA que não envolvem extração orgânica: o Chelex 100[®] (Walsh *et al.*, 1991) e a Saponina (Tirasophon *et al.*, 1991; Barker Jr *et al.*, 1992).

Na PCR simples, utilizando um par de iniciadores gênero-específico (GJ1 e HR842) numa reação única de amplificação, através da metodologia de extração de DNA do Chelex 100[®], o limite de detecção foi de 700 parasitos/ μ l (0,14% de parasitemia). A HNPCR e a STHNPCR, utilizando amostras processadas com o Chelex[®], apresentaram a mesma sensibilidade, sendo capazes de detectar até 7 parasitos/ μ l de sangue. Nossos ensaios realizados com a Saponina demonstraram que a sensibilidade do método na PCR Simples foi 10 vezes maior (70 parasitos/ μ l) do que o com a extração com o Chelex[®]. Na HNPCR como na STHNPCR a sensibilidade foi 1000 vezes maior (0,007 parasitas/ μ l) do que com o Chelex[®]. Esses resultados indicam que os métodos de HNPCR e STHNPCR possuem uma maior capacidade de detectar DNA do plasmódio do que a PCR simples e que a sua sensibilidade pode ser aumentada quando as amostras sanguíneas são preparadas com a Saponina, sugerindo que alguns componentes do sangue que podem inibir a PCR, são removidos pela lise das hemácias e subsequente lavagem com PBS. Esses achados estão de acordo com Arai *et al.*, (1994), Tirasophon *et al.*, (1991) e Barker *et al.*, (1986). Desta maneira, Saponina demonstrou uma maior sensibilidade e foi a técnica adotada nos experimentos subsequentes.

Através de ensaios realizados com a HNPCR em amostras clínicas de 30 pacientes submetidos a tratamento antimalárico, observou-se na primeira coleta sanguínea uma positividade em 53,3% e 50% na segunda coleta. Não foi possível observar uma diferença significativa entre uma coleta realizada 48hs após a outra em relação a positividade do teste. Este fato foi importante, pois para um monitoramento durante o tratamento antimalárico, provavelmente pode-se aumentar os intervalos entre uma coleta e outra, facilitando o trabalho de campo e assim observando o declínio da parasitemia até atingir o desaparecimento dos parasitas no sangue, sobretudo quando o tratamento recomendado é de 14 dias para *P. falciparum* e *P. vivax* (Funasa, 2001). É importante ter-se um instrumento eficaz para o monitoramento durante o tratamento de uma recidiva da doença, uma quimioresistência ou uma possível falha no tratamento, como foi verificado no trabalho de Kain *et al.*, (1994), onde os pacientes tratados com droga antimalárica, permaneceram com resultados positivos através da PCR no 5º e no 8º dia pós-tratamento, devido provavelmente a uma falha no tratamento possivelmente devido a resistência do parasito.

A positividade do teste em pacientes em tratamento provavelmente demonstra a alta sensibilidade da HNPCR em detectar níveis baixos de parasitemia quando a microscopia ótica e a PCR simples já apresentavam resultados negativos. Estudo semelhante foi feito por Ciceron *et al.*, (1999), que utilizaram o método da PCR, porém associada à hibridização com sonda fria e observaram durante 3 dias de internação, 12 pacientes submetidos a uma combinação de drogas contra o *P. falciparum*, tendo verificado que o tempo

médio de clareamento da parasitemia através da PCR foi de 52hs, e através da gota espessa de 32hs.

Na segunda coleta, 13 dos 30 pacientes tornaram-se assintomáticos pelo efeito do tratamento e queda da parasitemia, porém, apresentaram positividade através do teste de HNPCR. Estes pacientes que não apresentaram manifestações clínicas, já tinham voltado às suas atividades habituais, servindo provavelmente como fontes de infecção para a transmissão da doença.

Contudo, não houve associação entre a presença ou ausência de manifestações clínicas em relação aos resultados obtidos na HNPCR, analisando a 1^o e 2^o coletas separadamente. Os pacientes sem sintomatologia, apresentando um baixo nível de parasitos circulantes são provavelmente importantes para a disseminação da doença em áreas endêmicas e não endêmicas.

O método da PCR tem sido demonstrado por vários autores que é sensível e específico no diagnóstico da malária podendo ser melhor do que a microscopia como referência padrão para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos (Ciceron *et al.*, 1999).

Nossos resultados sugerem que abordagens sensíveis como a “nested” PCR poderão ser úteis no monitoramento da parasitemia, na resposta terapêutica antimalárica, na detecção de portadores assintomáticos e na triagem de doadores, minimizando o risco da transmissão sanguínea em áreas endêmicas e não endêmicas.

