

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO TÉCNICA  
AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA EM SERVIÇOS DE SAÚDE  
DE REFERÊNCIA EM MINAS GERAIS**

**por**

**DANIELA CAMARGOS COSTA**

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2010

**DISSERTAÇÃO MDIP – CPqRR**

**D. C. COSTA**

**2010**

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO TÉCNICA  
AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA EM SERVIÇOS DE SAÚDE  
DE REFERÊNCIA EM MINAS GERAIS**

por

**DANIELA CAMARGOS COSTA**

Dissertação apresentada com vistas à  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências na área de concentração  
Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2010

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do CPqRR  
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C837r 2010	Costa, Daniela Camargos.  A Reação em Cadeia da Polimerase como técnica auxiliar no diagnóstico de malária em serviços de saúde de referência em Minas Gerais / Daniela Camargos Costa. – Belo Horizonte, 2010.  xvii, 45 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f.: 55 - 62 Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.  1. Malária/diagnóstico 2. Reação em Cadeia da Polimerase/métodos 3. Serviços de Saúde/tendência I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação).  CDD – 22. ed. – 616.936 2
---------------	--

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas René Rachou  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**A Reação em Cadeia da Polimerase como técnica auxiliar no diagnóstico de  
malária em Serviços de Saúde de referência em Minas Gerais**

**por**

**DANIELA CAMARGOS COSTA**

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos membros:

Prof. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Prof. Dra. Célia Maria Ferreira Gontijo

Prof. Dra. Kezia Katiane Gorza Scopel

Suplente: Prof. Dra. Flávia Guimarães Rodrigues

**Dissertação defendida e aprovada em: 26/02/2010.**

*“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela  
ciência, que faz arte em defesa da vida”.*  
*Carlos Chagas*

*À minha mãe, pessoa adorável e de inestimável  
valor a quem dedico essa conquista e todo meu  
amor.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por seu imensurável amor e pelo dom da vida.

Agradeço por cada uma das dificuldades enfrentadas em minha trajetória, pelas lutas desde a conclusão de minha graduação, pelas pessoas que encontrei no caminho que me lançaram pedras e desacreditaram em mim. Sou grata a todas essas experiências que só me fizeram amadurecer e me tornar uma pessoa melhor, mais forte, determinada e cheia de sonhos.

Agradeço por ter uma família tão linda, que sempre acreditou em meu potencial e me incentivou além dos estudos a ser uma pessoa íntegra. A todos vocês, minha mais sincera gratidão. À minha “mamis”, a melhor de todas as mães, que sempre se doou para que eu tivesse o melhor, que abriu mão de muitas coisas por minha causa e que tanto se empenhou para que eu chegasse até aqui. Aos tios Kátia e Israel pela ajuda, à minha tia Glaucia pelos sábios conselhos, aos meus padrinhos Eliane e Rodrigo pelo exemplo de vida. Ao meu tio Marcos pela marmitta gostosa de cada dia, ao meu tio André pelo bom humor. Às minhas primas e melhores amigas Fernanda e Anna Cláudia. Aos primos Juliana, Sérgio, Maria Eduarda, Fabrício, Cristiano, Gustavo, Raphael, Samuel e Gabriela, pelo carinho constante. Cada um de vocês colore meus dias com muita alegria.

A meu pai, pelo convívio saudável que nasceu junto à essa dissertação, no início de 2008, e pela família maravilhosa que tenho descoberto a cada dia. Aos meus irmãos João Vítor e Luíza pelas risadas que fortalecem meu coração.

À querida Toninha e família, pelo acolhimento durante meus estudos na cidade aconchegante de Votuporanga, São Paulo. Essa vitória é nossa!

À cada um dos amigos do Laboratório de Leishmanioses do CPqRR, onde iniciei e me apaixonei pela pesquisa. Obrigada a todos, em especial ao Dr. Edelberto Santos Dias, pela oportunidade tão rica. Agradeço também a amizade sincera e duradoura de Luciana e Shara.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Luzia, por me receber tão bem e acreditar em meu talento. Obrigada por todos os momentos de aprendizado e crescimento que solidificaram minha formação acadêmica. Admiro sua pessoa, seu enorme coração e sua trajetória tão exemplar na pesquisa. Agradeço também os doutores Flora Kano, Ana Paula Madureira, Cristiana Brito, Isabela Cerávolo, Antoniana Krettli, Luciano Moreira, Tais Nóbrega, Flávia Rodrigues e Bernardo pelos ensinamentos. Em especial, agradeço de coração à Dra. Flora por toda ajuda e amizade e também à Dra. Ana Paula, pela grande contribuição e apoio.

Ao suporte da Alice, Geraldo e Jaqueline, imprescindíveis para este trabalho.

Aos amigos do laboratório de Malária, em ordem alfabética, pois prefiro todos: Armando, Bruna, Bruno Coelho, Bruno Sanchez, Diego, Fernanda Freire, Fernanda Rezende, Fernando, Flávia Alessandra, Flávia Carolina, Flávia, Izabela Ibraim, Isabela Oliveira, Joaquim, Júlia, Juliana, Letícia, Lucas, Luíza, Marina, Paula, Renata, Ricardo, Verônica e Walison. Obrigada a todos pelo agradável convívio e por todo empenho em me ajudar e ensinar tanto. Agradeço também a Marli e Florença por manterem nosso ambiente de trabalho sempre limpo e agradável.

Aos indivíduos das comunidades endêmicas que contribuíram para a concretização dessa pesquisa, que vivem em condições tão precárias e ainda assim apresentam um brilho no olhar e um sorriso indescritível na face, que cativaram minha alma.

Aos indivíduos dos Serviços de Saúde de Minas Gerais e aos colaboradores deste Estado Zumpano, Maria Helena, Ednaldo e Jean, por todo o trabalho na coleta e envio das amostras. Ao professor Cor e toda a equipe de campo pela ajuda e ensinamentos.

Agradeço igualmente a coordenação e ao professores do Curso de Pós-graduação do CPqRR, bem como a CAPES e FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

À Biblioteca do CPqRR, por prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

A cada um que de uma forma ou de outra contribuiu para essa conquista, todo o meu apreço.



## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XII
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XIV
Resumo.....	XVI
Abstract.....	XVII
<b>1 Introdução.....</b>	<b>18</b>
1.1 Malária no mundo.....	18
1.2 Malária no Brasil.....	19
1.3 Malária na Região Extra-Amazonica – situação no Estado de Minas Gerais.....	20
1.4 Parasitas da malária humana e ciclo biológico.....	21
1.5 Diagnóstico laboratorial de malária humana.....	24
1.5.1 Microscopia Ótica, padrão-ouro.....	25
1.5.2 Testes imunocromatográficos rápidos.....	25
1.5.3 Ferramentas moleculares.....	26
<b>2 Justificativa.....</b>	<b>28</b>
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
<b>4 Material e Métodos.....</b>	<b>30</b>
4.1 Pannel de amostras.....	30
4.1.1 Área endêmica.....	30
4.1.2 Área não endêmica.....	31
4.2 Extrações de DNA genômico.....	34
4.2.1 Extração de DNA a partir de sangue total.....	34
4.2.2 Extração de DNA mediante sangue total em papel de filtro.....	34
4.3 Papel de Filtro.....	35

4.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
4.4.1	Controle das extrações de DNA genômico.....	35
4.4.2	Nested-PCR.....	35
4.4.3	PCR em Tempo Real.....	36
4.4.4	Amplificação do Genoma Total (WGA-Whole Genome Amplification).....	39
4.5	Análises Estatísticas.....	39
<b>5</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>41</b>
5.1	Desempenho da Nested-PCR versus PCR em Tempo Real.....	41
5.2	Desempenho da Nested-PCR em amostras de sangue extraídas de sangue total e estocadas em papel de filtro.....	42
5.3	Avaliação da Nested-PCR nos Serviços de Saúde do estado de Minas Gerais com referência para o diagnóstico laboratorial de malária.....	45
5.3.1	Avaliação da Nested-PCR para o acompanhamento de cura de pacientes com malária humana.....	46
<b>6</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>48</b>
6.1	Desempenho da Nested-PCR e PCR em Tempo Real em função da parasitemia.....	48
6.2	Desempenho da Nested-PCR a partir de amostras de sangue coletadas em sangue total e em papel de filtro.....	50
6.3	Avaliação da Nested-PCR em Serviços de Saúde de Referência de Minas Gerais	51
<b>7</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Anexo: Carta de Aceite do Comitê de Ética</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS






























