

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS MOLECULARES
BASEADAS EM PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)
PARA A DETECÇÃO GÊNERO-ESPECÍFICA DE *Plasmodium***

LÍLIAN MARIA LAPA MONTENEGRO

**RECIFE
2002**

LÍLIAN MARIA LAPA MONTENEGRO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS
MOLECULARES BASEADAS EM PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE) PARA A DETECÇÃO GÊNERO-ESPECÍFICA DE
*Plasmodium***

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, PhD
Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath, PhD**

**RECIFE
2002**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS MOLECULARES
BASEADAS EM PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) PARA A
DETECÇÃO GÊNERO-ESPECÍFICA DE *Plasmodium***

ORIENTADORES:

Dra. Haiana Charifker Schindler

Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath

EXAMINADORES:

Dra. Nilma Cintra Leal

Dr. Mariano Gustavo Zalis

Dra. Teresa Jansem A. Catanho

SUPLENTE:

Dra. Teresa Cristina Leal Balbino

Dr. Carlos Manoel Machado Carneiro

AVALIAÇÃO:

Aprovada (X)

Reprovada ()

"A vida é uma peça de teatro que não permite
ensaios.

Por isso cante, chore, dance, sorria, ame, odeie
e viva intensamente, antes que a cortina se feche
e a peça termine sem aplausos."

Anônimo.

"Ao anjo da minha vida, Gabriela, por ter
me dado o privilégio de ser mãe,
saboreando o mais puro sentimento do amor.

Obrigada

pela sua existência em minha

vida

que tanto me renova e fortalece."

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a energia da vida, a capacidade para vencer os obstáculos e a força para terminar mais essa etapa da minha vida. “Deus é a energia vital dos grandes homens”.

À Dra. Haiana Charifker Schindler e Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath, orientadores e amigos, pela oportunidade de trabalho e aprendizado concedida, pela confiança, ensinamentos, amizade, paciência, incentivo, respeito e carinho que tanto contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, meus eternos agradecimentos e minha profunda admiração.

À minha grande amiga e companheira de trabalho Rosana de Albuquerque Montenegro, pelo constante apoio, dedicação, assistência, incentivo, companheirismo, amizade, pelos momentos de alegria e tristeza que passamos juntas e pelas palavras de conforto e carinho que sempre recebi, minha eterna gratidão e amizade.

À minha família pelo amor, proteção, apoio nos momentos difíceis e pela vibração nos momentos de alegria. Em especial agradeço aos meus pais pelo exemplo de vida. Sem vocês, eu não seria ninguém.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, na pessoa de seu ex-diretor Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, por permitir a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores, Dra. Nilma Cintra Leal e Dr. Mariano Gustavo Zalis, pelo apoio científico e correção do trabalho.

As amigas Renata Costa Souza, Kirte Teixeira, Edeneide Xavier, Andrea Santos, Lílian Beck e Janaina Melo pela amizade, carinho, apoio, eficiência, valiosas sugestões e ajuda na realização deste trabalho.

Ao amigo Diego Falcão pelo auxílio, atenção e ensinamentos que foi de grande ajuda na seleção do mestrado.

Aos pesquisadores, técnicos e estagiários do Departamento de Imunologia pela força e colaboração.

A Dr. Roberto Werkhauser pela disposição em sempre colaborar com seus conhecimentos.

A Gilvan Mariano e Max Sitcovsky pelo suporte técnico em informática.

A bibliotecária Luciana Abrantes e todos os funcionários da biblioteca, pela ajuda e correções nas pesquisas bibliográficas.

Aos meus sogros Joel e Cléia Granja, pela compreensão e carinho.

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

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1.1. Consideraçõesgerais	2
1.2. Noções sobre o vetor, agente etiológico e ciclo evolutivo da malária ...	2
1.3. Histórico	4
1.4. Situação epidemiológica da malária no mundo e no Brasil	6
1.5. Transmissão e controle	9
1.6. Diagnóstico clínico e laboratorial da malária	12
1.6.1. Clínico	12
1.6.2. Laboratorial	12
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
3. OBJETIVOS	33
4. ARTIGO CIENTÍFICO	28
5. CONCLUSÕES	60
6. ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	Center of Diseases Control
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ES	Esfregaço Sangüineo
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 de Saúde
pb	Pares de bases
pg	Picograma
pmol	Picomol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIACM	Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal
QBC	Quantitative Buffy Coat
RNA	Ácido Ribonucléico
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico ribossomal
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

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, determinada por protozoários esporozoários do gênero *Plasmodium* (Pessoa & Martins, 1988; Rey, 2001a; Veronesi & Focaccia, 1997; Hommel & Gilles 1998).

É também conhecida como paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente ou, de acordo com suas formas clínicas, por febre terçã benigna, febre terçã maligna e febre quartã. Recebe no Brasil outros nomes populares, como: maleita, sezão, tremedeira, batedeira, ou simplesmente, febre. Continua sendo uma das mais importantes doenças parasitárias, se bem que as medidas de controle e os medicamentos já lhe tenham retirado parte daquele caráter de flagelo da humanidade, que antes lhe era atribuída (Pessoa & Martins, 1988; FUNASA, 2001c; Rey, 2001b).

1. 2. NOÇÕES SOBRE O VETOR, AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO EVOLUTIVO DA MALÁRIA

Todos os transmissores de malária dos mamíferos são insetos da ordem *Diptera*, da família *Culidae* e do gênero *Anopheles*. Esse gênero compreende cerca de 400 espécies, das quais apenas 60 são transmissores naturais e 30 são de maior importância epidemiológica (Bruce Chwatt, 1985). Na região Neotropical existem várias espécies que são vetores primários de plasmódios humanos, entre eles podemos citar: *Anopheles darlingi*, *A. deaneorum*, *A. albitarsis*, *A. truneztovari*. O *A. 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 (Rey, 2001d).

Classificação taxônomica do agente etiológico da malária humana (Cox, 1998; Hommel & Gilles, 1998).

Subreino: Protozoa

Filo: Apicomplexa

Classe: Haematozoa

Subclasse: Sporozoa

Subclasse: Coccidia

Ordem: Eucoccidiida

Família: Plasmodiidae

Subordem: Haemosporina

Gênero: *Plasmodium*

Espécies: *vivax*, *falciparum*, *ovale*, *malariae*

- 1) *Plasmodium vivax*: agente da febre terçã benigna, com ciclo febril que retorna a cada 48 horas;
- 2) *Plasmodium falciparum*: produz a febre terçã maligna, com quadros clínicos em que os acessos febris repetem-se ciclicamente com intervalos de 36 a 48 horas. É responsável pela maioria dos casos fatais;
- 3) *Plasmodium ovale*: com distribuição limitada ao Continente Africano e responsável por outra forma de febre terçã benigna, com ciclo de 48 horas;
- 4) *Plasmodium malariae*: causa da febre quartã, que se caracteriza pela ocorrência de acessos febris a cada 72 horas.

O *P. falciparum*, comparado com as outras espécies, é mais virulento, causando maior morbidade e mortalidade (Gupta, *et al.*, 1994; Veronesi & Focaccia, 1997). Essa espécie, apresenta-se como um grave problema terapêutico, devido à crescente resistência à cloroquina e outras drogas (Onori, 1984; Hommel & Gilles, 1998; Newton & White, 1999).

Os parasitas da malária infectam alternadamente um hospedeiro vertebrado e um invertebrado. O gênero *Plasmodium* foi definido, baseando-se no ciclo de vida do parasita, com as seguintes fases de desenvolvimento:

1. Fase sexuada: também conhecida por fertilização, ocorre no estômago do *Anopheles*;
2. Primeira fase assexuada: ocorre no epitélio do estômago e corpo do mosquito/vetor, chamada de esporogonia;

3. Segunda fase assexuada: acontece no hospedeiro vertebrado, especificamente nas células parenquimatosas do fígado, conhecida por esquizogonia exoeritrocítica;
4. Terceira fase assexuada: desenvolve-se no sangue do hospedeiro vertebrado (parasitas intraglobulares), apresentando uma esquizogonia eritrocítica, que se repete muitas vezes.

O ciclo inicia quando a fêmea *Anopheles* se alimenta com sangue infectado contendo gametócitos. Os macros e micros gametócitos livres iniciam o processo de fertilização, produzindo um zigoto, que vai se desenvolver em 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 (Pessoa & Martins, 1988; Veronesi & Focaccia, 1997; Hommel & Gilles, 1998).

A fase no hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea ao se realimentar, inoculará os esporozoítas na corrente sanguínea e esses rapidamente invadirão os hepatócitos, transformando-se em trofozoítas hepáticos, que amadurecem e sofrem várias divisões, produzindo milhares de merozoítas. Os hepatócitos se rompem liberando os merozoítas na circulação, iniciando o ciclo eritrocítico. No caso do *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítas podem originar os hipnozoítas, que são células latentes nos hepatócitos e que podem se desenvolver meses ou anos mais tarde, causando as conhecidas recidivas da doença. No ciclo eritrocítico, ocorre nova divisão assexuada, os merozoítos recém-invasores do sangue desenvolvem-se em trofozoítas, que amadurecem, se dividem várias vezes, formando esquizontes. Os esquizontes maduros levam à ruptura da hemácia que libera número de merozoítas capazes de reinfectar novas hemácias, Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítas se diferenciam em gametócitos machos e fêmeas (macro e microgametócitos), que amadurecem sem divisão celular e se tornam infectantes aos mosquitos (Pessoa & Martins, 1988; Veronesi & Focaccia, 1997; Hommel & Gilles, 1998).

1. 3. HISTÓRICO

Tendo sido 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, 2001c).

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, onde recebeu o Prêmio Nobel (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. Os italianos, Grassi, Bastianelli e Bignami em

1899 descreveram, pela primeira vez, o desenvolvimento completo das três espécies de parasita da malária nos anofelinos. Entre 1898 e 1899 conseguiram 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 suspeito como possível transmissor da doença. Em Roma, o paludismo 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 as febres intermitentes como sendo causadas por seres pequeníssimo, invisíveis, existente 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. 4. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA MALÁRIA NO MUNDO E NO BRASIL

A malária é uma doença universal de grande relevância para a saúde pública em vários países tropicais, associada ao subdesenvolvimento e à pobreza, que afeta e mata predominantemente uma população de miseráveis com pouca ou nenhuma expressão econômica social e política. Durante séculos foi considerada a mais grave das doenças parasitárias humanas e atualmente essa endemia continua sendo um dos mais importantes problemas para as comunidades e um perigo para os viajantes (Pessoa & Martins, 1988; Rey, 2001c; 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 mais de 90% destes ocorrem na África Tropical, região situada ao sul do Deserto do Saara (Bremen, 2001; WHO, 2001).

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, Siri Lanka, Afeganistão, Vietnã e Colômbia. Em cada um destes países a malária está concentrada em determinadas áreas (Figura 1) (WHO, 1994; WHO, 1996).

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 (Veronesi & Focaccia, 1997).

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).

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 se concentra na região norte do país. Nela, a doença não está distribuída homogeneamente e seus níveis endêmicos diferem na dependência da variabilidade e intensidade da associação de

fatores de risco de natureza biológica, ecológica, sócio-cultural, econômica e política, os quais são responsáveis pela persistência e até mesmo pelo aumento da transmissão no país. As áreas de maior transmissão são aquelas onde as pessoas são recém-chegadas, as habitações e as condições de trabalho são muito precárias e ficam próximas à floresta e às coleções de água. Fora da Amazônia, a transmissão está praticamente interrompida, restringindo-se a alguns pequenos focos residuais e a focos novos de pequena magnitude (Veronesi & Focaccia, 1997).

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. Em termos gerais, o acelerado crescimento da malária na Amazônia deve-se à migrações humanas para as áreas de floresta úmida, afetando diversos grupos, tais como, garimpeiros, colonos, moradores das periferias, de cidades e comunidades indígenas (Marques & Gutierrez, 1994).

Apesar dos principais focos de malária estarem associados à atividade agrícola e de mineração, ultimamente as periferias das cidades vêm assumindo participação importante devido à deterioração das estruturas urbanas em função da migração da zona rural para a cidade, como se vê em Manaus. Nessas situações, os grupos de risco são representados principalmente por adultos cujo trabalho os expõe mais aos vetores (Silva, 1998).

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 Amazônia domina o quadro malárico do Brasil. A área endêmica é constituída pela Amazônia Legal, que se compõe dos Estados do Pará, Amazonas, Acre, Amapá, Roraima e Rondônia e parte dos Estados de Mato Grosso, Goiás e Maranhão (Pessoa & Martins, 1988).

Trata-se de uma região onde predomina a floresta tropical úmida, inter cruzada 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 *Plasmodium* e do anofelino vetor, favorecendo a transmissão perene da malária, com exacerbações da endemia e surtos epidêmicos nas áreas periféricas de ocupação (Tauil, 1986).

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, onde se localizam 99,7% do total de casos do país, 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, 79.228 no Nordeste, 6.192 no Centro-Oeste, 515 no Sudeste e 204 na região Sul do país (FUNASA, 2001a,b).

As espécies de plasmódio que infectam o homem encontradas no Brasil são o *P. vivax*, o *P. falciparum* e o *P. malariae*. Os *P. falciparum* e *vivax* são os responsáveis pela quase totalidade dos casos, havendo, inclusive registros de formas mistas (FUNASA, 1999).

Na Amazônia, um quarto dos 18 milhões de habitantes vive em áreas de risco que ocupam menos de 40% dos 5.000.000 de Km² da região. Ainda assim, mais de 99% dos casos brasileiros foram registrados nesta região, que representa mais da metade do território brasileiro, mas só abriga cerca de 12% da população. Em Rondônia, paraíso da doença, onde 90% dos mosquitos são transmissores, a malária é responsável por 50% dos atendimentos médicos-hospitalares! (Ribeiro, 1996).

1. 5. TRANSMISSÃO E CONTROLE

Até meados do século XX, a malária era uma doença de elevada endemicidade em extensas áreas de todos os continentes. Essa situação tem sofrido modificações significativas em virtude do desenvolvimento social e econômico de muitos países, bem como de ações de controle e erradicação que vêm sendo desenvolvidas (FUNASA, 1999). Os estudos, em nosso país, foram iniciados no início do século XX, com o objetivo de definir procedimentos destinados à proteção das populações residentes em áreas com transmissão (Marques & Gutierrez, 1994).