CONCLUSÕES

1. A sensibilidade da Hemi Nested PCR utilizando o método de preparação da amostra com a Saponina foi maior em relação a extração com o Chelex[®], obtendo-se 7×10^{-3} parasitos/ μ l e 7 parasitos/ μ l de sangue, respectivamente.
2. O método da Saponina foi selecionado para ser utilizado na preparação das amostras sanguíneas a serem processadas através da PCR simples, HNPCR e STHNPCR.
3. A quantidade mínima de parasitos detectados pela PCR simples foi de 70 parasitos/ μ l e de 0,007 parasitos/ μ l de sangue pelas técnicas de HNPCR e STHNPCR.
4. A positividade da HNPCR não sofreu influência significativa do tempo de coleta após o início do tratamento, apesar das manifestações clínicas terem sido significativamente mais frequentes nos pacientes na época da primeira em relação a segunda coleta.
5. Faz-se necessário novos estudos para definir melhor o papel da HNPCR e STHNPCR no monitoramento de pacientes em tratamento antimalárico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F. G. C., MELO, F. L., WERKAUSER, R., MONTENEGRO, L.; MONTENEGRO, R.; SCHINDLER, H. C. Single-Tube Nested PCR Using Immobilized Internal Primers. **Biotechnology Techniques**, Atlanta, v. 33, n. 6, p. 1210-1214, 2002.

ARAI, M., MISUKOSHI, C., KUBOSHI, F., KAKUTANI, T., WATAYA, Y. Detection of *Plasmodium falciparum* in human blood by a nested polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.51, n.5, p.617-626, 1994.

ÁVILA, S.L.M., ARUK, V.G., BOCHETTI, M.G.G., TOZETTO-MENDOZA, T.R., SANCHEZ, M.C.A., BURLACHER, R.R., ORTIZ, M.L.N.C., FERREIRA, A.W. Avaliação de diferentes métodos laboratoriais para o diagnóstico de malária humana. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, a.5, n.4, p.32-43, 1996.

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

BARKER JR, R.H., BANCHONGAKSORN, T., COURVAL, J.M., SUWONKERD, W., RIMWUNGTRAGOON, K., WIRTH, D.F. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.46, p.416-426, 1992.

BOHLKE, M. Imunossupressão induzida pela malária: existe um papel para o óxido nítrico?. **Revista brasileira de Alergia e Imunopatologia** , 1998. (Online)
[http:// www.sbai.org.br/Vol226/malaria.htm](http://www.sbai.org.br/Vol226/malaria.htm)

FUNASA, Vigilância epidemiológica. **Manual de Terapêutica da Malária**. Malária. In: Brasília, DF, 2001

CICERON, L., JAUREGUIBERRY, G., GAY, F., DANIS, M. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.10, p.35-38, 1999.

FARNERT, A.; AREZ, A.P.; CORREIA, A.T.; BJORKMAN, A.; SNOUNOU, G.; DO ROSARIO, V. Sampling and storage of blood the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.93, p.50-53, 1999.

GAY, F., TRAORE, B., ZANONI, J., DANIS, M, GENTILINI, M. Evalution du système QBC pour le diagnostic du paludisme. **Cahiers Santé**, Montrouge, v.4, p.289-297, 1994.

GRANT, D.B., PERINPANAYAGAM, M.S., SHUTE, P.G., ZEITLIN, R.S. A case of malignant tertian (*Plasmodium falciparum*) malaria after blood-transfusion. **Lancet**, London, v.2, p.469-470, 1960.

HANG, V.T.T., BE, T.V., TRAN, P.N., THANH, L.T., HIEN, L.V., O'BRIEN, E. MORRIS, G.E. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.89, p. 44-47, 1995.

IQBAL, J.; SHER, A.; HIRA, P.R.; AL-OWAISH, R.; Comparison of the OptiMAL test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3644-3646,1999.

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

JAUREGUIBERRY, G., HATIN, I. D'AURIOL, L., GALIBERT, G. PCR detection of *Plasmodium falciparum* by oligonucleotide probes. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.4, p.409-414, 1990.

KAIN, K.C.; KYLE, D.E.; WONGSRICHANALAI, C.; BROWN, A.E.; WEBSTER, H.K.; VANIJANONTA, S.; LOOAREESUWAN, S. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. **The Journal of Infections Diseases**, p.1626-1630, 1994.

KIESSLICH, D., TORRES, K.L., SILVA, R.C., FRAJI, N.A. Métodos de triagem para malária em doadores de sangue de área endêmica. **Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.19, n.174, p.21-27, 1997.

KIMURA, M., MIYAKE, H., KIM, H.S., TANABE, M., ARAI, M., KAWAI, S., YAMANE, A., WATAYA, Y. Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridization: clinical study with malaria patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.9, p.2342-2346, 1995.

LAOBOONCHAI, A., KAWAMOTO, F., THANOOSINGHA, N., KOJIMA, S., MILLER, R. S., KAIN, K.C., WONGSRICHANALAI, C. PCR-based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.6, p.458-462, 2001.

LI, J., WIRTZ, R.A., McCONKEY, G.A., SATTABONGKOT, J., WATERS, A.P., ROGERS, M.J., McCTUCHAN, T.F. Plasmodium: genus-conserved primers for identification and quantitation. **Experimental Parasitology**, New York, v.81, p.182-190, 1995.