<b>Figura 1</b>	Mapa da distribuição mundial da malária por <i>Plasmodium falciparum</i> .....	19
<b>Figura 2</b>	Desenho esquemático representando o ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i> .....	24
<b>Figura 3</b>	Acompanhamento de cura pela Microscopia Óptica(MO) e Nested-PCR, de pacientes diagnosticados como positivos para malária nos Serviços de Saúde de Minas Gerais.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Casos confirmados de malária segundo classificação epidemiológica, por origem de infecção, notificados em Minas Gerais, 2003 a 2008.....	21
<b>Tabela 2</b>	Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária, utilizadas no estudo comparativo entre a Nested e o PCR em Tempo Real de indivíduos provenientes da Amazônia Legal.....	31
<b>Tabela 3</b>	Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária, utilizadas no estudo comparativo entre a extração de DNA a partir de papel de filtro e sangue total de indivíduos provenientes da Amazônia Legal.....	31
<b>Tabela 4</b>	Dados demográficos, epidemiológicos e parasitológicos dos 70 indivíduos suspeitos de infecção malárica apresentados aos Serviços de Saúde de Minas Gerais, no período de fevereiro a novembro de 2009.....	32
<b>Tabela 5</b>	Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas para malária referentes a indivíduos de Serviços de Saúde de Minas Gerais, no período de fevereiro a novembro de 2009.....	33
<b>Tabela 6</b>	Indivíduos com malária aguda dos Serviços de Saúde de Minas Gerais, que foram acompanhados durante e/ou pós o tratamento para malária.....	33
<b>Tabela 7</b>	Sequências de iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados para o gene 18S ssuRNA dos parasitas da malária na Nested-PCR, PCR em Tempo Real e também para genes do sistema ABO.....	38
<b>Tabela 8</b>	Desempenho da Nested-PCR e PCR em Tempo Real, comparadas a Microscopia Óptica (MO), de acordo com a densidade parasitária.....	41
<b>Tabela 9</b>	Sensibilidade e especificidade de duas técnicas moleculares tendo a Microscopia Óptica como padrão ouro, em diferentes parasitemias.....	42
<b>Tabela 10</b>	Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária na Nested-PCR e na Microscopia Óptica (MO), mediante três protocolos de extração de DNA genômico.....	43
<b>Tabela 11</b>	Sensibilidade, especificidade e concordância kappa de diferentes métodos de extração de DNA, sangue versus papel de filtro, em diferentes densidades parasitárias.....	44

<b>Tabela 12</b>	Positividade por espécie parasitária nos protocolos de Nested-PCR e Microscopia Óptica (MO).....	44
<b>Tabela 13</b>	Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária na Nested-PCR e na Microscopia Óptica nas amostras de sangue dos indivíduos suspeitos para infecção malárica dos Serviços de Saúde de Minas Gerais, no período de fevereiro a novembro de 2009.....	45
<b>Tabela 14</b>	Positividade por espécie parasitária nos protocolos de Nested-PCR e Microscopia Óptica (MO), indivíduos suspeitos para infecção malárica dos Serviços de Saúde de Minas Gerais, fevereiro a novembro de 2009.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-  CDC – Centers for disease Control and Prevention
-  DNA – Ácido desoxirribonucléico
-  dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatos
-  DP – Demanda passiva
-  EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
-  Kb – Kilobases
-  LVC – Lâmina de verificação de cura
-  LAMP-PCR – Loop-Mediated Isothermal PCR
-  M – Molar
-  mg – Miligrama
-  ml – Mililitro
-  mM – Milimolar
-  MO – Microscopia óptica
-  MR4 – Malaria Research and Reference Reagent Resource Center
-  N – Número de indivíduos
-  NEG – Negativo
-  OMS – Organização Mundial de Saúde
-  pb – Pares de base
-  PCR – Reação em cadeia da polimerase
-  Pe – Concordância esperada
-  Pf – *Plasmodium falciparum*
-  Pf/Pv – Infecção mista
-  PNCM – Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
-  Po – Concordância observada
-  POS – Positivo
-  Pv – *Plasmodium vivax*
-  RBM – *Roll Back Malaria*
-  RDT – *Rapid Diagnostic Tests*
-  RNA – Ácido ribonucléico

- ☐ SINAM – Sistema de Informações de Agravos de Notificação
- ☐ SSU rRNA – Subunidade menor do RNA ribossomal
- ☐ SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
- ☐ TAE – Tampão Tris-acetato EDTA, pH 8,0
- ☐ WGA – amplificação do DNA genômico total
- ☐ x g – Gravidade

## RESUMO

O diagnóstico de rotina para malária humana continua sendo um desafio para os laboratórios dos países onde a doença é endêmica. Nestas áreas, o diagnóstico de rotina continua sendo a microscopia óptica (MO), que apesar de sua relativa simplicidade e baixo custo, depende de um microscopista bem treinado. Diante desta limitação, a partir da década de 90, muitos protocolos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido publicados, o que tem permitido a identificação e caracterização das espécies de plasmódios. O grande impacto da PCR tem sido, principalmente, em estudos epidemiológicos, pela possibilidade de detectar parasitas abaixo do limite de detecção da MO. Entretanto, poucos estudos têm validado a PCR em laboratórios de referência de países endêmicos, onde os microscopistas são capazes de detectar parasitemias tão baixas quanto 5 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue. Diante disso, propôs-se, no presente trabalho, avaliar a técnica de PCR como ferramenta auxiliar no diagnóstico de malária em Serviços de Saúde de referência para o diagnóstico laboratorial de malária em Minas Gerais. Inicialmente, o desempenho de duas técnicas moleculares, a Nested-PCR e a PCR em Tempo Real, foi avaliado em 94 amostras de campo. Os resultados permitiram concluir que não houve diferença estatisticamente significativa entre a Nested-PCR e a PCR em Tempo Real. Além disso, para simplificar a coleta das amostras, foram comparadas extrações a partir de sangue total e sangue em papel de filtro, com volumes de 30 e 60 $\mu\text{L}$  de sangue em papel ( $n=70$ ). Não houve diferença entre a PCR realizada com amostras de sangue total ou em papel de filtro. De relevância, todos os protocolos de PCR apresentaram limitações para detectar parasitemias abaixo de 100 parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue. Estes resultados, embora aparentemente contraditórios com a literatura, estão de acordo com os poucos estudos que avaliaram em amostras de campo a sensibilidade da PCR em função da densidade parasitária. De fato, em diversos protocolos a detecção da PCR é de  $<1$  parasita/ $\mu\text{L}$  de sangue, porém tal detecção tem sido baseada em amostras de DNA obtidas a partir de parasitos em cultura ou DNA plasmidial. Apesar destas limitações, em uma próxima etapa, optou-se por avaliar a técnica de PCR nos serviços de saúde dos municípios de Belo Horizonte e Uberlândia, no período de fevereiro a novembro de 2009. Neste período, 70 indivíduos com suspeita de infecção malárica procuraram os serviços, sendo 22 deles diagnosticados como positivos pela microscopia óptica. Em todos os indivíduos, positivos e negativos, os resultados da PCR concordaram com a MO, inclusive em relação à espécie de plasmódio. Neste grupo, as baixas parasitemias não foram frequentes já que os pacientes que procuraram o serviço apresentavam altas parasitemias ( $>300$  parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue). Para a maior parte dos indivíduos que retornaram aos serviços para verificação da cura parasitológica (11/13), a PCR concordou com a MO, sendo que em dois deles, a PCR permaneceu positiva enquanto a MO já havia negativado. Pode-se concluir que a PCR tem limitações para detecção de baixas parasitemias e recomenda-se cautela ao se estabelecer a PCR como ferramenta diagnóstica, já que a amplificação do DNA pode não significar doença clínica.