Por ser uma doença que não se transmite com igual intensidade e rapidez em todas as áreas com potencial malarígeno, a malária apresenta uma dinâmica de transmissão variável entre os agrupamentos humanos que habitam diferentes nichos ecológicos, onde se conjuga a interação de fatores de risco de origem diferentes. Os fatores biológicos formam os elos da cadeia de transmissão; os fatores ecológicos, favorecem ou dificultam a transmissão; os fatores sócio-culturais originam as atitudes das pessoas para evitar a infecção e determinam seu comportamento em caso de adoecer; os fatores de ordem econômica e política participam em maior ou menor proporção na prevalência da malária (Marques & Gutierrez, 1994).

A transmissão natural ocorre por meio de picadas de mosquito infectado, sendo o parasita, o mosquito transmissor e o homem os elementos primários da transmissão. São influenciados pelas características do ambiente (principalmente temperatura, índices pluviométricos, umidade relativa, altitude, cobertura vegetal) e pelos hábitos, condições de vida, moradia e trabalho das populações (Veronesi & Focaccia, 1997).

Como outros agentes infecciosos, os parasitas da malária podem ser transmitidos acidentalmente por transfusões sanguíneas, pela administração de hemoderivados, através da troca de agulhas entre usuários de drogas ou ainda de maneira rara através de infecção neonatal (Bruce-Chwatt, 1974; Andrade & Wanderley, 1992; Andri-Guetti *et al.*, 1992; Hulbert, 1992).

O diagnóstico precoce e o tratamento rápido foram os primeiros elementos básicos referidos pela OMS, para o controle e erradicação da

doença, durante a Conferência Ministerial em Malária, realizada na Holanda, em 1992 (WHO, 1992).

A Organização Mundial de Saúde recomenda a adoção de uma nova estratégia global de luta contra a doença com base na realidade epidemiológica e social local, com incorporação de medidas de controle adequadas a cada situação, ação multissetorial para redução da influência de fatores de risco de natureza socio-econômica, cultural, política e ecológica, e participação ativa da população. Busca-se o controle integrado da malária, como uma ação conjunta do governo e da sociedade dirigida para eliminação ou redução dos riscos de mortalidade e morbidade da doença (Veronesi & Focaccia, 1997).

Com o objetivo de reverter a tendência de crescimento em 50% dos casos de malária registrados no ano de 1999, a Fundação Nacional de Saúde/FUNASA, elaborou um Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM), executando parcerias com estados e municípios. No ano de 2000, o Ministério da Saúde disponibilizou recursos da ordem de R\$ 148 milhões para o combate, utilizado no treinamento de cerca de cinco mil profissionais da área de saúde, na compra e distribuição de medicamentos, na aquisição de veículos e embarcações e na ampliação da rede de laboratórios e do tratamento oferecido à população.

O controle da malária pós-transfusional ainda representa um desafio para os serviços hemoterápicos situados em áreas endêmicas. Em regiões não endêmicas, adota-se a exclusão temporária dos candidatos à doação procedentes de áreas com risco de transmissão, principalmente se apresentaram quadro febril não esclarecido, se fizeram uso de drogas anti-maláricas, ou se tiveram malária nos últimos 12 meses (Kiesslich *et al.*, 1997).

A eliminação dessa endemia, como problema de saúde pública, reduzirá, sem dúvida, as perdas de produção dos trabalhadores; aumentará os benefícios da utilização dos recursos naturais existentes, acessíveis hoje só a um alto custo social, representado pela morbimortalidade que a malária origina; diminuirá os custos hospitalar e ambulatorial dos doentes; propiciará o aumento da frequência escolar, favorecendo, com certeza, as populações de menores recursos na região. Como consequência, incentivará a fixação, em terras saudas, dos migrantes cujo trabalho contribuirá para nivelar a Amazônia aos centros de maior produtividade do Continente (Marques & Gutierrez, 1994).

1. 6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA MALÁRIA

1.6.1. Clínico:

A malária sintomática é bem conhecida, envolvendo mal-estar, dor de cabeça, dores musculares, náuseas e tonturas, seguidas de uma sensação de frio, acompanhada de tremor, febre, suor e diminuição da temperatura. Mas, esse quadro clássico pode ser alterado pelo uso de drogas profiláticas ou pela aquisição de imunidade. Muitos desses sintomas podem ou não estar presentes e até mesmo todos podem estar ausentes. Em muitas regiões, a malária é diagnosticada exclusivamente pela clínica do paciente, o que leva a um superdiagnóstico e ao uso indiscriminado de drogas, causando aumento da resistência dos parasitas (Ávila & Ferreira, 1996).

1.6.2. Laboratorial:

Os exames microscópicos de gota espessa (GE) e esfregaço sanguíneo (ES) corados com o Giemsa, têm sido utilizados em todo o mundo como método de diagnóstico laboratorial de malária desde o seu desenvolvimento por Ross, em 1903 (Clendennen *et al.*, 1995). Ronald Ross efetuou também algumas mudanças no esfregaço sanguíneo, como o aumento na concentração de sangue e a desmoglobinização, originando o método da gota espessa, que apresentou sensibilidade cerca de 20 vezes maior do que o esfregaço comum (Ávila & Ferreira, 1996). Referidos por apresentar vantagens como a possibilidade da identificação da espécie e estágio de desenvolvimento do plasmódio infectante, ser quantificável e de baixo custo, tem como 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 resultados (Ávila *et al.*, 1996).

O limite prático de detecção de parasitas através da microscopia convencional é estimado em 4-40 parasitas/microlitro de sangue, representando uma baixa sensibilidade quando comparado com alguns testes

baseados na detecção de DNA (Southern, 1975). Pode-se obter resultados falsos-negativos devido a quantidade relativamente pequena de sangue examinado ou falsos positivos pela presença de resíduos nas lâminas, requerendo assim, tempo e experiência para leitura das mesmas (Grant *et al.*, 1960).

Muitos outros métodos têm sido padronizados e avaliados como alternativos. O método de QBC (Quantitative Buffy Coat), desenvolvido por Wardlaw e Lavine em 1983, baseia-se na estratificação resultante da centrifugação do sangue em tubo capilar contendo o corante laranja de acridina, anticoagulante e um cilindro plástico (flotador) com uma densidade média entre a do plasma e das hemácias concentradas. Resultados na literatura demonstram uma maior sensibilidade do método quando comparado à gota espessa (Rickman *et al.*, 1989; Spilman & Perrone, 1989; Pornsilapatip *et al.*, 1990). Oferece uma alternativa rápida e superior a microscopia convencional em lâminas coradas pelo Giemsa (Veronesi & Focaccia, 1997). É importante ressaltar, que esta técnica é difícil de ser viabilizada em lugares remotos, pois necessita de uma série de equipamentos essenciais no seu funcionamento e manutenção (microscópio de fluorescência, centrífuga e ar-condicionado), o que a torna pouco prática e de elevado custo (Naird & Jones, 1992; Schindler *et al.*, 2001).

Métodos alternativos têm sido estudados e propostos por diferentes laboratórios em todo o mundo. Inúmeros testes sorológicos para detecção de anticorpos maláricos têm sido ensaiados nesta patologia, mas nenhum deles, até o momento, pode substituir a demonstração dos parasitas no sangue, como método diagnóstico ideal nas formas agudas da doença (Veronesi & Focaccia, 1997). Entre os métodos sorológicos mais usados para a detecção de anticorpos contra a malária estão a imunofluorescência indireta, ELISA e radioimunoensaio, os quais podem ser particularmente úteis em estudos soropidemiológicos, como a determinação da endemicidade em uma determinada área ou a identificação de um provável foco da doença (Kreier, 1980).

Resultados discutidos na literatura mostram que em regiões onde ocorre diversidade de espécies, como no Brasil, a utilização do método de imunofluorescência para a pesquisa de plasmódio mostrou limitações de

sensibilidade, com resultados inferiores aos da gota espessa (Ávila *et al.*, 1996). Os referidos testes imunológicos não são aplicáveis devido ao elevado descarte de unidades que constitui risco transfusional e além de não apresentarem uma boa sensibilidade, são incapazes de discriminar uma infecção passada de uma presente (Kreier, 1980).

O desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas no diagnóstico da malária continua sendo um desafio para os pesquisadores da área. Durante as últimas décadas muitos progressos, especialmente nos métodos de detecção imunocromatográfica de antígenos têm sido alcançados. O ParaSight-F (Becton-Dickinson, Cockeysville, Md) é um teste que utiliza anticorpos anti-proteína rica em histidina tipo 2 (HRP-2), para detecção de antígenos específicos de *P. falciparum*. Pelo fato de ser específica para *P. falciparum*, dessa forma não detecta *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* e apresentar baixa sensibilidade, sua utilização tem sido indicada apenas nas áreas de difícil acesso (Ávila *et al.*, 1996), além da persistência do antígeno no sangue na ausência da doença (Faiz *et al.*, 2000; WHO, 2000). O teste ICT Malaria Pf/Pv (ICT Diagnostics, Sydney, Australia) é também baseado na tecnologia da imunocromatografia que utiliza anticorpos monoclonais para detecção do antígeno “pan-malarial” expressado pelos plasmódios *falciparum* e *vivax*, bem como anticorpos anti-proteína rica em histidina tipo 2 (HRP-2) para detecção de antígenos específicos de *P. falciparum* (Dyer *et al.*, 2000). Nos trabalhos de Tham *et al.* (1999) e Tjitra *et al.*, (2001) demonstram resultados de diagnósticos falsos-positivos de pacientes sintomáticos após o término do tratamento. O OptiMAL (Flow. Inc., Portland, OR) é um teste imunodiagnóstico que detecta *P. falciparum* e as outras espécies de plasmódios que infectam o homem, usando a captura de anticorpo para determinar a presença do antígeno lactate dehydrogenase (pLDH). Apesar de ser rápido, prático e não necessitar experiência do técnico laboratorial, a literatura relata casos de diagnósticos falsos-positivos (Cooke *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 2001).

Como resultado do grande progresso no campo da Biologia Molecular, várias técnicas têm sido introduzidas no desenvolvimento de testes para a pesquisa de microrganismos. Utilizando um DNA clonado ou sintetizado em fita simples, marcado com radioisótopos (sondas de DNA), pode-se pesquisar em amostras desconhecidas a presença de DNA complementar. O emprego da

sonda de DNA baseia-se na premissa de que, em um determinado organismo, há sequências de DNA específicas que diferenciam o organismo de outras espécies (Arroyo Sanches, 1996). No entanto sondas radioativas são estáveis por 1 ou 2 semanas apenas. Após este tempo, a radioatividade decai tornando a sonda menos sensível para hibridização (Ross, 1997). Devido a instabilidade das sondas radioativas e a algumas questões técnicas e de segurança ao se trabalhar com radioatividade, métodos de marcação de fragmentos de DNA não radioativos ou “frios” têm sido produzidos. Os nucleotídeos podem ser marcados quimicamente com a biotina, fosfatase alcalina ou moléculas quimioluminescentes como a digoxigenina. A maior vantagem das sondas frias é sua estabilidade, podendo guardá-las e usá-las com segurança durante um período de anos. Estas sondas podem detectar 20-25 parasitas por microlitro de sangue (Barker, 1990).

Métodos utilizando sondas de DNA e rRNA para detecção dos parasitos da malária foram introduzidos em 1984 e 1989, respectivamente (Kimura *et al.*, 1995). Diferentes sondas genéticas têm sido estudadas no diagnóstico da malária: sondas de DNA total, sondas de DNA genômico da sequência de 21 pares de bases altamente repetitivos de *P. falciparum*, sondas de oligonucleotídeos sintéticos dessa mesma sequência e sondas de DNA genômico de *P. vivax*. Porém a alta sensibilidade desses métodos na detecção de plasmódios *in vitro*, não tem se confirmado quando aplicados em amostras de campo (Ross, 1997).

O desapontamento com as sondas de DNA levou ao desenvolvimento de sondas de RNA ribossomal como alternativa, pois na célula há de 10 a 50 vezes mais RNA que DNA e 90 a 95% dele são ribossomais (Arroyo Sanchez, 1996). O desenvolvimento de sondas de rRNA para quatro espécies de plasmódio infectantes ao homem (*P. faciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*) indicou o uso potencial dessas sondas para o diagnóstico da malária e também demonstrou ser mais promissora na detecção de baixas parasitemias, pelo fato do rRNA ser a macromolécula celular mais abundante do plasmódio, representando de 0,2 a 1,0pg, muito mais que o DNA total, equivalente a 0,02pg (Ávila & Ferreira, 1996).

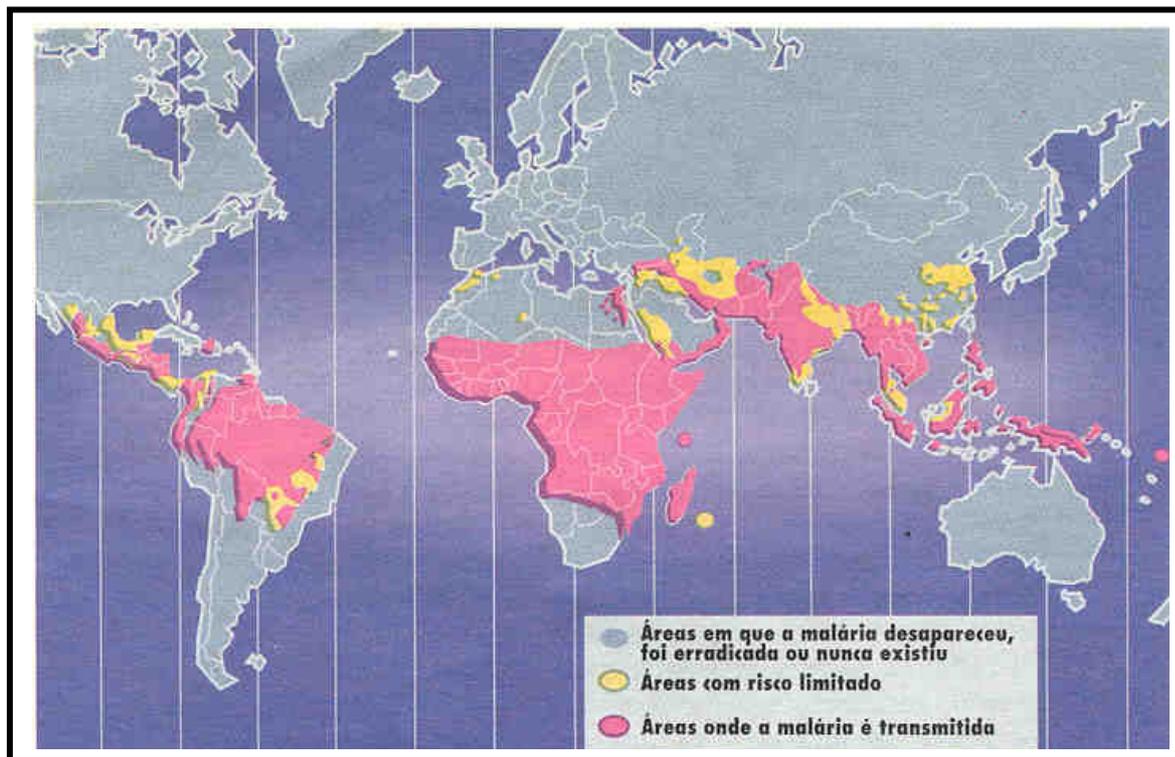
O rRNA é geralmente o mais abundante dos ácidos nucléicos, constituindo-se em alvo lógico para sistemas sensíveis de detecção

diagnóstica (McCutchan *et al.*, 1988; Lal *et al.*, 1989). A sequência da subunidade pequena do RNA (SSU rRNA), representa cerca de 30% do DNA total e exibe considerável diversidade espécie-específica localizada. São essas regiões espécie-específicas que representam os alvos e a base para o desenvolvimento de abordagens de detecção precisas e sensíveis como técnicas de amplificação de DNA. Aproximadamente 70% da pequena subunidade do SSU rRNA é suficientemente diferente da sequência humana correspondente (Waters & McCutchan, 1989; Snounou *et al.*, 1993b; Kimura *et al.*, 1995; Rubio *et al.*, 1999).