MAKLER, M.T., PALMER, C.J., AGER, A.L. A review of practical techniques for the diagnosis of malaria. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.92, p.419-433, 1998.

McCUTCHAN. T.F. The Ribosomal Genes of *Plasmodium*. **International Review of Cytology**, New York, v.99, p.295-309, 1986.

MONTENEGRO, L.M.L., MONTENEGRO, R.A., CARVALHO, A.B., ABATH, F.G.C., SCINDLER, H.C. Identificação de novas regiões alvos no SSU rRNA para detecção gênero-específica de *Plasmodium* através de PCR (Polymerase Chain Reaction). **Anais da 7ª Reunião Nacional de Pesquisa em Malária**, Rio de Janeiro-RJ, p. 97, 2000.

MONTENEGRO, L.M.L., MONTENEGRO, R.A., CARVALHO, A.B., ABATH, F.G.C., SCINDLER, H.C. Desenvolvimento de novas abordagens moleculares baseadas em PCR (Polymerase Chain Reaction) para detecção gênero-específica de *Plasmodium*. **Tese de Mestrado**, 2002

NOYES, H.A., REYBURN, H., BAILEY, J.W., SMITH, D. A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and it's application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.10, p.2877-2881, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS. Quadro de desenvolvimento, implementação e actualização da política de medicamentos antipalúdicos em África. Paludismo. **Boletim Informativo do Programa de Combate ao Paludismo**, Geneva, v.2, n.2, p.1-4, 1999.

PICKEN, M.M., PICKEN, R.N., HAN, D., CHENG, Y., STRLE, F. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v.15, p.489-498, 1996.

RICKMAN, L.S., LONG, G.W., OBERST, R., CABANBAN, A., SANGALANG, R., SMITH, J.I., CHULAY, J.D., HOFFMAN, S.L. Rapid diagnosis of malaria by acridine orange staining of centrifuged parasites. **Lancet**, London, v.1, p.68-71, 1989.

RUBIO, J.M. BENITO, A. ROCHE, J. BERZOSA, P.J., GARCÍA, M.L., MICO, M., EDÚ, M. ALVAR, J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium falciparum vivax* infection in equatorial guinea. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.60, n.2, p.183-187, 1999.

RUBIO, J.M., BUHIGAS, I., SUBIRATS, M., BAQUERO, M., PUENTE, S., BENITO, A. Limited level of accuracy provided by available rapid diagnosis tests for malaria enhances the need for PCR-based reference laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.7, p.2736-2737, 2001.

SCHINDLER, H.C., MONTENEGRO, L., MONTENEGRO, R., CARVALHO, A. ABATH, F.G.C. JAUREGUIBERRY, G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, n.4, p.355-361, 2001.

SINGH, B., BOBOGARE, A., COX-SINGH, J., SNOUNOU, G., ABDULLAH, M.S., RAHMAN, H.A. A genus- and specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.60, n.4, p.687-692, 1999.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., JARRA, W., THAITONG, S., BROWN, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.58, p.283-292, 1993a.

SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., ZHU, Z.P., JARRA, W., PINHEIRO, L., ROSARIO, V.R., THAITONG, S., BROWN, K.N. High sensitivity of detection of human malaria parasite by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.61, p.315-329, 1993b.

THAM, J.M., LEE, S.H., TAN, T.M.C., TING, R.C.Y., KARA, U.A.K. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: Comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT malaria Pf testes in a clinical environment. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n.1, p. 1269-1273, 1999.

TIRASOPHON, W.; PONGLIKITMONGKOL, M.; WILAIRAT, P.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S. A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* in infected blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.175, p.179-184, 1991.

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

TJITRA, E., SUPRIANTO, S., McBROOM, J., CURRIE, B.J., ANSTEY, N.M. Persiste ICT Malaria P.f/P.v Panmalarial and HRP2 antigen reactivity after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria is associated with gametocytemia and results in false-positive diagnoses of *Plasmodium vivax* in convalescence. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.39, n.3, p.1025-1031, 2001.

VERONESI, R. & FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1997. p.1260-1501 , 1997.

WALSH, P. S., METZGER D. A., HIGUCHI, R. Chelex ® 100 as a Medium for simple extraction of DNA for PCR –based typing from forensic material. **Biotechniques**, v(10) , nº (4), p.506-518, 1991.

WATERS, A.P., McCUTCHAN, T.F. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. **Lancet**, London, v.8651, p.1343-1346, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria diagnosis, News Perspectives, **Report of a joint WHO/USAID Informal Consultation**, WHO/CDS/RBM/2000.14, 2000.

YLITALO, N., BERGSTRÖM, T., GYLLENSTEN, U. Detection of genital human Papillomavirus by single-tube nested PCR and type-specific oligonucleotide hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.7, p.1822-1828, 1995.