## ABSTRACT

Routine diagnosis of human malaria remains a challenge for laboratories in countries where the disease is endemic. In these areas, the diagnosis routine is the optical microscopy (OM), which despite its relative simplicity and low cost, depends on a well trained microscopist. Given this limitation, since the 90s, many protocols based on Polymerase Chain Reaction (PCR) have been published, which have allowed the identification and characterization of the species of *Plasmodium*. The major impact of the PCR has been mainly on epidemiological studies, due to its ability to detect parasites below the detection limit of the OM. However, few studies have validated the PCR in reference laboratories, where microscopists are able to detect parasitemias as low as 5 parasites/ $\mu$ L of blood. Therefore, it was proposed in the present study to evaluate the PCR as a complementary tool in the diagnosis of malaria in the Health Services of reference for the laboratory diagnosis of malaria in Minas Gerais. Initially, the performance of two molecular techniques, the Nested-PCR and Real Time PCR was evaluated in 94 field samples. The results showed that there was no statistically significant difference between the Nested-PCR and Real Time PCR. Moreover, to simplify the collection of samples, extraction from whole blood and blood on filter paper, with volumes of 30 and 60 $\mu$ L of blood (n = 70) were compared. There was no difference between the PCR performed with whole blood samples or filter paper. Remarkably, all the PCR protocols showed limitations to detect parasitaemias under 100 parasites/ $\mu$ L blood. These results, although apparently contradictory to the literature, agree with the few studies that have evaluated the sensitivity of PCR in function of parasite density from field samples. In fact, in several protocols PCR detection is < 1 parasite/ $\mu$ L of blood, though such detection has been based on DNA samples obtained from parasites in culture or plasmidial DNA. Despite these limitations, in a next step it was chosen to assess the PCR technique in health services of the municipalities of Belo Horizonte and Uberlândia, from February to November 2009. During this period, 70 individuals with a suspected malaria infection sought the services, 22 of them being diagnosed as positive by light microscopy. In all individuals, positive and negative PCR results as well as *Plasmodium* species identification, agreed with the OM. In this group, the low parasitemias were not frequent since the patients attending the service had high parasitemias (>300 parasites/ $\mu$ L of blood). For most of the individuals who returned to the services to check parasitological cure (11/13), PCR agreed with the OM, however, in two patients, PCR remained positive while OM yielded negative results. It can be concluded that the PCR has limitations to detect low parasitemias and caution is recommended in establishing the PCR as a diagnostic tool, since the amplification of DNA may not mean clinical disease.

# 1 Introdução

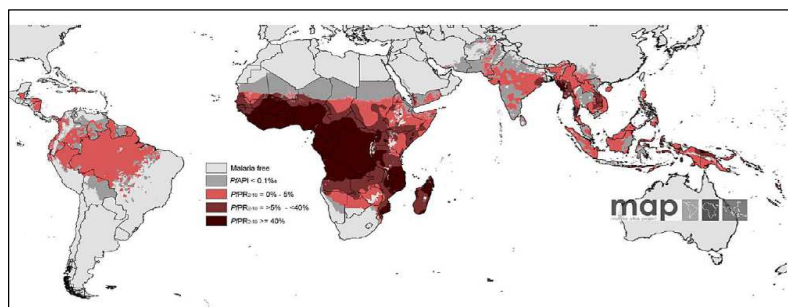
## 1.1 Malária no mundo

Devido às suas elevadas taxas de mortalidade e morbidade, a malária humana é considerada a doença parasitária mais importante (WHO, 2009). A doença atinge 107 países das regiões tropicais e subtropicais do globo e 40% da população mundial encontra-se sob risco de contrai-la. Anualmente ocorrem cerca de 500 milhões de casos clínicos, resultando em mais de um milhão de mortes, principalmente no continente africano, entre crianças menores de cinco anos de idade e gestantes. Aproximadamente 90% dos casos de malária concentram-se no continente africano, onde a espécie predominante é o *Plasmodium falciparum* (Figura 1) e os 10% restantes são distribuídos entre o Sudeste Asiático, América Latina e Oceania. A manutenção contínua da doença é favorecida pela resistência dos parasitas às drogas antimaláricas, ampla distribuição dos vetores somada à resistência aos inseticidas, intenso processo de migração, descontinuidade das ações de controle e ausência de uma vacina eficaz comercialmente disponível (WHO, 2005; WHO, 2009a).

No que se refere ao controle da malária humana, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a tríade: combate ao vetor, diagnóstico precoce e tratamento oportuno dos doentes. Atualmente, a preocupação com a doença não está restrita aos países endêmicos e sim a todas as regiões do globo, inclusive àquelas livres de transmissão (WHO, 2009a). Isso ocorre devido ao processo de globalização, que proporciona um trânsito intenso de bens e pessoas, o que favorece a dispersão de diversas doenças, incluindo a malária humana (Trigg & Kondrachine, 1998; Buss *et al.*, 2007; Erdman & Kain, 2008). Fora do continente africano as mortes em decorrência da malária ocorrem em populações não imunes, adultos e crianças, em regiões onde os recursos para o diagnóstico e terapêutica são escassos. Nos últimos 20 anos, a malária importada cresceu 400% nos países em desenvolvimento (Hawkes & Kain, 2007) e anualmente, pelo menos 30.000 viajantes de países industrializados contraem malária. Neste grupo, estima-se que entre 1 a 4% dos indivíduos que se infectarem pelo *P. falciparum* deverá morrer em decorrência da doença (Kain *et al.*, 2001; WHO, 2009a).

Em 1998, a OMS criou uma rede de controle tri-setorial denominada “Roll Back Malaria” (RBM, Retroceder a malária), para operar em nível global, regional e local. Essa iniciativa propôs a redução dos óbitos ocasionados pela malária em cerca de 50% até 2010. No ano de 2009, o diretor da OMS se posicionou favoravelmente ao programa de controle do RBM, devido aos bons

resultados obtidos ao longo desses anos. Esta iniciativa tem surtido profundos efeitos, particularmente na saúde de crianças africanas, demonstrando que medidas de controle bem estruturadas contribuem para melhoria da saúde da população atingida pela malária (WHO, 2009a).



Fonte: Hay *et al.*, 2009.

**Figura 1** - Mapa da distribuição mundial da malária por *Plasmodium falciparum*.

## 1.2 Malária no Brasil

No Brasil, a região da Amazônia Legal é responsável pela quase totalidade da doença no país, uma vez que 90% dos casos concentram-se nesta região (SVS, 2007). A Amazônia Legal é uma divisão geo-política que abrange os estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Considera-se que a malária humana no Brasil seja causada por três espécies de plasmódio: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e o *P. malariae*, sendo o *P. vivax* responsável por cerca de 80% dos casos de malária registrados (SVS, 2007). Devido às características dessa espécie, a doença em nosso país apresenta baixa mortalidade, mas considerável morbidade (PNCM, 2004; Castro & Singer, 2007; Suárez-Mutis & Coura, 2007).

Nas décadas de 70 e 80, o desenvolvimento intensificado da Amazônia acelerou os processos migratórios, atraindo moradores de outras regiões do país, graças aos projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, construção de estradas e hidrelétricas, projetos agropecuários, extração da madeira e mineração. Nesta região as precárias condições sócio-econômicas da população migrante determinaram a rápida expansão da doença (FUNASA, 2001). Mais recentemente, as invasões não controladas das áreas peri-urbanas, como tem sido o

caso de Manaus/AM e Porto Velho/RO, têm configurado como importantes locais de transmissão. Estas cidades têm recebido grande número de pessoas que se deslocam de outros municípios em busca de melhores oportunidades de trabalho. Como consequência, esses municípios concentraram 21,1% do total de casos de malária ocorridos na região Amazônica em 2005 (SVS, 2006).

O Programa de Controle da malária no país se baseia em dois grandes pilares: o diagnóstico precoce e o tratamento adequado e rápido dos doentes. Segundo recomendações do Ministério da Saúde, essas medidas são hoje os principais alicerces disponíveis para o controle da doença (SVS, 2006). Basicamente, o programa de controle da malária divide o território brasileiro em duas regiões: a endêmica e a não endêmica. A primeira compreende a Amazônia Legal, onde concentra maior parte dos casos do país e a segunda, região extra-amazônica, é constituída pelo restante dos Estados da Federação (SVS, 2007). Nesta última, o baixo número de casos confirmados da doença (cerca de 1% dos registros do país) faz com que a suspeita da doença não faça parte da rotina dos serviços médicos (SVS, 2003; 2006; 2007).

Nos últimos anos, com as medidas intensificadas de controle tem sido observada uma importante redução no número de casos de malária em todo o país (Tada *et al.*, 2007; PNCM, 2004). De acordo com os dados do SINAN [Sistema Nacional de Notificação (2009)], houve uma redução de 50,40% no número de casos de malária de 2005 para 2008 no país. Nos últimos anos, o Ministério da Saúde tem investido na distribuição de cortinados impregnados com inseticida, onde se espera com esta medida, impacto positivo no controle da malária no país.

### **1.3 Malária na Região Extra-Amazônica – situação no Estado de Minas Gerais**

Apesar da endemicidade da malária no Brasil se restringir à Amazônia Legal, a doença apresenta grande impacto nas áreas não endêmicas. Essas regiões revertem-se de importância epidemiológica por seu elevado potencial de disseminação devido à presença do vetor, pela migração constante da população e também por sua gravidade clínica em indivíduos não imunes quando o diagnóstico e o tratamento ocorrem tardiamente (SVS, 2001; 2005; 2006; SES/MG, 2007).