A Reação em Cadeia da Polimerase - PCR, descoberta por Kary Mullis em 1983, vem sendo amplamente utilizada para a detecção de DNA (Ross, 1997). A amplificação pela PCR baseia-se na multiplicação exponencial, *in vitro*, de um fragmento de DNA por uma DNA polimerase termoestável, em um processo repetitivo de aquecimento e resfriamento (30 a 40 vezes). O carácter exponencial deste processo se deve ao fato de que o DNA sintetizado em um ciclo serve como molde no próximo. Teoricamente 30 ciclos de amplificação produzem 10^9 cópias da molécula alvo. Quando a PCR é utilizada na detecção de microrganismos, um ou mais fragmentos específicos do gene são amplificados, de acordo com os iniciadores (molécula de DNA de fita simples que funciona como iniciador para a polimerização do novo DNA) (Arroyo Sanchez, 1996). Os iniciadores, associados às unidades de nucleotídeos livres, são adicionados à amostra de DNA junto com uma enzima resistente ao calor, a Taq polimerase, que promove a síntese de DNA. Os produtos da PCR são comumente analisados por hibridização ou por eletroforese em gel de agarose, corado com brometo de etídio e visualizado através de raios ultravioleta (Ross, 1997).

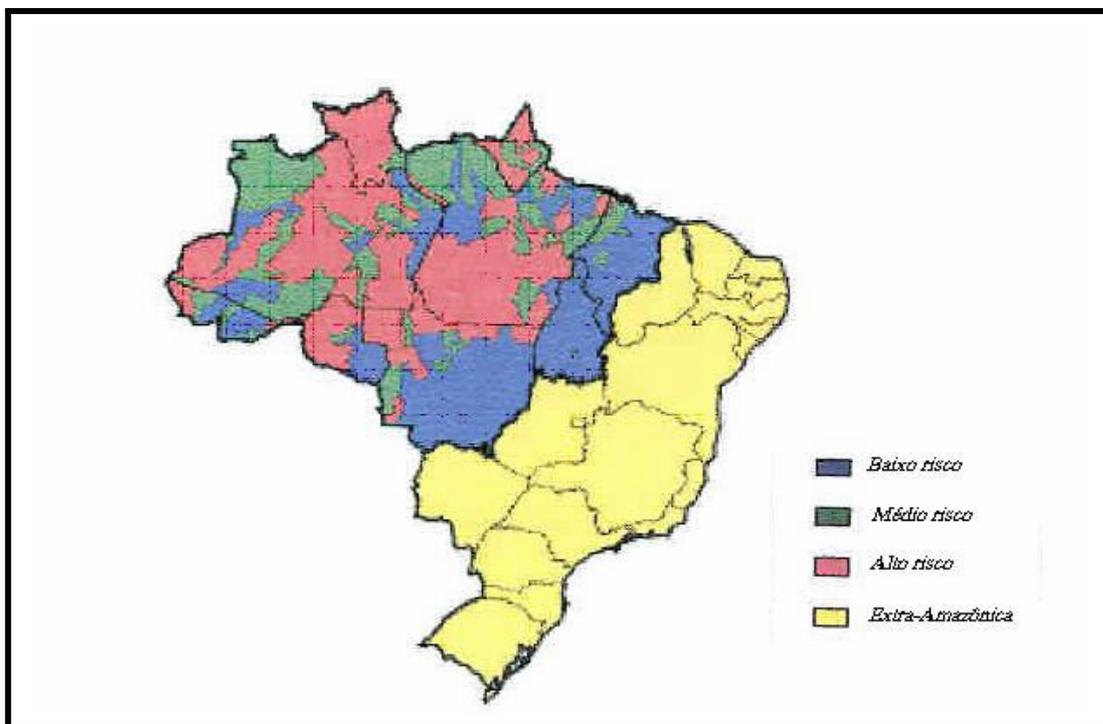
A técnica de “nested” PCR é uma variação da PCR, onde geralmente são necessários dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores de reação subsequentes: na 1ª utiliza-se um par de oligonucleotídeos com homologia em região externa ao DNA alvo e na segunda, que utiliza como molde o produto da 1ª reação, o outro par de oligonucleotídeos, tendo homologia na região mais interna. Esta variação é útil nos casos em que se necessita de uma alta especificidade e um aumento no limiar de detecção.

Desde 1990, o diagnóstico da malária através de métodos de detecção do DNA de plasmódios, tem sido largamente utilizado através do emprego de diversos métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR, Polymerase Chain Reaction) (Jaureguiberry *et al.*, 1990; Snounou *et al.*, 1993 a, b; Laserson *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1995; Zalis *et al.*, 1996; Cox-Singh *et al.*, 1997; Rubio *et al.*, 1999; Laoboonchai *et al.*, 2001; Schindler *et al.*, 2001;).



Fonte: OMS, 1999

Figura 1. Distribuição Mundial da Malária



Fonte: FUNASA, 1999.

Figura 2. Transmissão da Malária no Brasil

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRI-GUETTI, M.T., BARATA, L.C.B. CAMPOS, P.C, MATTOS, M.R. Surto de malária entre usuários de drogas injetáveis no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.25, supl.2, p.47, 1992.

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

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

ANDRADE, J.C.R., WANDERLEY, D.M.V. **Malária induzida no Estado de São Paulo**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.25, supl.2, p.44, 1992.

ARROYO SANCHES, M.C.A. **Testes sorológicos**. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.L. (ed) Diagnóstico Laboratorial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap.2, p.7-28.

BARKER JR., R.H. **DNA probe diagnosis of parasitic infections**. Experimental Parasitology, San Diego, v.70, p.494-499, 1990.

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. Transfusion malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.50, n.3/4, p.337-346, 1974.

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

CLENDENNEN, T.E., LONG, G.W., BIRD, J.K. QBC and giemsa-stained thick blood films: diagnostic performance of laboratory technologists. **Transactions the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.89, p.183-184, 1995.

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

COX, F.E.G. Classification of the Parasitic Protozoa. In: **MICROBIOLOGY and Microbial Infections**. 9.ed. London: Arnold, 1998. V.5, cap.7, p.141-155.

COX-SINGH, J., MAHAYET, S., ABDULLAH, M.S., SINGH, B. Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using sampling and DNA extraction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.27, n.12, p.1575-1577, 1997.

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.

DYER M.E., TJITRA, E., CURRIE, B.J., ANSTEY, N.M. Failure of the 'pan-malarial' antibody of the ICT Malaria P.f/P.v® immunochromatographic test to detect symptomatic *Plasmodium malariae* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94 p. 518, 2000.

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.

FAIZ, M.A., RASHID, R., PALIT R., RAHMAN, M.R., YUNUS, E.B., HUSSAIN, A., RAHMAN E., TALUKDAR, K.R., BANGALI, A.M., MONTANARI, M. ParaSight™-F test results in cerebral malaria patients before and after treatment in Chittagong Medical College Hospital, Bangladesh. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, p.56-57, 2000.

FUNASA, **Boletim epidemiológico**: Malaria, Brasília, DF, ano III, p.17, 1999.

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, **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Vigilância epidemiológica de doenças e agravos específicos. Malária. In: Brasília, DF, Cap.5.19., 2001c.

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.

GUPTA, S., HILL, A.V.S., KWIATKOWSKI, D., GREENWOOD, B.M., DAY, K.P. Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.91, p.3715-3719, 1994.

HOMMEL, M., GILLES, H.M. Malaria. In: **MICROBIOLOGY and Microbial Infections**. 9.ed. London: Arnold, 1998. v.5, cap.20, p.362-409.

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

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.

KIESSLICH, D., TORRES, K.L., SILVA, R.C., FRAIJI, 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.

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

LAL, A.A., CHANGKASIRI, S., HOLLINGDALE, M.R., McCUTCHAN T.F. Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.36, p.67-72, 1989.

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, n.6, p.458-462, 2001.

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

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.

NAIRD, J.K., JONES, T.R. Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. **Transactions the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.86, p.345, 1992.

NEWTON, P., WHITH, N. Malaria: new developments in treatment and prevention. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v.50, p.19-90, 1999.

ONORI, E. The problem of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Africa south of the Sahara. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.62,(suppl), p.55-62, 1984.

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.

PORNSILAPATIP, J., NAMSIRIPONGPUN, V., WILDE, H., HANVANICH, M., CHUTIVONGSE, S. Detection of plasmodia in Acridine Orange stained

cappillary tubes (the QBC system). **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.21, p.534-540, 1990.

REY, L. Os Plasmódios e a Malária: I. Os Parasitos. In:____ **Parasitologia**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. Cap. 26, p.335-348.

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.

REY, L. Os Plasmódios e a Malária: Controle e Erradicação. In:____ **Parasitologia**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001d. Cap. 29, p.386-396.

RIBEIRO, C.T.D. Do sexo e dos mosquitos. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, 25 jan. 1996. Caderno Opinião, p.07.

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 of centrifuged parasites. **Lancet**, London, v.1, p.68-71, 1989.

ROSS, D.W. **Bases da Biologia Molecular**. 2.ed. São Paulo: Interlivros, p.43-56, 1997.

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, 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.

SILVA, L.H.P. Malária. **Médicos**, jul/ago. p.32-32, 1998.

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.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v.98, p.503-517, 1975.

SPIELMAN, A., PERRONE, J.B. Rapid diagnosis of malaria (letter). **Lancet**, London, n.8629, p.435, 1989.

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.

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. World malaria situation in 1990. **World Health Statistic Quartely**, Geneva, v.42, p.257-266, 1992.

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

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Weekly epidemiological record**, Geneva, 9th. Feb. 1996.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Consultation in Geneva tackles malaria diagnostics. **TDR news**, Geneva, n.61, p.12, Feb. 2000.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO information: Malaria. **Fact Sheets**, Geneva, n.94, Oct. 1998. Disponível em: <<http://who.int/inf-fs/em/fact094.html>>. Acesso em: 28.set.2001.

ZALIS, M.G., FERREIRA-DA-CRUZ, M.F., BALTHAZAR-GUEDES, H.C., DRUILHE, P., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria diagnosis: standardization of a polymerasechain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. **Parasitology Research**, Berlin, v. 82, p. 612-616, 1996.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ABORDAGENS MOLECULARES BASEADAS EM PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE) PARA A DETECÇÃO GÊNERO-ESPECÍFICA DE *Plasmodium*

Lílian Maria Lapa Montenegro^{1,2}, Rosana de Albuquerque Montenegro^{1,2}, Alexandre Bezerra de Carvalho¹, Andrea Santos Lima¹, Frederico Guilherme Coutinho Abath¹, Haiana Charifker Schindler¹

- 1- Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ-Recife/PE.
- 2- Departamento de Biofísica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência primária do gene codificando o rRNA de *Plasmodium* para amplificar DNA de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, de maneira gênero-específica. Três sistemas de PCR foram utilizados: PCR simples, “hemi-nested” PCR convencional e “hemi-nested” PCR em um único tubo, desenvolvidos em nosso laboratório. Na PCR simples, composta de 30 ciclos, foram utilizados os oligonucleotídeos GJ1 e HR842 (20 pmol/50µl), já testados por nosso grupo. Na “hemi-nested PCR convencional utilizou-se três oligonucleotídeos (GJ1, PGFO3 e HR842), em duas reações sequenciais, sendo o PGFO3 construído durante o desenvolvimento do presente trabalho, visando a detecção do gênero *Plasmodium*. O par GJ1 e HR842 foram utilizados como oligonucleotídeos externos na primeira reação, e o PGFO3 como interno, ancorado ao HR842 na segunda reação. A “hemi-nested” PCR em um único tubo consistiu em 60 ciclos (92°C, 30s; 58°C, 30s e 72°C, 45s), e concentrações limitantes de oligonucleotídeos externos (4 pmols/50µl) participavam da PCR sem competição com os oligonucleotídeos internos durante os primeiros 15 ciclos da reação e 40 pmol/50µl de primers internos (imobilizados na face interna da tampa do microtubo) foram introduzidos na PCR no 16º ciclo. As concentrações

dos outros componentes da reação foram as mesmas utilizadas nas reações convencionais de PCR. Observou-se que a quantidade mínima de DNA genômico detectada pela PCR simples, “hemi-nested” PCR e “hemi-nested” PCR em um único tubo foi de 10 pg; 0,01 pg e 0,1 pg, respectivamente. Apesar da “hemi-nested” PCR em um único tubo ter sido menos sensível que a “hemi-nested” PCR convencional, é muito mais simples e conveniente, já que o risco de contaminação cruzada é bem menor. Esses sistemas moleculares de diagnóstico podem ser usados em situações quando se requer uma alta sensibilidade e especificidade, tais como na avaliação da eficiência de quimioterapia, detecção precoce de infecção e prevenção de transmissão a partir de pacientes hipoparasitêmicos.