Em Minas Gerais, os surtos de transmissão autóctone da malária têm sido esporádicos (Tabela 1), contudo, o Estado possui fatores que favorecem a sua ocorrência como: presença do vetor e fluxo migratório de indivíduos infectados para áreas não endêmicas (SES/MG, 2007;

Chaves *et al.*, 1995). O desconhecimento da doença pela população, e a pouca familiaridade dos profissionais de saúde em relação à abordagem diagnóstica e terapêutica da malária, constituem fatores relevantes para um prognóstico desfavorável no Estado (SES/MG, 2007).

**Tabela 1** - Casos confirmados de malária segundo classificação epidemiológica, por origem de infecção, notificados em Minas Gerais, 2003 a 2008.

Ano	Classificação Epidemiológica				Total de casos
	Autóctones		Importados		
	N	%	N	%	
2003	25	15.9	132	84.1	157
2004	2	1.2	164	98.8	166
2005	16	7.7	192	92.3	208
2006	-	-	154	100.0	154
2007	1	0.7	147	93.0	148
2008	-	-	118	100.0	118
Total	44	4.6	907	95.4	951

Fonte: GVA/CZVFRB/SE/SVS/SES-MG: Fichas de laboratório e SINAN.

#### 1.4 Parasitas da malária humana e ciclo biológico

Os parasitas causadores da malária pertencem ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados. Destas, quatro espécies parasitam frequentemente o homem: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897), *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *P. malariae* (Laveran, 1881) e *P. ovale* (Stephens, 1922). Esta última espécie é restrita ao continente africano, regiões da Ásia e ilhas do Pacífico (Collins e Jeffery, 2005; Greenwood *et al.*, 2005). Estudos recentes na Ásia têm sugerido que o *Plasmodium knowlesi* seja o quinto plasmódio humano. Essa espécie infecta naturalmente primatas-não-humanos do continente asiático e tem causado óbitos na população humana (Galinski & Barnwell, 2009; White, 2008; CDC, 2009). Casos de malária pelo *P. knowlesi* já foram relatados na Malásia (Vythilingam, *et al.*, 2008; Bronner *et al.*, 2009),

Filipinas (Luchavez *et al.*, 2008), Mianmar (Zhu & Zheng, 2006), Tailândia (Jongwutiwes *et al.*, 2008), Singapura (Ng *et al.*, 2008) e Vietnã (Eede *et al.*, 2009).

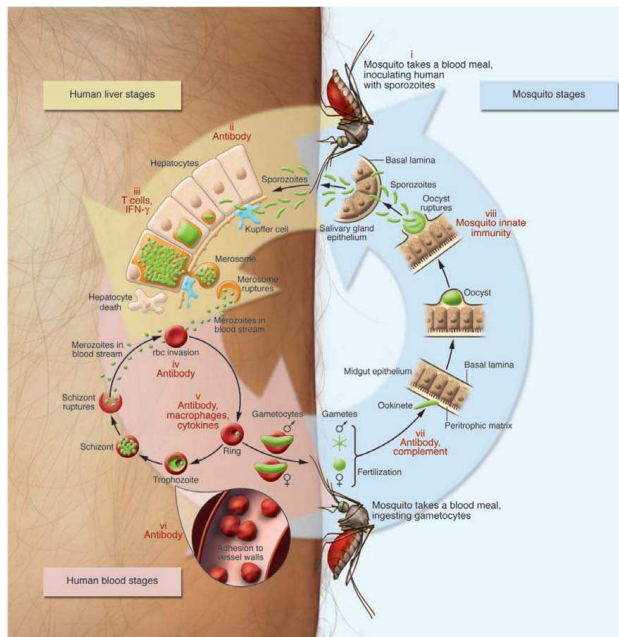
O ciclo biológico dos plasmódios humanos é complexo e nos últimos anos tem sido alvo de muitos estudos. O ciclo biológico envolve uma série de interações específicas entre as diferentes formas do parasito e as células hospedeiras, as quais são responsáveis pelo sucesso na infecção e na transmissão da doença. Os plasmódios possuem um ciclo heteroxênico necessitando, obrigatoriamente, de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. A fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado enquanto a reprodução sexuada ocorre no hospedeiro invertebrado (Hall *et al.*, 2005). Entender o ciclo da malária de forma profunda em todos os seus aspectos é extremamente importante para nortear futuros estudos visando o controle da doença por meio de novos alvos quimioterápicos e diagnósticos (Greenwood *et al.*, 2008).

A forma infectante é o esporozoíto, que penetra na pele do hospedeiro vertebrado pela probóscide do anofelino, durante o repasto sanguíneo. Estima-se que entre 15 a 200 parasitos são depositados sob a pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos não atingem a circulação sanguínea logo que são injetados, mas podem permanecer por horas na pele (Mota & Rodriguez, 2004; Sinnis & Zavala, 2008; Amino *et al.*, 2006). As formas que escapam do sistema imunológico e atingem a circulação sanguínea migram para o fígado e penetram nos hepatócitos (Amino *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007). A jornada percorrida pelos esporozoítos até o fígado é ainda assunto de debate. Entretanto, uma característica intrigante é a capacidade do parasito de interagir com as células do fígado, migrando entre os hepatócitos, até por fim se estabelecer em uma célula específica. Esta migração trans-celular é importante, provavelmente, para a indução da exocitose de organelas apicais do parasito, tornando-os aptos a infectar o hepatócito e se desenvolver dentro do vacúolo parasitóforo (Mota & Rodriguez, 2004). No caso do *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítos podem se diferenciar em formas latentes no interior do fígado, os hipnozoítos, que são responsáveis pelas recaídas da doença meses ou, mais raramente, anos após a infecção (Krotoski, 1985).

Os esporozoítos, ao se estabelecerem em um hepatócito, se diferenciam e multiplicam assexuadamente resultando na formação dos merozoítos. Os merozoítos são liberados gradativamente na forma de vesículas denominadas merossomas, que atingem a circulação sanguínea dando assim, continuidade ao ciclo (Sturm *et al.*, 2006). Na circulação sanguínea, os merozoítos invadem os eritrócitos por meio de interações específicas entre a membrana do parasita e receptores específicos da superfície dessas células. Inicia-se então o ciclo assexuado

nas hemácias, responsável pela sintomatologia clínica da malária. Dentro dos eritrócitos os merozoítos se transformam em trofozoítos jovens, trofozoítos maduros e finalmente esquizontes. Dependendo da espécie, cada esquizonte gera de 10-30 merozoítos que penetraram em outras células sanguíneas, reiniciando o ciclo eritrocítico. Após um período que varia de 3 a 10 dias, conforme a espécie, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos.

As fêmeas dos anofelinos, ao se alimentarem do sangue de um indivíduo infectado, ingerem os gametócitos e é nessa fase que se inicia o ciclo sexuado, no estômago do inseto. Esses gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, que são fecundados produzindo zigotos. O zigoto se torna alongado e móvel sendo denominado oocineto. Os oocinetos completam sua maturação ainda no bolo alimentar, no intestino do hospedeiro invertebrado. Após a maturação, os oocinetos estão aptos a realizarem o processo de invasão. A primeira barreira enfrentada pelo parasito ao sair do intestino médio, é a matriz peritrófica (MP), estrutura acelular que recobre o intestino. Muito pouco se conhece sobre os detalhes deste processo de invasão e alguns modelos já foram propostos na tentativa de entender esse evento. A proposta chamada time bomb (bomba-relógio), sugerida por Kumar & Barillas-Mury (2005), propõe que a invasão dos oocinetos ocorre, obrigatoriamente, nos pontos onde as membranas celulares apicais de células adjacentes se encontram. Em seguida, essas células invadidas entram no processo de apoptose levando a perda das microvilosidades e a fragmentação do DNA genômico (Barillas-Mury & Han, 2000). Esse modelo também foi observado em oocinetos de *P. falciparum* atravessando o epitélio de *Anopheles stephensi* (Baton & Ranford-cartwright, 2004) e com *P. gallinaceum* invadindo *Aedes aegypti* (Gupta *et al.*, 2005). Após a invasão, o oocineto sai das células epiteliais e entra em contato com a lâmina basal. Esse contato induz a transformação do oocineto em oocisto, uma forma séssil. Em cada oocisto, são ativadas as maquinarias de replicação do DNA e de síntese de proteínas para a amplificação assexuada do número de parasitos gerando a produção de milhares de esporozoítos. Como consequência desse evento, a cápsula do oocisto se torna mais fina e fragmentada, possibilitando o aparecimento de perfurações, por onde os esporozoítos escapam (Meis *et al.*, 1992). Ao serem liberados na hemolinfa, os esporozoítos conseguem invadir as glândulas salivares, podendo, num próximo repasto sanguíneo, inocular as formas infectantes no hospedeiro vertebrado (Figura 2).



Fonte: Greenwood et al. 2008.

**Figura 2** - Desenho esquemático representando o ciclo de vida do *Plasmodium sp.* Ilustrando suas diversas etapas, incluindo as recentes alterações.

### 1.5 Diagnóstico laboratorial de malária humana

O diagnóstico de malária é um dos pilares do Programa de Prevenção e Controle da doença no país e no mundo. Um bom diagnóstico propicia a identificação precoce dos casos de malária e permite a caracterização da espécie, o que é importante para a definição do esquema terapêutico (SVS, 2003; WHO, 2009a). Estima-se que um diagnóstico de qualidade seja capaz de evitar, potencialmente 100.000 mortes em decorrência da malária e 400.000.000 tratamentos desnecessários (Martens & Hall, 2000). Tendo em vista a importância do diagnóstico de malária, vários métodos têm sido estudados e desenvolvidos a fim de aprimorar a acurácia desta ferramenta. Nesse contexto, um método diagnóstico ideal seria aquele de fácil e rápido desempenho, que possuísse uma alta sensibilidade e especificidade, que fosse capaz de



quantificar a parasitemia e que apresentasse ainda custo reduzido (Hanscheid & Grobusch, 2002). Porém, diante da inexistência, até o presente momento, deste diagnóstico ideal, busca-se aquele que consiga chegar o mais próximo do esperado, com melhor custo-benefício.

### **1.5.1 Microscopia Ótica, padrão-ouro**

O diagnóstico de rotina para malária humana é historicamente baseado na detecção do parasita no sangue. O exame microscópico de gotas espessas coradas com Giemsa é simples, de baixo custo, e possibilita a quantificação da parasitemia (Erdman & Kain, 2008). As principais desvantagens da microscopia são a difícil detecção de baixas parasitemias ( $< 5$  parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue), de infecções mistas, pelas similaridades morfológicas entre estágios jovens dos parasitas da malária de diferentes espécies (Noedl *et al.*, 2006), bem como a diferenciação de plasmódios humanos e simianos, que são morfológicamente similares (Ávila & Ferreira, 1996; CDC, 2008). O exame de gota espessa é também, em muitas situações, de difícil leitura, demanda tempo considerável, requer equipamentos de boa qualidade e, principalmente, pessoal bem treinado, tanto para o preparo quanto para o exame das lâminas. Dessa forma, em algumas condições, sua sensibilidade pode cair para 50-100 parasitos/ $\mu\text{L}$  de sangue (Barker, *et al.*, 1994; Ávila & Ferreira, 1996; Hanscheid, 1999). Tais desvantagens da microscopia ótica, padrão-ouro no diagnóstico de malária humana, têm incentivado a busca de novos métodos diagnósticos a fim de se aprimorar o diagnóstico da doença humana.

### **1.5.2 Testes imunocromatográficos rápidos**

Recentemente, uma variedade de testes diagnósticos rápidos (RDT, Rapid Diagnostic Tests) foi desenvolvida para o diagnóstico de malária humana, baseado no reconhecimento de antígenos do parasita na circulação sanguínea (Mens *et al.*, 2007).

Os RDTs são comercialmente disponíveis em kits, que incluem os reagentes necessários e não requerem treinamento intenso ou equipamentos para realizá-los e interpretá-los. O princípio deste método é baseado em uma imunocromatografia em membrana de nitrocelulose, onde a captura de antígenos circulantes do parasita é realizada por meio de anticorpos monoclonais, sendo a presença do antígeno indicada por uma mudança de coloração na fita de nitrocelulose (Moody & Chiodini, 2002). A acurácia dos RDTs em detectar os parasitas da malária depende de:

(i) concentração do antígeno alvo no sangue do hospedeiro, (ii) fluxo de migração Antígeno-Anticorpo na fita de celulose, (iii) condições físicas dos RDTs, incluindo a integridade de anticorpos e conjugados (iv) transporte e estocagem, (v) variação antigênica do antígeno alvo e (vi) interpretação do teste, que muitas vezes pode ser subjetiva (Wongsrichanalai *et al.*, 2007).

Os testes rápidos tem se mostrado úteis em situações específicas, tais com: diagnóstico de indivíduos distantes de um serviço de microscopia adequado; diagnóstico de força-tarefa em militares e companhias de mineração; surtos de malária; diagnóstico de urgência em hospitais e clínicas (Wongsrichanalai *et al.*, 2007; Luchavez *et al.*, 2007; Erdman & Kain, 2008; Murray & Bennett, 2009). Na América Latina, os programas de controle de malária, com o apoio do fundo global para o controle da AIDS, Tuberculose e Malária, planejam introduzir os RDTs como auxiliar no diagnóstico de rotina (WHO, 2004).

### 1.5.3 Ferramentas Moleculares

As técnicas de Biologia Molecular surgiram a partir da década de 80 e trouxeram novas perspectivas para o diagnóstico não só da malária, mas de muitas outras doenças infecto-parasitárias. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica molecular capaz de detectar o DNA ou RNA do parasito, sendo considerada de alta sensibilidade e especificidade. O princípio da técnica se baseia no uso de dois pares de iniciadores que flanqueiam uma sequência alvo do *Plasmodium* sp. que juntamente com uma enzima, a Taq polimerase, são usados em sucessivos ciclos de desnaturação e extensão do DNA para gerar bilhões de cópias da sequência alvo. A PCR para o diagnóstico de malária foi descrita por Waters & McCutchan, em 1989, baseando-se em sequências gênero e espécie-específicas dentro da região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal dos plasmódios, gene 18S. Desde então, uma variedade de protocolos tem sido descritos, a maioria deles baseado nesta mesma região (Snounou *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1999; Parajuli *et al.*, 2009). O gene 18S é um bom alvo para a diferenciação de plasmódios, pois apresenta regiões polimórficas flanqueadas por regiões conservadas, o que facilita o desenho de iniciadores gênero e espécie específicos (Lal *et al.*, 1989; Snounou *et al.*, 1993; Das, 1995).

A técnica de PCR tem sido amplamente utilizada em pesquisas envolvendo diagnóstico de malária humana. No Brasil, diferentes grupos de pesquisa têm utilizado a técnica de PCR para determinar infecções assintomáticas, infecções mistas e para diferenciar espécies

morfologicamente similares (Alves *et al.*, 2002; Di Santi *et al.*, 2004; Cavasini *et al.*, 2000; Scopel *et al.*, 2004; Zalis *et al.*, 1996). Embora as técnicas de PCR sejam úteis para fins de pesquisa, demandam tempo e equipamentos caros e especializados, bem como condições adequadas de laboratório, geralmente indisponíveis em regiões afetadas pela malária, o que limitam a sua aplicabilidade para o diagnóstico individual na rotina (Mens *et al.*, 2007). Em resumo, no campo de malária humana, as ferramentas moleculares podem permitir informações importantes para o desenvolvimento de diagnósticos mais precisos, drogas eficazes e vacinas potenciais. Com o mapeamento dos genomas dos plasmódios e seus respectivos vetores, o acesso à essas informações pode cooperar para o avanço no controle e diminuição da incidência da doença (Greenwood, 2002).

A variante da reação em cadeia da polimerase chamada PCR em Tempo Real, trouxe algumas vantagens frente a PCR convencional. Enquanto na primeira a visualização do produto é realizada após o término da reação (platô), na PCR em Tempo Real pode-se detectar o produto na fase exponencial da reação. Dessa forma, é possível quantificar a parasitemia dos indivíduos infectados. Além disso, alguns protocolos foram desenvolvidos para utilizar apenas um par de iniciadores e através de curvas de dissociação é possível o diagnóstico específico das espécies que infectam o homem (Mangold *et al.*, 2005; Perandin *et al.*, 2004). Recentemente, uma nova técnica molecular, a amplificação isotérmica do DNA (LAMP PCR - Loop-mediated isothermal amplification) tem sido validada para vários testes diagnósticos (Parida, *et al.*, 2008). A LAMP apresenta-se como uma técnica simples, de preço acessível e que tem o potencial de combinar a alta sensibilidade de um teste molecular, com a possibilidade de realização em condições precárias de campo, onde poucos recursos técnicos são disponíveis. Esta ferramenta, assim como o Real Time PCR, também dispensa a manipulação pós-amplificação, sendo o resultado fornecido pela visualização de turbidez ou fluorescência. Entretanto, para o diagnóstico diferencial de malária humana, os protocolos de LAMP ainda estão sendo padronizados (Paris *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010).