ABSTRACT

Primers targeting the gene encoding the *Plasmodium* rDNA SSU were designed so that they could amplify DNA from *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, and *P. ovale*, in a genus specific way. In addition to primers already tested by our group (GJ1 and HR842), a new primer specific for the genus *Plasmodium* was synthesized (PGFO3). Three PCR systems were used: simple PCR, conventional nested-PCR, and a single tube nested-PCR developed in our laboratory. The simple PCR (detection limit of 10 pg) consisted of 30 cycles in which the primers GJ1 and HR842 (20 pmol/50 μ l) were used. The conventional nested PCR comprised two sequential reactions using GJ1 and HR842 as external primers and PGFO3 and HR842 as internal primers. The single tube nested PCR system comprised 60 cycles (92 $^{\circ}$ C, 30s, 58 $^{\circ}$ C, 30s, and 72 $^{\circ}$ C, 45s) in which limiting concentrations of external primers (4 pmol/50 μ l) participated of the PCR without competition of internal primers during the first 15 cycles of the reaction, and 40 pmol/50 μ l of internal primers (immobilized onto the internal face of the microtube cap) were introduced into the PCR system at cycle 16. The concentrations of the other components of the reaction were the same used in standard PCR reactions. The PCR system showed a detection limit of 0,1pg of *Plasmodium* genomic DNA, being more sensitive than the simple PCR. Although the single tube nested was less

sensitive that the conventional 2-step nested PCR (detection limit of 0,01pg), it is much simple and more convenient, as the risk of cross-contamination is lower. These molecular diagnostic systems can be used in the situations in which high sensitivity is required, such as evaluation of chemotherapeutic efficiency, and sensitive tests are useful for early detection of infection and prevention of transmission from low parasitemia patients.

Palavras-chaves: SSU rRNA, *Plasmodium*, oligonucleotídeos, PCR.

INTRODUÇÃO

Os métodos microscópicos de gota espessa (GE) e esfregaço sanguíneo (ES), considerados padrão de referência, ainda têm sido utilizados como principais métodos diagnósticos da malária. Apesar de terem custo reduzido, serem rápidos e permitirem a quantificação e diferenciação dos parasitas, possuem fatores limitantes que vão desde a necessidade de precisão técnica na preparação, manuseio e coloração das lâminas, tempo de leitura até a experiência do microscopista (Ciceron *et al.*, 1999; Schindler *et al.*, 2001). Outro fator fundamental que interfere no diagnóstico da malária é a dificuldade na detecção de portadores com baixa parasitemia, que geralmente não apresentam quadro clínico, sendo fonte de infecção para o vetor e de manutenção da malária pós-transfusional.

Vários métodos diagnósticos alternativos sensíveis, específicos, rápidos e que identificam precisamente infecções maláricas têm sido recentemente desenvolvidos. Testes imunocromatográficos para detecção de antígenos circulantes no sangue são simples e rápidos, porém não possuem adequada sensibilidade. Além disso, alguns desses testes detectam apenas antígenos de *P. falciparum*. Uma outra limitação é que estes antígenos podem persistir no sangue após o desaparecimento da parasitemia e dos sintomas clínicos (Cooke *et al.*, 1999; Tjitra *et al.*, 2001). Técnicas moleculares baseadas na metodologia da PCR têm demonstrado ser eficientes em detectar níveis muito baixos de parasitemia, servindo sobretudo na triagem de doadores de sangue e

no diagnóstico de hipoparasitêmicos (Zalis *et al.*; 1996; Rubio *et al.*; 1999; Schindler *et al.*, 2001).

A técnica de nested PCR envolve a amplificação de sequências de DNA, onde geralmente são necessários dois conjuntos de oligonucleotídeos, utilizados em reações subsequentes, de forma que o produto da primeira sirva como molde para a segunda reação. É bastante útil nos casos em que se requer alta sensibilidade e especificidade.

Um alvo bastante usado na detecção de patógenos, através de abordagens moleculares é o RNA ribossomal. A sequência da pequena subunidade do rRNA de *Plasmodium* (SSU rRNA) é composta de regiões conservadas e variáveis, representando cerca de 30% do rRNA total. Aproximadamente 70% do SSU rRNA é diferente da sequência SSU rRNA correspondente ao humano, permitindo a identificação de sequências diagnósticas. Dessa forma, nos últimos anos, os trabalhos têm focalizado, preferencialmente, na utilização desse gene como alvo no diagnóstico molecular da malária, pois permite a amplificação de regiões gênero e espécie-específicas (Waters & McCutchan, 1989; Snounou *et al.*, 1993a; Schindler *et al.*, 2001).

No presente trabalho, sequências conservadas no gene codificando o SSU rRNA de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* foram identificadas e utilizadas na construção de oligonucleotídeos, servindo como alvo para o desenvolvimento de abordagens moleculares sensíveis e específicas. Três métodos baseados em PCR foram utilizados: PCR simples, “hemi-nested” PCR (HNPCR) e “hemi-nested” PCR em um único tubo de reação (STHNPCR), para a detecção gênero-específico da malária humana.

OBJETIVOS

- Desenvolver e validar novas abordagens moleculares para detecção gênero-específica de infecções por Plasmodium.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar regiões diagnósticas no gene codificando o SSU rRNA;
- Desenvolver sistemas gênero-específicos baseados em PCR: PCR simples, hemi-nested PCR convencional (HNPCR), hemi-nested PCR em um único tubo (STHNPCR);
- Desenvolver um sistema capaz de identificar inibidores de PCR;
- Determinar o limite de detecção das abordagens.

MATERIAIS E MÉTODOS

Identificação de sequências alvos no gene codificando a subunidade pequena do rRNA (SSU rRNA) para a detecção gênero-específica da malária humana

As sequências da subunidade pequena do rRNA (SSU rRNA), referentes às diversas espécies de *Plasmodium* e *Homo sapiens*, foram obtidas utilizando os recursos computacionais para pesquisa sobre rRNA da Universidade da Antuérpia, Bélgica (<http://rrna.uia.ac.be>) e posteriormente alinhadas para comparação, análise e seleção das regiões alvos. O banco de SSU rRNA é mantido por Dr. Peter De Rijk, Jan Wuyts, Y. Van de Peer e R. de Wachter.

O critério para identificação e seleção de regiões no gene codificando SSU rRNA ao nível de gênero, foi baseado nas características de variabilidade e conservação do gene. A especificidade e a eficiência de amplificação foram os principais parâmetros empregados para o desenho dos oligonucleotídeos.

Visualmente foram identificadas as regiões que são específicas à espécie e assim desenhados os oligonucleotídeos internos a serem empregados na reação de “hemi-nested PCR”. A seleção das regiões foi realizada com a ajuda do programa Primer Select (DNASTAR, Lasergene) respeitando as características físico-químicas desejáveis à sua utilização em PCR: baixa complementariedade interna, estrutura secundária ausente ou restrita, baixa estabilidade da extremidade 3', tenha total homologia com todas as espécies de *Plasmodium* e ausência de formação de “hairpin” e dímeros.

Construção dos oligonucleotídios

Os oligonucleotídeos foram construídos com base na sequência primária do gene codificando o SSU rRNA de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, determinadas por McCutchan *et al.* (1988), Waters e McCutchan (1989), Goman *et al.* (1991) e Qari *et al.* (1996), respectivamente. Foram observadas regiões conservadas e não conservadas no gene, de forma a encontrar sequências diagnósticas não presentes no rRNA humano. Essas regiões do gene apresentam total homologia com o DNA de todas as espécies de plasmódio humano, representando nossos alvos para amplificação (FIG. 1).

Os oligonucleotídeos GJ1 e HR842 gêneros-específicos, utilizados na 1ª reação de amplificação, chamada de PCR Simples, foram descritos por Jaureguiberry *et al.* (1990) e Schindler *et al.* (2001), respectivamente. Durante o desenvolvimento do presente trabalho foram construídos os oligonucleotídeos PGFO1 e PGFO3, para serem empregados nas reações de “hemi-nested” PCR, visando a detecção do gênero *Plasmodium* (Montenegro, 2000). Os oligonucleotídeos foram sintetizados nos laboratórios da Life Technologies.

Nas reações de “hemi-nested” PCR foram utilizados dois conjuntos de oligonucleotídeos, PGFO1 x HR842 ou PGFO3 x HR842 (na 2ª reação), sendo cada par adicionado em diferentes reações, com o objetivo de testar o desempenho, para a seleção do par que iria participar dos experimentos subsequentes.

Tabela 1

NOME	SEQUÊNCIA	TIPO DE PCR	ESPECIFICIDADE	REFERÊNCIA
GJ1	5'-GGCTTAGTTACGATTAATAG - 3'	SIMPLES	Plasmodium sp.	Jaureguiberry, 1990
HR842	5'- CTAAACTTCCTTGTGTTAG - 3'	SIMPLES, HNPCR	Plasmodium sp.	Schindler, 2001
PGFO1	5'- TTTCTGGAGACGAACAACACT - 3'	HNPCR	Plasmodium sp.	Montenegro, 2000
PGFO3	5' - ACTAGTTTAAGACAAGAGT - 3'	HNPCR	Plasmodium sp.	Montenegro, 2000

Características dos oligonucleotídeos utilizados nos sistemas de PCR para detecção gênero-específica.

Sistemas baseados em PCR

Neste estudo, três métodos baseados em PCR foram utilizados:

- **PCR Simples** - foi utilizado na reação de amplificação apenas um par de oligonucleotídeo em 30 ciclos de reação;
- **“Hemi-Nested” PCR convencional (HNPCR)** - utilizou-se três oligonucleotídeos em duas reações sequenciais, em um total de 60 ciclos. Na primeira reação um fragmento de DNA foi amplificado usando um par de oligonucleotídeo externo e na segunda reação, o produto da primeira PCR serviu como molde para uma outra amplificação utilizando um oligonucleotídeo que anela em região interna (FIG. 2A). Para que os amplicons gerados na primeira PCR fossem introduzidos na segunda reação, foi necessário que os tubos da primeira fossem abertos.

- **“Hemi-Nested” PCR em um único tubo de reação (STHNPCR)** - apresenta a mesma base teórica da “hemi-nested” PCR convencional. Contudo, a concepção da abordagem é diferente, permitindo que as duas reações de amplificação fossem realizadas em um único tubo, não ocorrendo a abertura dos tubos antes da finalização das amplificações (FIG.2B).

PCR simples e “Hemi-Nested PCR” convencional (HNPCR)

O DNA genômico purificado foi submetido a amplificação em um termociclador automático (Perkin Elmer, modelo 4800). A mistura da 1ª reação de amplificação (chamada de PCR simples) consistiu de KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, pH 8,3, MgCl₂ 2,5mM, dNTP (200 µM 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 µl. 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. Na segunda reação (HNPCR), foi adicionado 1µl do produto da 1ª reação, nas mesmas concentrações e condições de amplificação da anterior, porém utilizando os oligonucleotídeos PGFO3 e HR842.

“Hemi-Nested PCR” em um único tubo de reação (STHNPCR)

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador automático (Touchdown™ Thermal Cycler da Hybaid Limited) como descrito em Abath, 2001. A primeira etapa de PCR consistiu em 15 ciclos (92⁰C, 30s; 58⁰C, 30s e 72⁰C, 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 azul de bromofenol(2 µg/ml) , contendo 40 pmoles de cada oligonucleotídeo e em seguida esta mistura foi fixada na superfície interna da tampa dos microtubos abertos, numa estufa a 37°C ou temperatura ambiente. 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.

Otimização da proporção dos oligonucleotídeos internos e externos utilizados na STHNPCR

Através de estudos preliminares, a proporção ótima de oligonucleotídeos internos e externos foi determinada experimentalmente, de forma que os oligonucleotídeos externos participassem em quantidades limitantes da primeira etapa de PCR, sendo praticamente exauridos. Desta forma, foi fixada uma concentração de 40 pmol para os internos, equivalendo ao dobro da utilizada na PCR simples, e para os externos foram feitas diluições seriadas de fator 10 variando de 40 a 0,004 pmol. Foram também utilizados dois controles, um contendo apenas 40 pmol de oligonucleotídeos internos e

outro 40 pmol de externos. O sistema foi testado com 0,5 ng e 1 pg de DNA de *P. falciparum*.

Amplificação do rDNA do hospedeiro vertebrado por STHNPCR

Para avaliação individual da qualidade da amostra de DNA, experimentos preliminares foram realizados utilizando os oligonucleotídeos HUF (Rubio *et al.*, 1999) e UNVRE16 (Abath *et al.*, 2001), que amplificam apenas rDNA de vertebrados, promovendo um amplicon de 689 pb (FIG. 2B). Esses oligonucleotídeos participaram dos primeiros 15 ciclos em todas as reações, a uma concentração de 2 pmols, juntamente com os oligonucleotídeos específicos para *Plasmodium sp.* (GJ1 e HR842) na 1ª reação de “hemi-nested” PCR em um único tubo.

Tabela 2

NOME	SEQUÊNCIA	TIPO DE PCR	ESPECIFICIDADE	REFERÊNCIA
HUF	5'-GAGCCGCCTGGATACCGC-3'	STHNPCR	Mamífero	Rubio, 1999
UNVRE16	5'-CCGGACATCTAAGGGCATCA -3'	STHNPCR	Vertebrado	Abath, 2001

Características dos oligonucleotídeos utilizados para estimar a presença de inibidores.

Avaliação da especificidade e sensibilidade dos sistemas baseados em PCR com DNA genômico purificado

Foi utilizado nos experimentos, DNA genômico purificado de *P. falciparum*, cultivado in vitro no Center of Diseases Control - CDC/Atlanta e das espécies *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (cedido por Dra. Mércia Arruda/CPqAM/FIOCRUZ)

A especificidade dos oligonucleotídeos construídos e a otimização das condições dos métodos de PCR foram confirmadas através de amplificações utilizando 5ng de DNA genômico das quatro espécies de plasmódio que parasitam o homem e DNA genômico humano, através da técnica de “hemi-nested” PCR. O objetivo foi verificar se experimentalmente os oligonucleotídeos apresentavam o desempenho esperado a partir de previsões teóricas, ou seja, anelamento específico e amplificação de fragmentos de tamanhos esperados com DNA de *Plasmodium* e ausência de amplificação em DNA humano.

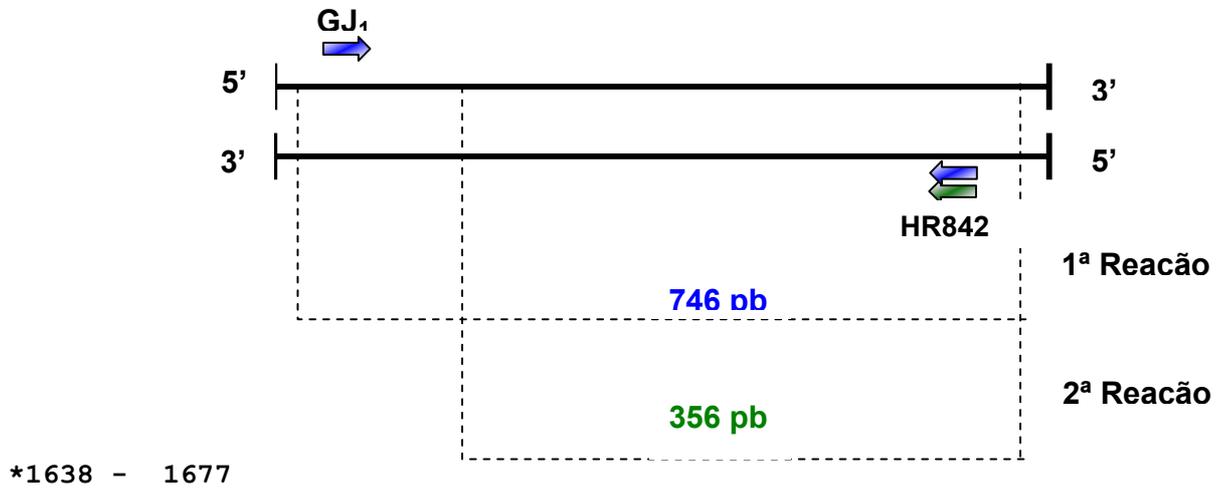
Para a determinação da sensibilidade uma curva de diluição foi construída a partir de quantidades conhecidas e variáveis de DNA genômico purificado de *P. falciparum*, com o objetivo de avaliar a quantidade mínima de DNA molde capaz de ser amplificada pelos sistemas de PCR simples, “hemi-nested” PCR convencional e “hemi-nested” PCR em um único tubo de reação. Foram feitas diluições de fator 10, seriadas, possibilitando que 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0,1 fg e 0,01 fg, fossem adicionados nas reações. O limite de detecção do DNA das espécies de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* não foi realizado, por teoricamente, já sabermos que o gênero *Plasmodium* contém o mesmo número de cópias (4 a 8) do gene que codifica o rRNA por genoma haplóide (Goman et al., 1991).

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 polaróide (MP4+ system).

H. sapiens (X03205) G.C...UC.G.CACCC...GA-...-GA....U.....

A) "Hemi-Nested" PCR Convencional



B) "Hemi-Nested" PCR em um único tubo de reação

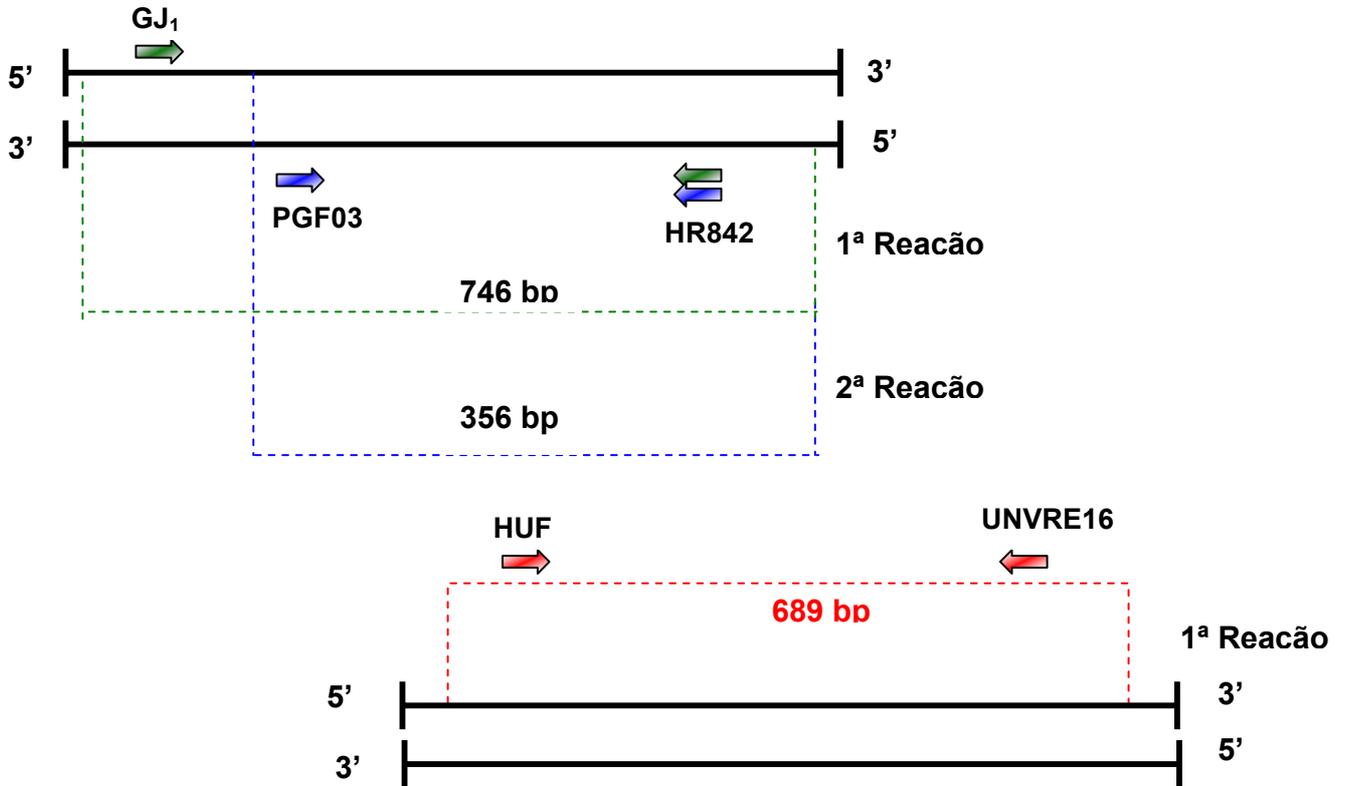


Figura 2 . Representação esquemática dos sistemas de amplificação baseados em PCR. **A)** Os oligonucleotídeos GJ1 e HR842, utilizados na 1ª reação, produziram um fragmento de 746 pb. A partir da introdução do PGFO3 com o seu par HR842 caracterizando a 2ª reação foi formado um amplicon de 356 pb. **B)**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

RESULTADOS

Identificação e avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos desenhados, PFO1 e PGFO3, na reação de HNPCR.

As sequências conservadas no gênero *Plasmodium sp.* foram selecionadas e usadas para o desenho dos oligonucleotídeos internos PGFO1 (5'-TTT CTG GAG ACG AAC AAC T-3') e PGFO3 (5'-ACT AGT TTA AGA CAA GAG T-3'), identificadas a partir do alinhamento do gene codificando o SSU rRNA de humano e das diversas espécies de *Plasmodium* que infectam o homem. Os oligonucleotídeos foram desenhados visando o desenvolvimento de uma reação de "hemi-nested" PCR específica para o gênero *Plasmodium sp.*, sendo capazes de amplificar parasitas em estágio sanguíneo assexuado. Os resultados mostraram a amplificação específica do DNA genômico referente às espécies que causam malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Na 1ª PCR (com os oligonucleotídeos GJ1 e HR842) um amplicon de 746 pb foi produzido. A 2ª PCR, utilizando o oligonucleotídeo ancorado HR842 e os oligonucleotídeos internos PGFO1 ou PGFO3, amplificaram produtos de 679 e 356 pb, respectivamente. Não foi observado amplificação de DNA genômico

humano. Portanto, ambos os oligonucleotídeos internos podem ser utilizados em “hemi-nested” PCR diagnóstica para o gênero *Plasmodium*. Contudo, para os experimentos subsequentes, selecionamos o PGFO3, que gerava o menor fragmento, como o oligonucleotídeo interno (Figura 3).

Limiar de detecção com DNA genômico purificado de *P. falciparum* por PCR simples e HNPCR

Utilizando DNA purificado de *P. falciparum*, foi realizada uma curva de diluição de fator 10 seriada, variando de: 10 ng a 0,01 fg. Os experimentos realizados com DNA genômico demonstraram que na PCR simples utilizando os oligonucleotídeos GJ1 e HR842, a quantidade mínima detectada foi de 10 pg (Figura 4A) e na “hemi-nested” PCR convencional (em duas etapas) foi de 0,01 pg de DNA (Figura 4B).

Avaliação da proporção dos oligonucleotídeos internos e externos utilizados na STHNPCR

Foram realizados experimentos para otimizar a proporção de oligonucleotídeos internos e externos, de forma que a produção do produto diagnóstico de 356 pb fosse alcançado de maneira mais eficiente. Quando 0,5 ng de DNA genômico foi utilizado, o resultado obtido foi de difícil interpretação (FIG. 5A). Sendo assim, o experimento foi repetido com uma quantidade menor de DNA (1 pg) (Figura 5B). Com isso, a proporção de 4 pmols de oligonucleotídeos externos para 40 pmoles

de internos (1:10) foi a que produziu uma banda diagnóstica forte, na ausência aparente do produto resultante de oligonucleotídeos externos. Essas quantidades foram então padronizadas para os experimentos subsequentes.

Limiar de detecção com DNA genômico purificado de *P. falciparum* por STHNPCR

Foi decidido testar um sistema que vinha sendo desenvolvido paralelamente para o diagnóstico de Schistosoma (anexo). Demonstramos experimentalmente que a abordagem desenvolvida, quando aplicada ao diagnóstico de *Plasmodium* era específica para detecção de DNA dos parasitas, não amplificando DNA dos hospedeiros, como previsto teoricamente. O limite de detecção de DNA foi de cerca de 0,1 pg para detecção de *Plasmodium* (Figura 6A). Como mostrado na Figura 6B, é possível através da introdução de oligonucleotídeos com especificidade pelo DNA do hospedeiro, testar a qualidade da amostra individual e diminuir as possibilidades de resultados falsos-negativos.

Relação entre as sensibilidades obtidas através dos sistemas baseados em PCR

As sensibilidades da PCR simples e STHNPCR foram 1000 e 10 vezes menores, respectivamente, quando comparou-se com a “hemi-nested” PCR convencional.

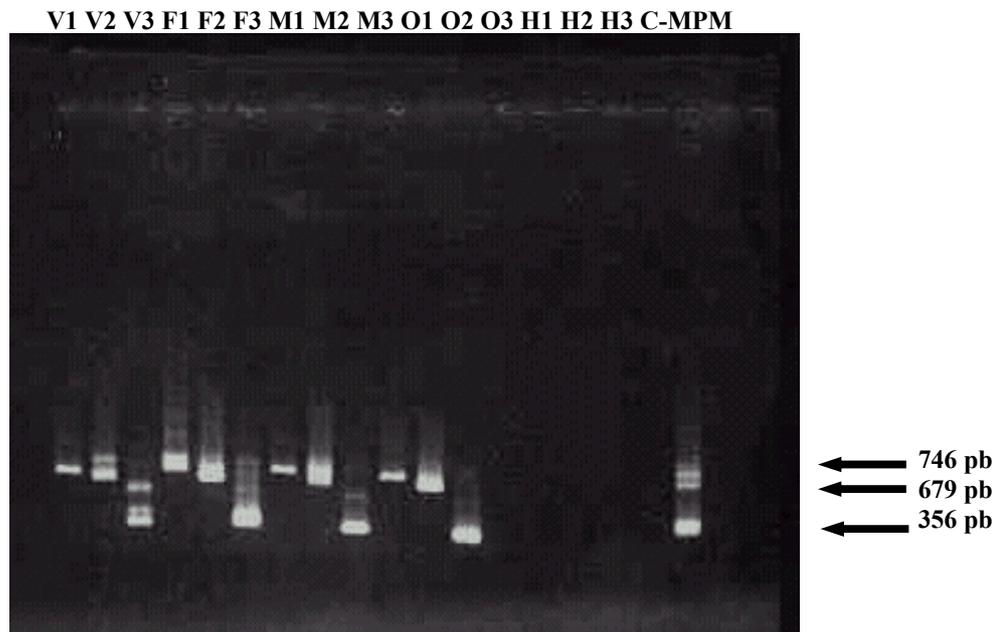


Figura 3 - Análise em gel de agarose dos amplicons produzidos na 1ª PCR, com os oligonucleotídeos GJ1 e HR842 (V1, F1, M1 e O1), na 2ª PCR, com os oligonucleotídeos PGFO1 e HR842 (V2, F2, M2 e O2) e na 2ª PCR com os oligonucleotídeos PGFO3 e HR842 (V3, F3, M3 e O3). V, *P. vivax*; F, *P. falciparum*; M, *P. malariae*; O, *P. ovale*; H, *Homo sapiens*. C-, controle negativo; M.P.M., Marcador de peso molecular (bandas referentes a 746, 679 e 356 pb). Os produtos de amplificação estão indicados por setas.