## 2 Justificativa

A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico diferencial de malária humana tem sido descrita por vários autores. Grande parte dos protocolos publicados baseiam-se na técnica de Nested-PCR, amplificando sequências gênero e espécie específicas dentro do gene 18 S, que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal. Essa reação de PCR é caracterizada por dois ciclos de amplificação, o que geralmente está relacionado à uma sensibilidade superior a PCR tradicional. Avaliar o desempenho de uma técnica promissora como a PCR, como ferramenta auxiliar no diagnóstico diferencial dos plasmódios humanos, em Serviços de Referência para o diagnóstico de malária pode ser importante em situações onde o diagnóstico é duvidoso. Isto é relevante já que em nosso meio o diagnóstico para malária continua sendo realizado pelo exame parasitológico, que demanda um especialista em microscopia. A maior parte dos estudos que avaliam a sensibilidade da PCR para malária utilizaram curvas de titulação para os cálculos dos índices de validade, utilizando-se para isto DNA de cultivo de *P. falciparum* e/ou DNA plasmidial. Entretanto, a amplificação destes DNAs molde é bastante facilitada se comparada ao DNA obtido de amostras de campo. Até o momento, poucos estudos avaliaram o desempenho da PCR em função da densidade parasitária da população-alvo, portanto, estudos desta natureza se fazem necessários. Atualmente, apesar dos ensaios de PCR não serem ideais para o diagnóstico individual de malária aguda, estes ensaios podem ser excelentes ferramentas para estudos epidemiológicos, quimioterápicos e de vacinas.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliação do desempenho da Reação em Cadeia da Polimerase como ferramenta auxiliar no diagnóstico e monitoramento de infecção malárica em Serviços de Saúde que são referência para o diagnóstico laboratorial de malária.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Comparar o desempenho da Nested-PCR em relação a PCR em Tempo Real para o diagnóstico diferencial das três espécies de plasmódio existentes no Brasil, *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*;

Comparar o desempenho das técnicas moleculares, Nested-PCR e PCR em Tempo Real, em função da densidade parasitária detectada pela microscopia óptica;

Comparar o desempenho da PCR utilizando-se amostras extraídas diretamente de sangue total ou estocado em papéis de filtro;

Avaliar o desempenho da PCR como ferramenta complementar no diagnóstico de rotina e acompanhamento de cura de pacientes dos Serviços de Saúde de Belo Horizonte e Uberlândia.

## 4 Material e Métodos

### 4.1 Paineis de amostras

O estudo foi conduzido com amostras de DNA extraídas do sangue periférico de indivíduos que foram expostos à malária, cujo diagnóstico específico foi realizado em serviços de Referência da Amazônia (área endêmica) ou Minas Gerais (área não endêmica). Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Protocolo CEP: CPqRR nº 24/2008). A todos os indivíduos elegíveis foram prestados esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos do presente trabalho, dando ênfase para a participação voluntária, sendo a recusa isenta de penalidade.

#### 4.1.1 Área endêmica

No estudo, foram incluídos 164 indivíduos provenientes de regiões variadas da Amazônia Legal, área endêmica para malária humana. Destes, 128 estavam infectados pelo *P. vivax* ou *P. falciparum* e 36 não estavam infectados. O diagnóstico de malária aguda destes indivíduos foi baseado na Microscopia Óptica (MO) utilizando-se a técnica de gota espessa corada pelo Giemsa, considerada o padrão ouro para o diagnóstico de malária humana (SVS, 2008). As lâminas de cada paciente foram preparadas e examinadas por microscopistas bem capacitados dos Laboratórios de Referência em Malária da região Amazônica. De cada um dos indivíduos foram colhidos 5mL de sangue por punção venosa, em tubos do tipo “vacutainer” (sistema Vacuette®, Greiner Bio-One GmbH, Kremmünster, Áustria) com anticoagulante (EDTA), sendo o sangue coletado utilizado para a extração do DNA genômico. Do total de amostras, 94 foram utilizadas para um estudo comparativo entre diferentes protocolos de PCR (Nestled e PCR em Tempo Real), sendo 74 positivos e 20 negativos. A tabela 2 ilustra a distribuição destas amostras em função da positividade e densidade parasitária. As 70 amostras restantes (Tabela 3) foram utilizadas para avaliar as técnicas moleculares, bem como diferentes protocolos de extração de DNA: a partir de amostras extraídas diretamente do sangue total e extração de sangue estocado em papéis de filtro. Portanto, para esse fim, de cada indivíduo foram coletados 5mL de sangue por punção venosa e parte deste sangue, correspondendo a 3 gotas (aproximadamente 30µL cada), foi estocado em papel de filtro, sendo cada papel seco ao ar (24 horas) e estocado em embalagens individuais com dessecante (Sílica).

**Tabela 2** - Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária, utilizadas no estudo comparativo entre a Nested e o PCR em Tempo Real de indivíduos provenientes da Amazônia Legal.

<b>Amostras</b>	<b>MO*</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Positivas	>1000	20	21.3
	301-1000	16	17.0
	101-300	16	17.0
	1-100	22	23.4
Negativas	0	20	21.3
<b>Total (%)</b>		94	100

\* Parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO).

**Tabela 3** - Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária, utilizadas no estudo comparativo entre a extração de DNA a partir de papel de filtro e sangue total de indivíduos provenientes da Amazônia Legal.

<b>Amostras</b>	<b>MO*</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Positivas	>1000	29	41.4
	301-1000	6	8.6
	101-300	14	20
	1-100	5	7.1
Negativas	0	16	22.9
<b>Total (%)</b>		70	100

\* Parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO).

#### 4.1.2 Área não endêmica

As amostras de sangue total foram coletadas em papel de filtro para todos os indivíduos suspeitos de infecção malárica que procuraram os Serviços de Referência dos municípios de Uberlândia e Belo Horizonte, no período de 01 de fevereiro de 2009 a 30 de novembro de 2009. Tais coletas foram realizadas visando validar um protocolo de PCR em Serviços de Referência para o diagnóstico de malária humana no Estado de Minas Gerais. No devido período, foram realizadas 100 coletas correspondentes a 70 indivíduos (casos primários). A tabela 4 apresenta os

dados demográficos, epidemiológicos e parasitológicos, dos indivíduos com suspeita de malária clínica. Pode-se observar que durante o ano de 2009, os indivíduos que procuraram os Serviços de Referência em Minas Gerais apresentaram uma mediana de idade de 42 anos, que variou de 1 a 76 anos. A proporção de homens e mulheres foi de 3:1 e as principais atividades associadas à exposição foram viagens turísticas ou a trabalho e construções de estradas e barragens. Em relação à positividade, 22 indivíduos apresentaram malária aguda e 48 indivíduos não apresentaram infecção. A proporção de infecção por *P. falciparum* e *P. vivax* foi de 11 e 17%, respectivamente. Também foram caracterizadas duas infecções mistas, por *P. falciparum* e *P. vivax*. Em relação ao local provável de infecção, a maior parte dos indivíduos (34%) adquiriu a doença nos estados da Amazônia Legal. A distribuição dos indivíduos com malária aguda, segundo densidade parasitária, está discriminada na Tabela 5, sendo a maioria dos casos com parasitemias consideradas relativamente altas (>300 parasitas/ $\mu$ L de sangue).

**Tabela 4** - Dados demográficos, epidemiológicos e parasitológicos dos 70 indivíduos suspeitos de infecção malárica apresentados aos Serviços de Saúde de Minas Gerais, no período de fevereiro a novembro de 2009.

<b>Características</b>		
<b>Mediana da idade/anos</b> (variação)		42 (1 - 76)
<b>Gênero</b> (masculino:feminino)		3:1
<b>Atividade relacionada à exposição (n, %)</b>		
Construção de estradas e barragens		11 (16)
Viagem a trabalho		16 (23)
Viagem turística		17 (24)
Ignorado ou sem informação		26 (37)
<b>Malária aguda (n, %)</b>		
<b>Sim</b>	<i>Plasmodium falciparum</i>	8 (11)
	<i>Plasmodium vivax</i>	12 (17)
	Infecção mista*	2 (3)
	<i>Positividade Total, n (%)</i>	22 (31)
<b>Não</b>		48 (69)
<b>Local Provável de Infecção (n, %)</b>		
Amazônia Legal		24 (34)
África		13 (19)
Ignorado ou sem informação		33 (47)

\**P. falciparum/P. vivax*



**Tabela 5** - Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas para malária referentes a indivíduos de Serviços de Saúde de Minas Gerais, no período de fevereiro a novembro de 2009.