Fig. 4A. PCR Simples

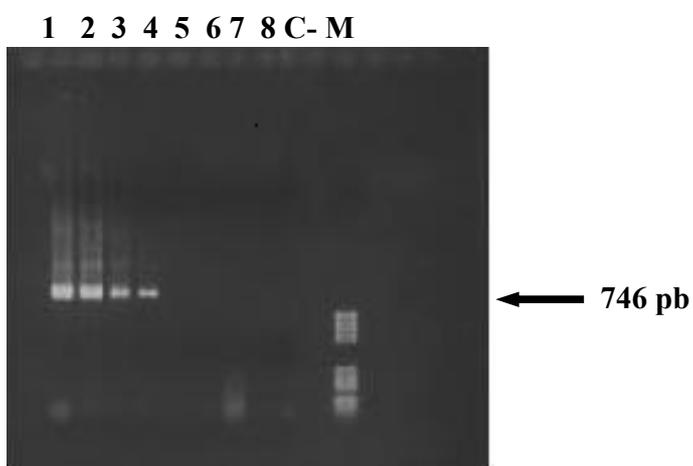


Fig. 4B. HNPCR

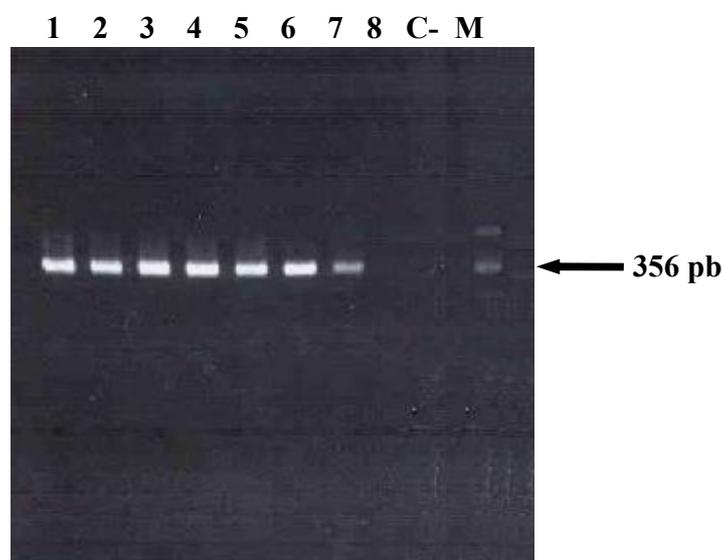


Figura 4. Análise em gel de agarose mostrando o limite de detecção da PCR simples (Fig. 4A) e da “hemi-nested” PCR convencional (Fig. 4B) utilizando DNA de *P. falciparum*. As faixas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondem a 10ng, 1ng, 100pg, 10 pg, 1pg, 100fg, 10fg e 1fg, respectivamente. C- , controle negativo; M, Marcador de peso molecular. Os produtos de amplificação dos oligonucleotídeos GJ1 e HR842 (746 pb), PGFO3 e HR842 (356 pb), estão indicados por setas.

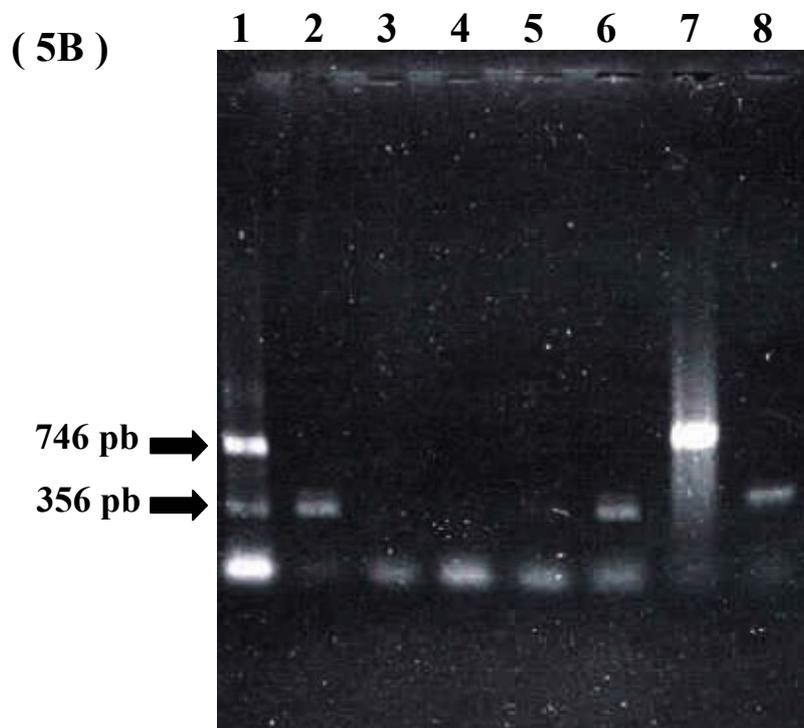
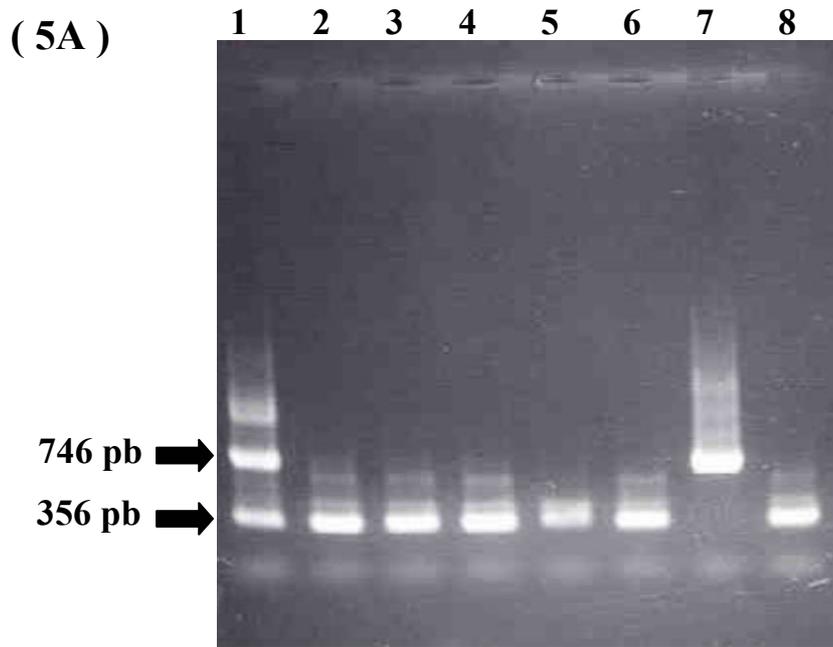


Figura 5. Experimento realizado com 0,5 ng (A) e 1 pg (B) de DNA de *P. falciparum*, no sistema de STHNPCR. Os produtos de amplificação de 746 pb (1ª reação) e 356 pb (2ª reação) estão indicados por seta. As faixas de 1 a 7 correspondem a 40/40 pmoles; 40/4 pmoles; 40/0,4 pmoles; 40/0,04 pmoles; 40/0,004 pmoles; 40/0 pmoles; 0/40 pmoles de oligonucleotídeos internos/externos. Faixa 8, controle positivo da 2ª reação.

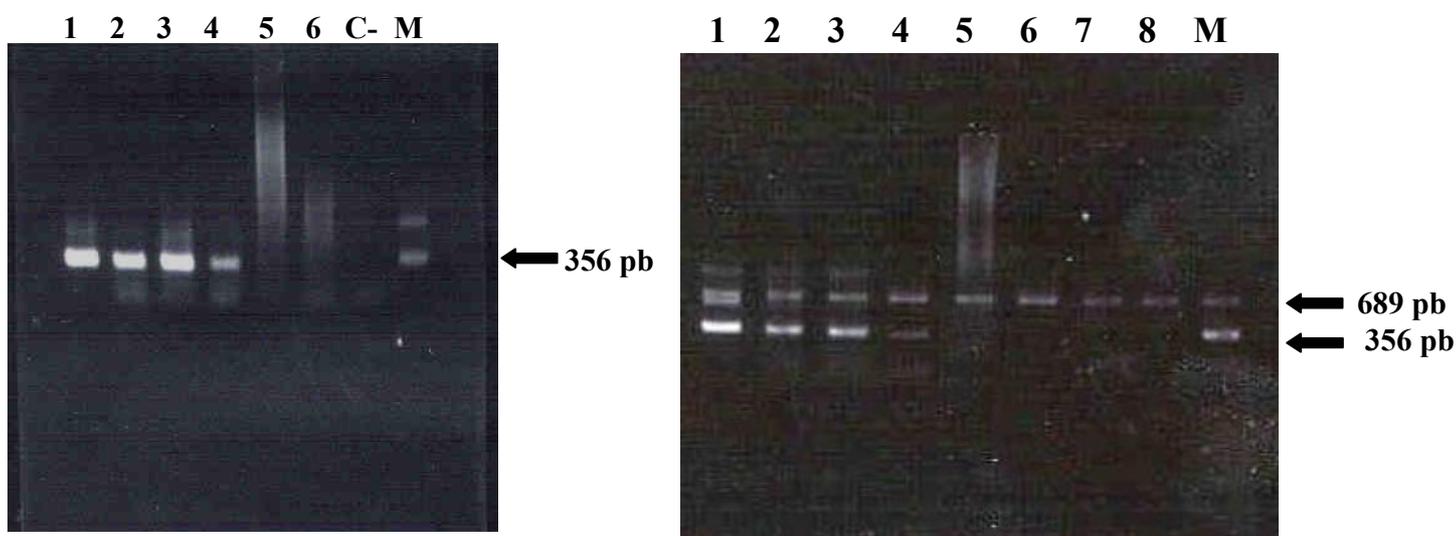


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose, representando a quantidade mínima de DNA de *P. falciparum* amplificada pela STHNPCR (FIG. 6A) e com os oligonucleotídeos universais de forma a avaliar a qualidade da amostra (FIG. 6B). As faixas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 correspondem a 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0,1 fg e 0,01 fg de DNA, respectivamente. C-, controle negativo; M, Marcador de peso molecular (bandas referentes a 689 e 356 pb). Os produtos de amplificação dos oligonucleotídeos PGFO3 x HR842 (356 pb) e UNVRE16 x HUF (689 pb), estão indicados por setas.

DISCUSSÃO

A transmissão da malária através de transfusão sanguínea constitui um importante fator de risco em regiões endêmicas brasileiras, embora sua real incidência seja desconhecida. Este evento pode estar contribuindo para a disseminação da doença em áreas com transmissão ativa e interferindo no seu controle sobretudo pela dificuldade em diagnosticar portadores de baixa parasitemia (Hang *et al.*, 1995). A transmissão transfusional ocorre normalmente com a utilização de sangue total ou concentrado de hemácias contaminadas, podendo ainda ocorrer com menor frequência através de concentrado de plaquetas, leucócitos, crioprecipitados ou plasmas frescos. Os principais mecanismos envolvidos nesse tipo de transmissão são: a infecção malárica sem sinais clínicos com hipoparasitemia nos doadores e a viabilidade do *Plasmodium* em amostras de sangue estocadas (Sáez-Alquézar *et al.*, 1998). As Normas Técnicas em Hemoterapia nas áreas endêmicas, apenas recomendam a realização de exame parasitológico/hemoscópico para malária, em regiões endêmicas com transmissão ativa e exames sorológicos em regiões endêmicas sem transmissão ativa, porém vulneráveis, propiciando condutas não uniformes em serviços de hemoterapia (Kiesslich *et al.*, 1997).

Dessa forma, um dos elementos fundamentais no controle da malária é dispor de um diagnóstico precoce e tratamento eficaz do maior número possível de portadores do parasita da malária, com a finalidade de reduzir a fonte de infecção para os mosquitos e na aplicação de medidas antivetoriais eficientes (WHO, 1993). O diagnóstico de portadores de baixa parasitemia, que apesar de frequentemente não apresentarem quadro clínico sugestivo, são capazes de transmitir a doença para o inseto vetor e sobretudo através de transfusão sanguínea em áreas endêmicas, pode contribuir para a diminuição dos índices de malária pós-transfusional e de morbimortalidade (Kiesslich *et al.*, 1997).

Além da dificuldade em diagnosticar os casos hipoparasitêmicos, outro importante fator que contribui para a propagação da doença é a dificuldade em diagnosticar infecções mistas através de exames parasitológicos (Snounou *et al* 1993a; Rubio *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999; Laoboonchai *et al.*, 2001). Em geral, as infecções mistas consistem em combinações de 2 ou mais das 4 espécies de *Plasmodium* que infectam humanos, em países endêmicos. As 4 espécies, causadoras da malária em humanos, diferem grandemente nas manifestações clínicas, nas respostas às drogas antimaláricas, no seu potencial de transmissão e também nas respostas imunológicas do hospedeiro humano. A interação entre diferentes infecções parasitárias em um mesmo indivíduo poderá resultar em mudanças significativas no curso da doença e no seu potencial patogênico (Snounou *et al*, 1993b).

Novos métodos diagnósticos mais sensíveis são necessários, especialmente por causa do aumento na prevalência dos plasmódios *falciparum* e *vivax* resistentes às drogas (Tirasophon *et al*, 1994). Os programas de controle

requerem métodos diagnósticos sensíveis e precisos para a identificação de focos de transmissão, desse modo permitindo que os recursos limitados disponíveis para o controle da malária possam ser aplicadas adequadamente.

Mesmo assim, a microscopia é o método escolhido como exame de rotina no diagnóstico de malária em regiões endêmicas do Brasil, principalmente por causa do seu baixo custo e rapidez. Contudo, a correta identificação das espécies de *Plasmodium* e o nível de detecção microscópica dependem de vários fatores: a experiência do microscopista, o adequado procedimento de coloração das lâminas, uma apropriada manutenção dos equipamentos e o tempo para a leitura de cada lâmina (Singh *et al*, 1999; Schindler *et al.*, 2001).

A confirmação laboratorial de infecções maláricas requer a disponibilidade de um teste rápido, sensível e específico. A alta positividade dos testes sorológicos para detecção de anticorpos, inviabiliza sua utilização como instrumento de triagem em áreas endêmicas, visto que o índice de exclusão pode exceder 80%, de acordo com os resultados obtidos no estudo de Sáez-Alquézar *et al.* (1998). Desse modo, muitas pesquisas laboratoriais concentraram esforços no desenvolvimento de métodos alternativos para o diagnóstico de malária. Entre eles estão o teste do Quantitative Buffy Coat – QBC (Rickman *et al.*, 1989), a imunofluorescência indireta, o radioimunoensaio, o ELISA (Ávila *et al*, 1996), os testes imunocromatográficos (ParaSight-F, ICT Pf/Pv e OptiMAL) (Cooke *et al.*, 1999; Tjitra *et al.*, 2001) e as sondas de ácidos nucléicos (Barker, 1990). Porém, a maioria destes testes têm apresentado limitada sensibilidade quando aplicados em amostras coletadas de zonas endêmicas.

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi introduzida para amplificar sequências específicas de DNA, sendo uma poderosa ferramenta no diagnóstico da malária (Jaureguiberry *et al.*, 1990; Snounou *et al.*, 1993a). Teoricamente é capaz de detectar um único *P. falciparum* em 20 µl de sangue humano (Barker Jr *et al.*, 1992). Muitos estudos têm demonstrado uma maior sensibilidade e especificidade em relação aos exames microscópicos (Ciceron *et al.*, 1999; Rubio *et al.*, 1999; Schindler *et al.*, 2001).

Diversos genes de *Plasmodium* têm sido amplificados pela técnica de PCR, dentre eles genes codificando antígenos de superfície (Viriyakosol *et al.*, 1994), a enzima sintetase timidilato-redutase deidrofolato - DHFR-TS (Arai *et al.*, 1994), o gene p126 (Zalis *et al.*, 1996) e o gene codificando SSU rRNA (Schindler *et al.*, 2001). Os resultados publicados sugerem que o diagnóstico por PCR sejam mais promissores que a hibridização simples ou os métodos convencionais.

O RNA ribossomal, particularmente a pequena subunidade (SSU) rRNA, tem sido proposto 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 & 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 correta identificação de áreas da molécula, da estabilidade do alvo e 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, 1986). Dessa forma, justifica-se a utilização da “Nested” PCR como uma maneira de aumentar a sensibilidade de detecção.

As aplicações da técnica de PCR no diagnóstico médico buscam condições de reações altamente específicas e eficientes, em vista da possibilidade da obtenção de resultados diagnósticos falsos-positivos, quando se trabalha com ciclos de amplificação muito extensos.

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. Dessa forma, no presente estudo, novos oligonucleotídeos foram concebidos com base na sequência primária do gene codificando o SSU rRNA, para detecção gênero-específica de infecções maláricas. Os oligonucleotídeos foram construídos para serem empregados em sistemas diagnósticos sensíveis e específicos baseados na metodologia da “nested” PCR. Duas abordagens de “nested” PCR foram avaliadas: HNPCR e STHNPCR, ambas mais sensíveis que a PCR simples.

Apesar de já termos demonstrado a validade de se utilizar HNPCR no diagnóstico da malária, aqui substituímos um dos oligonucleotídeos internos (GJ2) utilizado anteriormente por Schindler *et al.* (2001), pois o mesmo não apresentava total complementariedade com todas as sequências de SSU rRNA de *Plasmodium* disponíveis nos bancos de DNA. Isso foi feito no sentido de assegurar que de fato

o sistema fosse capaz de detectar DNA de todas espécies. Avaliamos a STHNPCR, desenvolvida em nosso laboratório, por tratar-se de uma metodologia baseada na “nested” PCR em um único tubo, e conseqüentemente apresentar menor risco de contaminação cruzada.

A partir dos experimentos realizados com o objetivo de testar a especificidade dos novos oligonucleotídeos construídos (PGFO1 e PGFO3), observou-se a amplificação específica de DNA genômico referente às espécies que causam malária humana e a não amplificação de DNA genômico humano. Apesar do ótimo desempenho de ambos, o PGFO1 não foi selecionado para participar dos sistemas de “hemi-nested” PCR, em combinação com o oligonucleotídeo HR842, devido ao tamanho do fragmento produzido (679 pb) ser bastante próximo do produzido na primeira reação (746 pb), com os oligonucleotídeos GJ1 e HR842, dificultando a interpretação do teste.

Através de ensaios realizados com DNA genômico para a determinação da sensibilidade da PCR simples, HNPCR e STHNPCR, foi possível detectar a quantidade mínima de 10 pg, 0,01 pg e 0,1 pg de DNA, respectivamente. O DNA total contido em um merozoíto corresponde a 0,02 pg, segundo Oquendo *et al.*

(1986), portanto a HNPCR é teoricamente capaz de detectar menos que um parasita. A técnica de HNPCR mostrou-se 1000 vezes mais sensível que a PCR simples, enquanto que a STHNPCR foi 100 vezes mais sensível que a PCR simples. De fato, as vantagens, em termos de sensibilidade, já haviam sido notadas por Snounou *et al.* (1993a,b) e Singh *et al.* (1999).

Em contraste com a PCR simples, foram observadas na “hemi-nested” PCR, bandas de intensidade constante no gel de agarose, independentemente da

quantidade de DNA alvo presente. Este efeito “tudo-ou-nada” de detecção foi também observado por Snounou et al. (1993b) para detecção de *Plasmodium sp.* por “nested” PCR.

O resultado obtido, utilizando-se a técnica de HNPCR convencional, demonstrou um aumento de 10X na sensibilidade em relação a STHNPCR. No entanto, a STHNPCR apresenta vantagens compensatórias, uma vez 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 e permanecendo fechado até a finalização da amplificação. Além disso, consome menos tempo e reagentes no procedimento do método. 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).

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 abertos e manipulados 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 esses métodos utilizam conjuntos de oligonucleotídeos com diferentes temperaturas de anelamento, o qual restringe a sua utilização, sendo possível na presença de muitas sequências alternativas para o anelamento apropriado. Dessa forma houve

a necessidade de se desenvolver um método baseado em “nested” PCR onde as duas reações ocorressem em um único tubo, com separação física dos conjuntos de oligonucleotídeos externos e internos.

Vários investigadores também mostraram interesse em utilizar o SSU rRNA para o diagnóstico por “nested” PCR, selecionando, contudo, alvos de amplificação diferentes. Snounou *et al.* (1993b), propuseram um sistema espécie-específico para a malária humana, sendo possível a detecção de 10 parasitas na amostra, ou seja, uma quantidade equivalente 0,2 pg de DNA. Por esse método, a detecção de cada espécie se dava pela realização de várias amplificações, o que tornava o diagnóstico dispendioso. A tentativa de incluir todos os conjuntos de oligonucleotídeos espécie-específicos, em uma única reação (chamada de PCR multiplex) resultou numa baixa de sensibilidade e a capacidade de detectar infecções mistas foi substancialmente reduzida (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999).

Mesmo considerando que os resultados obtidos no presente estudo apontam para uma alta sensibilidade de detecção de DNA alvo, é pertinente lembrar que o procedimento de preparação das amostras para PCR é fator crucial para o desempenho da reação, sobretudo pela presença de inibidores. Nessa direção, vários pesquisadores enfatizam que distintos métodos de extração de DNA, ocasionam diferentes desempenhos dos sistemas de PCR (Cox-Singh *et al.*, 1997). A presença de inibidores de PCR é inconveniente, e muitas vezes dificulta a interpretação dos resultados. Assim, para cada situação de diagnóstico a relação custo/benefício da técnica deve ser avaliada. Sendo assim, aprimoramos o método de STHNPCR para que a qualidade da amostra também pudesse ser

avaliada. Seguindo uma estratégia semelhante a de Rubio *et al.* (1999), introduzimos oligonucleotídeos que permitiram a amplificação de rDNA de hospedeiros vertebrados, na presença ou ausência de DNA do parasita.

O desenvolvimento de métodos mais simples, sensíveis e específicos para o diagnóstico da malária, além de contribuir para os Programas de Controle local, ajudará a diminuir a frequência de exames falsos negativos, sobretudo em indivíduos com baixa parasitemia. Podem ainda serem utilizados na triagem de doadores de sangue, no monitoramento da resposta clínica e terapêutica em pacientes sintomáticos e na identificação de portadores assintomáticos para a interrupção da cadeia de transmissão epidemiológica, principalmente em regiões consideradas de maior risco para a transmissão da malária no Brasil.

CONCLUSÕES

- 1.** Os novos oligonucleotídeos PGFO1 e PGFO3 podem ser utilizados em PCR para detecção de espécies plasmodiais que infectam seres humanos.
- 2.** O limite de detecção da hemi-Nested PCR e da hemi-Nested PCR em um único tubo foi 10 fg e 100 fg respectivamente, sendo teoricamente capazes de detectar menos que um parasita.
- 3.** Apesar da hemi-Nested PCR em único tubo ter sido menos sensível do que a hemi-Nested PCR convencional, apresenta a vantagem de oferecer menos risco de contaminação.
- 4.** Através da inclusão de oligonucleotídeos que amplificam apenas DNA do hospedeiro, é possível avaliar a qualidade da amostra, diminuindo potencialmente a frequência de resultados falsos negativos.
- 5.** Para a validação dos sistemas desenvolvidos, precisam ser realizados estudos com amostras clínicas de indivíduos de áreas endêmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G.C., MELO, F.L., WERKHAUSER, R.P. Método, kit e iniciadores para a identificação de sequências específicas de nucleotídeos através da reação em cadeia da polimerase tipo nested em um único tubo de reação. Pedido de patente depositado junto a Repartição de Patente do Brasil em 29 de novembro de 2001 sob o nº PI 015740-5.

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 JR, R.H. DNA probe diagnosis of parasitic infections. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.70, p.494-499, 1990.

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.

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.

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 for 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.

COX-SINGH, J., MAHAYET, S., ABDULLAH, M.S., SINGH, B. Increased sensitivity of malaria detection by nested polymerase chain reaction using

sampling and DNA extraction. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.27, n.12, p.1575-1577, 1997.

GOMAN, M., MONS, B., SCAIFE, J.G. The complete sequence of a *Plasmodium malariae* SSU rRNA gene and its comparison to other plasmodial SSU rRNA genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.45, p. 281-288, 1991.

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.

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.

KIESSLICH, D., TORRES, K.L., SILVA, R.C., FRAIJI, 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.

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., McCUTCHAN, T.F. Plasmodium: genus-conserved primers for identification and quantitation. **Experimental Parasitology**, New York, v.81, p.182-190, 1995.

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

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.

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.

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 its 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.

OQUENDO, P., GOMAN, M., MACKAY, M., LANGSKY, G., WALLIKER, D., SCAITE, J. Characterization of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.18, p.89-101, 1986.

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.

QARI, S.H., SHI, Y.P., PIENIAZEK, N.J., COLLINS, W.E. & LAL, A.A. Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequence: monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. **Molecular Phylogenetic Evolution**, Orlando, v.6, n.1, p.157-165, 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.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A.; VAL RAMOS, A. M.; DI SANTI S. M.; BRANQUINHO, M. S.; KIRCHGATTER, K.; CORDEIRO, I. A. C.; MURTA, M.; SARAIVA, J. C. P.; OLIVEIRA, S. G.; BOCHETTI, M. G. G.; PIROLLA, J. A.; GUERZONI, D.; CHAMONE, D. A. F. Controle da malária transfusional em região endêmica e não endêmica do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.31, p.27-34, jan-fev, 1998.

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.

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

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.

VIRIYAKOSOL, S., SIRIPON, N., ZHU, X.P., JARRA, W., SEUGORN, A., BROWN, K.N., SNOUNOU, G. *Plasmodium falciparum*: selective growth of subpopulations from field samples following in vitro culture, as detected by the polymerase chain reaction. **Experimental Parasitology**, San Diego, v.79, p.517-525, 1994.

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. Global malaria control. Malaria Unit. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v.71, n.3/4, p.281-284, 1993.

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.

ZALIS, M.G., FERREIRA-DA-CRUZ, M.F., BALTHAZAR-GUEDES, H.C., DRUILHE, P., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria diagnosis: standardization of a

polymerasechain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. **Parasitology Research**, Berlin, v.82, p.612-616, 1996

4 . ANEXO

DEVELOPMENT OF A SIMPLE SINGLE TUBE NESTED PCR: APPLICATIONS IN THE DETECTION OF INFECTIOUS PATHOGENS

Abath, F.G.C.*, Melo, F.L., Werkhauser, R.P., Montenegro, L., Montenegro, R. & Schindler, H.S.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães–FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil

*To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, Brazil. Tel: +55 81 33012558; Fax: +55 81 3453 2449; e-mail: fabath@cpqam.fiocruz.br

ABSTRACT

In order to achieve more sensitive and specific results, we developed a novel single tube nested PCR (STNPCR) suitable for research as well as clinical analyses. The approach was validated by detecting DNA from *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*, parasites causing endemic human diseases. Primers targeting the gene encoding the rRNA SSU were designed. The PCR system comprised 60 cycles (92°C for 30s, 55°C for 30s, and 72°C for 1 min) in which limiting concentrations of external primers (0.1 pmol/μl) participated of the PCR without competition of internal primers during the first 15 cycles of the reaction, and 1 pmol/μl of internal primers (immobilized onto the internal face of the microtube cap) were introduced into the PCR system at cycle 16 by inverting the microtube. The concentrations of the other components of the reaction were the same used in standard PCR reactions. The NPPCR showed a detection limit of 10 fg of *S. mansoni* genomic DNA, being more sensitive than conventional PCR (1 pmol/μl primers, 30 cycles). Although the proposed assay was less sensitive than the conventional 2-step nested PCR (detection limit of 0.1 fg/ μl), it is simpler, more convenient, and the risk of cross-contamination is much lower, as the amplifications are performed in a single tube that remains closed throughout the entire process. We envisage applications such as detection of parasite DNA in biological samples of vertebrate and snail hosts, and in cercarial contaminated water collections. The system described here (patent pending) has also been tested to detect *Plasmodium* DNA, and may be useful to detect with high sensitivity and specificity other target DNA for which nested primers are available.

INTRODUCTION

The detection of specific DNA sequences by PCR has proved extremely valuable for the analysis of genetic disorders and the diagnosis of a variety of infectious disease pathogens (1-3). However, not unusually high sensitivity and specificity is required for diagnostic purposes. In these situations, nested-PCR has been devised to improve the PCR assay (1). Nested-PCR is a two-step procedure in which the products of a first PCR using outer primers are reamplified using a second set of inner primers located within the previously amplified sequence. Although nested PCR is more sensitive than conventional PCR, an inherent drawback is the need to open tubes after the first round of amplification to transfer products to a second PCR amplification reaction that utilizes a different primer pair or to introduce new reagents and/or primers (4). This process increases dramatically the risk of cross-contamination of negative samples with amplicons derived from positive specimens during the first round of amplification. Aiming at minimizing the risk of cross-contamination, some proposals for single tube nested PCR (STNPCR) were devised (5-11). Nevertheless, all of them are operationally complex or require special designing of primers (12,13). Thus, the present paper describes the design and development of a novel STNPCR in which the internal primers are separated from the components of the first round of amplification by immobilization onto the inside of the microtube cap (patent pending). In addition, comparative data on the relative levels of sensitivity of the conventional PCR and nested-PCR are presented. As diagnosis is one of the most common applications

of SNTPCR, we validated the approach, specifically amplifying DNA from *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium falciparum*, parasites causing endemic human diseases.