Amostras	MO*	N	(%)
Positivas	>300	16	22.9
	101-300	4	5.7
	1-100	2	2.9
Negativas	0	48	68.5
<b>Total</b>		70	100

\* Parasitas/μl de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO).

Dos 22 indivíduos positivos para malária dos Serviços de Referência, 13 retornaram aos serviços para o acompanhamento parasitológico durante e/ou após o tratamento para malária (Tabela 6). Os técnicos dos serviços de referência realizaram a confecção e o exame de gotas espessas e, em paralelo, a coleta em papel de filtro. Os papéis contendo o sangue foram secos à temperatura ambiente por 24 horas, para a completa secagem do material, sendo em seguida, individualmente envolvidos em papel alumínio e armazenados em envelope com sílica, evitando dessa forma o acúmulo de umidade e a perda do material.

**Tabela 6** – Indivíduos com malária aguda dos Serviços de Saúde de Minas Gerais, que foram acompanhados durante e/ou pós o tratamento para malária.

Indivíduo	Dia 0 <sup>1</sup>	LVC <sup>2</sup> 1	LVC2	LVC3	LVC4
MG1	Pv <sup>3</sup>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
MG2	Pf <sup>4</sup>	Pf	Negativo	Negativo	
MG3	Pf	Pf	Pf	Negativo	Negativo
MG4	Pv	Pv	Negativo	Negativo	
MG5	Pv	Negativo	Negativo	Pv	
MG6*	Pf	Pf	Pf	Negativo	
MG7	Pf+Pv <sup>5</sup>	Negativo	Negativo		
MG8	Pf	Pf	Pf		
MG9	Pv	Negativo	Negativo		
MG10	Pv	Negativo			
MG11	Pf+Pv	Pf+Pv			
MG12	Pf	Pf			
MG13*	Pf	Pf †			

<sup>1</sup> Início do tratamento; <sup>2</sup> LVC (Lâmina de Verificação de Cura), os números de 1-4 correspondem ao diagnóstico realiza durante e/ou após o tratamento, sendo as medianas do acompanhamento: 3 dias (LVC1); 16 dias (LVC2); 26 dias (LVC3); 45 dias (LVC4); <sup>3</sup> *Plasmodium vivax*; <sup>4</sup> *P. falciparum*; <sup>5</sup> Infecção mista ; † - óbito no dia da LVC1 . Em asterisco os indivíduos que estavam internados.

## **4.2 Extrações de DNA genômico**

No presente estudo, avaliou-se o desempenho da PCR a partir de extrações de DNA diretamente do sangue total em relação ao sangue estocado em papel de filtro. Além disso, foram comparadas as extrações a partir de uma gota de sangue em papel de filtro ( $\pm 30\mu\text{L}$  de sangue) e duas gotas de sangue em papel de filtro ( $\pm 60\mu\text{L}$  de sangue).

### **4.2.1 Extração de DNA a partir de sangue total**

A extração do DNA genômico dos indivíduos foi realizada utilizando-se o kit QIAGEN (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, para cada 1mL de sangue total acrescentaram-se 3mL de solução de lise para eritrócitos em um tubo Falcon (15mL). Após lise visível ( $\pm 10$  minutos), a mistura foi centrifugada a 2000 x g, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante foi então removido e o material ressuspenso em 1mL de solução de lise celular. Em seguida, adicionaram-se 300 $\mu\text{L}$  de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido por 30s em agitador de tubos (vórtex), e centrifugado a 2000 x g, por 10 minutos, a 25°C. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi precipitado em um tubo contendo 1 mL de isopropanol P.A. absoluto (Merck) à 4°C. Em seguida, o DNA foi centrifugado a 2000 x g, por 3 minutos, a 25°C, sendo o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1mL de etanol 70% para a lavagem do DNA seguido de centrifugação a 2000 x g, por 1 minuto, a 25°C. O sobrenadante foi novamente descartado e após a completa evaporação do etanol por aproximadamente 15min, o DNA foi hidratado com 330 $\mu\text{L}$  de solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA) e foi incubado por 1 hora, a 65°C e o DNA extraído foi armazenado a -20°C até o seu uso. As concentrações das soluções utilizadas em cada um dos kits não são disponibilizadas pelo fabricante.

### **4.2.2 Extração de DNA mediante sangue total em papel de filtro**

Para a extração do DNA genômico mediante sangue em papel de filtro utilizou-se o kit QIAGEN QIAamp® DNA mini kit (PUREGENE®, Genra Systems, Minneapolis, USA), que apresenta grande eficiência na extração de DNA para esse tipo específico de estocagem de amostra. A extração foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, os círculos de sangue em papel de filtro ( $\pm 30\mu\text{L}$  de sangue/papel ou  $\pm 60\mu\text{L}$  de sangue/papel) foram cortados e colocados em microtubos (Eppendorf) de 1,5mL. Adicionou-se 180 $\mu\text{L}$  de tampão de lise celular ao tubo, que foi incubado a 85°C, por 10 minutos. Foram acrescentados

20µL da solução de proteinase K e a mistura foi homogeneizada por 30s em agitador de tubos (vórtex) e incubadas a 56°C, por uma hora. Foram adicionados 200µL de tampão de lise, os tubos foram homogeneizados novamente por 30s em agitador de tubos e incubados a 70°C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µL de etanol P.A. (4 °C) e o material foi homogeneizado. Posteriormente, todo o material ( $\pm$  500µL de eluato) foi colocado em uma coluna QIAamp spin (agregada ao tubo de coleta de 2mL). Os tubos foram centrifugados a 800 x g, por 1 minuto, a 25°C, em seguida, os tubos contendo o filtrado foram descartados e as colunas foram colocadas em um novo tubo de 2 mL. Foram adicionados 500µL de tampão para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado a 800 x g, por 1 minuto, a 25°C. Em seguida, a coluna foi posta em um novo tubo de 2mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500µL de tampão para uma segunda lavagem do material e cada tubo foi centrifugado a 1500 x g, por 3 minutos, a 25°C. Cada coluna foi colocada em novos microtubos do tipo eppendorf 1,5 mL e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Foram acrescentados 150µL de água destilada para eluir o material, em seguida o material foi incubado a temperatura ambiente, por 1 minuto e centrifugado a 800 x g, por 1 minuto, a 25°C. Finalmente as colunas foram descartadas e o DNA foi armazenado a -20°C até seu uso.

#### **4.3 Papel de Fitro**

Foi utilizado no presente estudo o papel de filtro comum, do tipo xaroposo que apresenta custo bastante reduzido (R\$27,00, pacote com 50 folhas).

#### **4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

##### **4.4.1 Controle das extrações de DNA genômico**

A fim de averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso, as amostras de DNA foram submetidas a uma PCR pra amplificar o sistema ABO (Olsson *et al.*, 1998). A tabela 7 apresenta a relação dos iniciadores utilizados nesta reação.

##### **4.4.2 Nested-PCR**

Amostras de DNA foram amplificadas através da Nested-PCR baseando-se na metodologia descrita por Snounou *et al.*, 1993, com modificações. Este protocolo amplifica regiões gênero e

espécie específicas dentro da subunidade menor do RNA ribossomal, gene 18S. A Nested-PCR amplifica na primeira reação um fragmento de 1200 pb (seqüência gênero-específica) e na segunda reação seqüências espécie-específicas são amplificadas, sendo cada um dos fragmentos e seus iniciadores descritos na tabela 7. As reações foram realizadas em volumes de 20  $\mu$ L utilizando-se: 80 ng de amostra de DNA, 250nM de cada um dos iniciadores, 10  $\mu$ L de Master Mix (PROMEGA-0,3U Taq DNA Polimerase, 200  $\mu$ M de cada um dos dNTPs e 1,5mM MgCl<sub>2</sub>). As amplificações foram realizadas no termociclador PTC-100 Version7.0 - MJ Research e as condições da PCR foram, para a primeira reação: 24 ciclos de 95°C por cinco minutos, 58°C por dois minutos, 72°C por dois minutos e extensão final a 72°C por cinco minutos. A segunda reação foi realizada nas mesmas condições, porém com 29 ciclos. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita em eletroforese em gel contendo 2% de agarose (Invitrogen) dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), sendo adicionados 5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras de DNA foram misturadas em tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarose) e aplicadas em cada uma das canaletas do gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em um sistema horizontal (Bio-Rad) a 100V, por cerca de 40 minutos. O gel foi analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e arquivado em sistema digital.