MATERIALS AND METHODS

Primers. Sequences of SSU rRNA respecting *Schistosoma* sp, *Plasmodium* sp, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, and *Biomphalaria glabrata* were aligned with tools available at <http://rrna.uia.ac.be>, maintained by the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the University of Antwerp, Belgium. This allowed the selection of possible targets for PCR amplification. Primers were designed using the software DNASTAR (Lasergene). The primers Schfo11 (5'-gttacgatcaggaccagtgt-3'), Schfo17 (5'-gtgctgggtgggtgacgagttc-3') and Schre19 (5'-gttacgatcaggaccagtgt-3'), specific for *Schistosoma mansoni* were constructed. In addition, the universal primers Unvre16 (5'-ccggacatctaaggcatca-3') and Unvfo4 (5'-cgactcaacacgggaaaactca-3') were also designed. The primers used for the amplification of *Plasmodium* have been described previously (1).

DNA extraction. DNA was purified for PCR using the GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech), following the instructions of the supplier. The purified DNA was serially diluted to assess the detection limit of the PCR assays.

Conventional PCR. A 50 μ l PCR reaction mixture was prepared containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin, 1.5m M MgCl, 0.2 mM of each dNTP, 50 pmoles of each primer (Schfo17 and Schre19), 2.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), and 2 μ l of the DNA solution was added into the PCR mixture. Amplifications were carried out in 0.5 ml PCR tubes by using a Touch Down Hybaid thermocycler. Programs were run for 30 cycles, consisting of annealing at 55°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and denaturation at 92°C for 30 s. The tubes were heated at 92 °C for 3 min before cycling. Several negative and positive controls were included each time PCR was undertaken to detect false results due to contamination or variation in sensitivity.

Two-step nested PCR. This was performed using the same reaction mixture and cycling conditions as reported for conventional PCR. Fifty pmols of outer primers (Schfo11 and Unvre16) were used in the first PCR, and 50 pmols of internal primers (Schfo17 and Schore19) were used in the second PCR. Two μ l of the products of the first PCR were used as templates for the second PCR.

Single-tube nested PCR (STNPCR). The reaction was optimized for concentrations of deoxynucleosides triphosphates, Mg²⁺, outer and inner primers. For the optimization of primer-pair-studies, STNPCR assays were set up using 1 ng and 0.1 ng of purified *S. mansoni* DNA as template, and various primer-pairs ratios. The relative amounts of long, short and intermediate amplification products were gauged by agarose gel electrophoresis. Ten μ l containing 50 pmols of inner primers (Schfo17 and Schre19) with traces of bromophenol blue were previously immobilized onto the inside of the microtube cap by incubating the tubes at 37 °C

until the solution had dried. The first amplification round consisted of 15 cycles (92°C for 30 s, 50°C for 30s and e 72°C for 1 min), whereas the second round of amplification consisted of 45 cycles (the annealing temperature was increased to 55°C). The first amplification round of the STNPCR was performed in a 50- μ l volume containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin, 1.5m M MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 5 pmoles of outer primers (Schfo11 and Unvre16), 2.5 U of Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech), and 2 μ l of the DNA solution was added into the PCR mixture. Thirty μ l of mineral oil were added to overlay the reaction mixture. After the first round PCR, the thermocycler was paused at 92°C, and the closed tubes were inverted several times to dissolve the inner primers inside the cap, briefly centrifuged, and returned to the machine for the second round of amplification.

PCR product analysis. Products (10 μ l) were separated by electrophoresis in 1 % agarose gels, and ethidium bromide stained gels were visualized and photographed over an ultraviolet light using the MP4+ Polaroid System.

RESULTS

Optimization of primer-pair ratios. Experiments were carried out to optimize the primer-pair ratio so that the best yield of the desired 721 bp short product could be achieved (Figure.1). When 1 ng was used as template, the strongest band appeared with the outer primer set/internal primer set ratio (OP/IP) of 1:10, whereas the OP/IP 1:100 produced the most intense band when 0.1 ng of DNA template was used, suggesting that the optimal ratio would be in this range. Thus, we decided to use the ratio of 1:10 (5pmols: 50 pmols) in all subsequent experiments.

Specificity of the STNPCR. Figure 2 showed that the novel STNPCR developed was specific for the detection of *Schistosoma* DNA, not amplifying, as expected, DNA from vertebrate or invertebrate hosts of the parasite.

Determination of the detection limit of the STNPCR. Ten fold dilutions of purified DNA corresponding to 1ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 1 pg, 0.1 pg, 0.01 pg, 1 fg and 0.01 fg were amplified. The detection limit was 1 fg of *Schistosoma mansoni* genomic DNA (Figure 3). This detection limit is lower than that obtained by simple PCR (1 pg), indicating that the STNPCR is 1000 times more sensitive. In comparison to conventional two-step nested PCR (data not shown,), STNPCR was just 10 times less sensitive. On the other hand, the risks of cross-contamination are much lower.

The STNPCR was also tested for the detection of *Plasmodium* genomic DNA, with similar results (data not shown), showing that the system can be easily adapted for other targets provided nested pairs of primers are available.

DISCUSSION

Conventional PCR is usually inefficient in the detection of rare target sequences such as from low-level infectious organisms, or a few cancer cells among a large population of normal cells. Nested PCR has been devised to improve the sensitivity of the assay. Several studies have described the use of two-step nested PCR in the detection of infectious organisms (1-3). The advantages of nested PCR systems include increased sensitivity and specificity; and dilution of inhibitory compounds that could be present in clinical samples. On the other hand, the major disadvantage is the increased probability of carry-over contamination of negative specimens with amplicons derived from positive amplifications, because the reaction tubes containing high concentrations of the first amplification products must be opened and manipulated to set up the second amplification (4).

In order to avoid this additional risk a number of methods have been developed to perform the first and second rounds of PCR in a single tube, which does not have to be opened until the amplicon analysis stage when the amplification reaction itself is complete. One possible advantage of conventional two-step nested PCR over STNPCR is the dilution of potential Taq polymerase inhibitors during transfer of amplification products from the first step of amplification to new reactions in the second stage of amplification (4). To achieve maximal efficiency in STNPCR, inhibitors must be removed by an appropriate sample preparation procedure. However, the advantage associated with significantly decreasing the possibility of carry-over contamination outweighs this disadvantage. Most of the methods devised to perform STNPCR are based on the use of pairs of primers with different G+C contents, resulting in primers set with vastly different annealing temperatures (4). (5-7,9-11) Nonetheless, this approach restricts the selection of primers pairs, as pairs of primers with significantly different annealing temperatures are required. This is clearly impossible for the amplification of DNA stretches in which options for appropriate sequence are limited. Another approach involves the physical separation of the components for the first and second round of amplification, by means of a thin layer of mineral oil (14). Although conceptually simple, this is not efficient, as the components of the second round PCR usually cannot be kept properly separated during the time necessary to finish the first amplification process. Other systems are based on the sequestration of reaction mixture (including thermostable DNA polymerase) embedded into agarose resin inside a central chamber of the reaction tube screw-top (15). Although creative, this method is cumbersome, requiring the use of specially designed reaction tubes, and upper cooling plates to protect the gel matrix. In addition the presence of agarose, extraneous to the PCR reaction mixture, may interfere with the PCR. The same comments can be applied to methods using trehalose matrix instead of agarose (16).

To overcome the shortcomings of the approaches for STNPCR currently available, we developed a very simple, reproducible and consistent system that allows for single tube nested PCR. We have noticed that only the internal oligonucleotides needed to be sequestered, and this could be efficiently done by a

simple procedure in which the internal primers were immobilized by drying onto the internal face of the microtube cap, and easily dissolved into the reaction mixture to participate in the second round of amplification by inverting the PCR tube. In addition, conveniently, standard PCR reaction and cycling conditions can be used in the STNPCR devised. The first round of amplification includes limiting concentrations of primers, so that they are exhausted at the completion of the first PCR. Since the concentration of the outer primers is only 0.1 pmol/ul, the larger product synthesized by them does not contribute significantly to the overall yield of amplicons, the larger product serves only to boost the second stage amplification reaction. When the first PCR was running, the primers for the second PCR were not available to anneal to the template, and when the second PCR was running, the outer primers were not practically available, because they were almost completely used up during the first amplification.

Although we have only shown data respecting detection of *Schistosoma* DNA, we have also adapted the STNPCR for the detection of *Plasmodium* DNA. STNPCR can be used in all situations in which conventional nested-PCR is indicated. In schistosomiasis, several applications for PCR can be envisaged: detection of parasites in infected water collections, as well as diagnosis of infection in vertebrate and invertebrate hosts. Indeed, a few approaches based on the detection of *Schistosoma* DNA were published for the detection of the parasite in snails (17,18), and cercaria contaminated water collections (19). In malaria, PCR based diagnosis of malaria has been widely performed to detect infection in humans and vectors, as well as to evaluate cure after chemotherapy (1,20). The diagnostic system proposed herein can be easily adapted to be used for PCR detection of other diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by FIOCRUZ internal funds.

REFERENCES

1. Schindler,H.C., Montenegro,L., Montenegro,R., Carvalho,A.B., Abath,F.G. and Jaureguiberry,G. (2001) Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *Am. J Trop. Med Hyg.*, **65**, 355-361.
2. Leal,N.C., Abath,F.G., Alves,L.C. and de Almeida,A.M. (1996) A simple PCR-based procedure for plague diagnosis. *Rev. Inst Med Trop. Sao Paulo*, **38**, 371-373.
3. Lucena,W.A., Dhalia,R., Abath,F.G., Nicolas,L., Regis,L.N. and Furtado,A.F. (1998) Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection by the polymerase chain reaction using urine and day blood samples from amicrofilaraemic patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.*, **92**, 290-293.

4. Picken,M.M., Picken,R.N., Han,D., Cheng,Y. and Strle,F. (1996) Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.*, **15**, 489-498.
5. Tang,X., Bartlett,S.M., Smith,W.J. and Lee,C.-H. (1997) A single-tube nested PCR for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1597-1599.
6. Homan,W., Gorkom,T.v., Kan,y.y. and Jolanda,H. (1999) Characterization of *Cryptosporidium parvum* in human and animal feces by single-tube nested polymerase chain reaction and restriction analysis. *Parasitol.*, **85**, 707-712.
7. Ylitalo,N., Bergstrom,T. and Gyllensten,U. (1995) Detection of genital human papillomavirus by single-tube nested PCR and Type-specific oligonucleotide hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 1822-1828.
8. Herrmann,B., Nystrom,T. and Wessel,H. (1996) Detection of *Neisseria gonorrhoeae* from air-dried genital sample by single-tube nested PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 2548-2551.
9. Chang,C., Yuen,K., Chan,K., Yam,W. and Yim,K. (1996) Single-tube nested PCR in the diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Pathol*, **49**, 290-294.
10. Yuen,K., Yam,W., Wong,L.-P. and Seto,W.-H. (1997) Comparison of two automated DNA amplification systems with a manual one-tube nested PCR assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 1385-1389.
11. Trka,J., Divoky,V. and Lion,T. (2000) Prevention of product carry-over by single tube two-round (ST- 2R) PCR: application to BCR-ABL analysis in chronic myelogenous leukemia. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4736-4737.
12. Garcia-Quitaniilla,A., Garcia,L., Tudó,G., Navarro,M., Gonzalez,J. and Anta,M.T.J. (2000) Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in Smear-Negative samples. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1166-1169.
13. Grace,B.M., Buzard,S.G., Hughes,M.R. and Gore-Langton Robert E. (1998) Degradable dUMP outer primers in merged tandem (M/T)-Nested PCR: Low- and single-copy DNA target amplification. *Anal. Biochem.*, **263**, 85-92.
14. Féray,C., Samuel,D., Thiers,V., Gigou,M., Pichon,F., Bismuth,A., Reynes,M., Maisonneuve,P., Bismuth,H. and Bréchet,C. (1992) Reinfection of liver graft by hepatitis C virus after liver transplantation. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1361-1365.
15. Yourno,J. (1992) A method for nested PCR with single closed reaction tubes. *PCR Meth. Appl.*, **2**, 60-65.

16. Wolff,C., Hornschemeyer,D., Wolff,D. and Kleesiek,K. (1995) Single-tube nested PCR with room temperature stable reagents. *PCR Meth. Appl.*, **4**, 376-379.
17. Hanelt,B., Adema,C.M., Mansour,M.H. and Loker,E.S. (1997) Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *J. Parasitol.*, **83**, 387-394.
18. Jannotti-Passos,L.K., Vidigal,T.H.D.A., Dias-Neto,E., Pena,S.D.J., Simpson,A.J.G., Dutra,W.O., Souza,C.P. and Carvalho-Parra,J.F. (1997) PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitol.*, **83**, 395-399.
19. Hamburger,J., Yu-Xin,X., Ramzy,R.M., Jourdane,J. and Ruppel,A. (1998) Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **59**, 468-473.
20. Ciceron,L., Jaureguiberry,G., Gay,F. and Danis,M. (1999) Development of a Plasmodium PCR for monitoring efficacy of antimalarial treatment. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 35-38.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis for the optimization of the proportion of external and internal primers of STNPCR. A (1 ng) or B (0.1 ng) of *S. mansoni* DNA were used under different external:internal primers picomolar ratios. Lane 1, 50:50, lane 2, 5:50, lane 3, 0.5:50, lane 4, 0.05:50, lane 5, 0.005:50, lane 6, 0:50, lane 7, 50:0 M, molecular weight markers (λ *HindIII*). The arrows indicates the sizes of the amplicons.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis showing that the STNPCR amplifies specifically DNA of *Schistosoma*. 1 ng genomic DNA of each species was used. Lane 1, *S.mansoni*; lane 2, human; lane 3, snail; lane 4, mouse. M, molecular weight markers (λ *HindIII*). The arrow indicates the diagnostic amplicon.

Figure 3: Agarose gel electrophoresis showing the detection limit of PCR (A) and STNPCR (B). The amounts of *S.mansoni* genomic DNA in panel A are: Lane 1, 10 ng, lane 2, 1 ng, lane 3, 0.1 ng, lane 4, 10 pg, lane 5, 1 pg, lane 6, 0.1 pg, lane 7, 10 fg, lane 9, 1 fg, and in panel B: Lane 1, 0.1 ng, lane 2, 10 pg, lane 3, 1 pg, lane 4, 0.1 pg, lane 5, 10 fg, lane 6, 1 fg, lane 7, 0.1 fg. M, molecular weight markers (λ *HindIII*). The arrow indicates the size of the amplicon.