#### 4.4.3 PCR em Tempo Real

O Protocolo de PCR em Tempo Real utilizado neste trabalho baseou-se no descrito por Mangold *et al.* (2005), com modificações. O protocolo descrito por estes autores se baseia na detecção das quatro espécies de plasmódios humanos, na utilização de apenas um par de iniciadores consenso, desenhado em uma região espécie-específica da subunidade menor do RNA ribossomal, gene 18 S. Tais iniciadores amplificam fragmentos que variam no número de nucleotídeos e esses diferentes tamanhos são analisados e discriminados por meio de curvas de dissociação, que permitem a diferenciação das espécies de plasmódios. As reações foram realizadas em volumes de 20  $\mu$ L, utilizando 200ng de amostra de DNA, 0,5 mM de cada iniciador, 2,5mM de MgSO<sub>4</sub> e 10  $\mu$ L de SYBR Green PCR *master mix* (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As amplificações e a detecção da fluorescência foram conduzidas no ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As condições da PCR foram um ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos em 90°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e

60°C por 30 segundos, acrescido de extensão final. O par de iniciadores e as sequências utilizadas nesta reação estão especificados na Tabela 7.

Para todos os ensaios, a PCR foi realizada utilizando-se controles positivos e negativos nas reações. Como controles negativos foram utilizados amostras de DNA de indivíduos de área livre de transmissão, sabidamente negativos para malária. Como controles positivos foram utilizados: (i) *P. falciparum*, DNA proveniente de cepa de cultivo contínuo mantido no Laboratório de Malária (CPqRR-FIOCRUZ); (ii) para *P. vivax*, DNA de indivíduo com infecção aguda e parasitemia confirmada pela microscopia óptica; (iii) para *P. malariae/P. brasilianum*: DNA de Referência do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária – ATCC, USA).

**Tabela 7.** Sequências de iniciadores e tamanho dos fragmentos amplificados para o gene 18S ssuRNA dos parasitas da malária na Nested-PCR, PCR em Tempo Real e também para genes do sistema ABO.

Alvo	PCR	Iniciadores*	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Tamanho do fragmento
<i>Plasmodium sp.</i>	Nested- 1ª Reação	,PLU5 ,PLU6	5'CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3' 5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG 3'	1200 pb <sup>1</sup>
<i>Plasmodium vivax</i>	Nested- 2ª Reação	,VIV1 ,VIV2	5'CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC3' 5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3'	120 pb
<i>Plasmodium falciparum</i>		,FAL1 ,FAL2	5'TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT3' 5'ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCGTC3'	205 pb
<i>Plasmodium malariae</i>		,MAL1 ,MAL2	5'ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATACCGC 3' 5'AAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA3'	144 pb
<i>Plasmodium sp.</i>	Real Time	Iniciador 1 Iniciador 2	5' TAA CGA ACG AGA TCT TAA 3' 5' GTT CCT CTA AGA AGC TTT 3'	
Sistema ABO	PCR	516 S 96 AS	5' GCTGGAGGTGCGCGCTAC 3' 5' ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTGTGCGTC 3'	419 pb

\* Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993); Real Time PCR (Mangold *et al.*, 2005); ABO PCR (Olsson *et al.*, 1998). 1- pb = pares de bases.

#### 4.4.4 Amplificação do Genoma Total (WGA-Whole Genome Amplification)

Para as amostras de DNA que não amplificaram na reação de Nested-PCR utilizou-se a técnica de amplificação do genoma total. Para isto, utilizou-se o kit GenomiPhi V2 DNA Amplification (GE Healthcare UK Limited – Amersham Place, 2007) (comparação dos protocolos de extração de DNA genômico). Esta amplificação aleatória do DNA genômico é feita por meio de uma PCR que utiliza uma série de pequenos iniciadores inespecíficos, que amplificam, de forma representativa, o genoma total da amostra. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 1µL de DNA em 9µL de tampão de amostra e este material foi submetido a uma temperatura de 95°C durante 3 minutos. Para a reação de amplificação, foram combinados 9µL de tampão de reação com 1µL de enzima a cada amostra, seguida de incubação a 30°C, durante 2 horas e amplificação, a 65°C por 10 minutos. Finalmente, o material foi armazenado e mantido à temperatura de -20 °C até o seu uso.

#### 4.5 Análises Estatísticas

Para avaliar a diferença entre as técnicas de PCR utilizadas, bem como entre as diferentes parasitemias detectadas pela microscopia óptica, foi aplicado o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Este teste é usado para comparar proporções e leva em consideração a magnitude da diferença entre cada par. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significantes. A concordância entre os diferentes protocolos da PCR e a microscopia óptica foi avaliada por meio do coeficiente estatístico Kappa (  $\kappa$  ). O coeficiente  $\kappa$  estabelece o grau de concordância em escalas nominais, o que fornece uma idéia do quanto as observações se afastam daquelas esperadas, fruto do acaso. Este coeficiente foi calculado a partir da concordância observada ( $P_o$ ) diminuída da concordância esperada ( $P_e$ ), dividido por 1 menos a concordância esperada.

A validação dos diagnósticos moleculares foi feita a partir dos cálculos dos índices estatísticos de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade é a probabilidade de um teste ser positivo na presença da doença, isto é, avalia a capacidade de um teste detectar a doença quando ela está presente. A especificidade é a probabilidade de um teste ser negativo na ausência da doença, ou seja, avalia a capacidade de um teste afastar a doença quando ela é ausente, como se sugere. A microscopia óptica foi utilizada como padrão-ouro na validação dos testes moleculares. Os valores observados para sensibilidade e especificidade são compatíveis com um faixa de valores, onde quanto mais próximo de 1 maior será a sensibilidade ou a especificidade (vide esquema abaixo). O pacote estatístico Stat 8.0 foi utilizado em todas as análises.

		DOENÇA		Total
		PRESENTE	AUSENTE	
TESTE	POS	a verdadeiro positivo	b falso positivo	a + b
	NEG	c falso negativo	d verdadeiro negativo	c + d
Total		a + c	b + d	a + b + c + d

<p>Sensibilidade = <math>a / (a + c)</math></p> <p>Especificidade = <math>d / (b + d)</math></p>
--



## 5 Resultados

### 5.1 Desempenho da Nested-PCR versus PCR em Tempo Real

Duas técnicas moleculares, a Nested-PCR e a PCR em Tempo Real, foram comparadas, a fim de seleccionar a mais viável para a aplicação e validação em Serviços de Saúde do Estado de Minas Gerais. Para tal, foram utilizadas 94 amostras da região endêmica, das quais 74 eram positivas para malária e 20 negativas, conforme diagnóstico realizado pela microscopia óptica (Tabela 8). Para as técnicas de PCR, os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas moleculares testadas, sendo o índice Kappa de concordância de 0.97. Com relação às espécies de plasmódios diagnosticadas pela MO, também houve concordância entre os protocolos moleculares (dados não mostrados). Dessa forma, é possível concluir que as duas técnicas apresentaram igual desempenho. Porém, pode-se observar que tanto a Nested-PCR quanto a PCR em Tempo Real apresentaram limitações para detectar baixas parasitemias. Do total de 22 amostras positivas na MO, que apresentaram parasitemias menores que 100 parasitas/ $\mu$ L de sangue, seis (27%) não amplificaram em nenhum dos protocolos de PCR avaliados.

**Tabela 8** - Desempenho da Nested-PCR e PCR em Tempo Real, comparadas a Microscopia Óptica (MO), de acordo com a densidade parasitária.

Amostras	MO	PCR (%)	
	Parasitas/ $\mu$ L (n) <sup>*</sup>	Nested PCR <sup>**</sup>	PCR em Tempo Real <sup>**</sup>
Positivas	>1000 (20)	20 (100)	20 (100)
	301-1000 (16)	16 (100)	16 (100)
	101-300 (16)	16 (100)	15 (93.8)
	1-100 (22)	16 (72.0)	16 (72.0)
Total	1->1000 (74)	68 (92)	67 (91)
Negativas	0 (20)	0 (0)	0 (0)

<sup>\*</sup> Parasitas/ $\mu$ L de sangue detectados pela Microscopia Óptica.

<sup>\*\*</sup> Não houve diferença entre as técnicas de PCR ( $p > 0.05$ ).

Os dados obtidos permitiram ainda calcular os índices estatísticos de validade e concordância das reações de Nested-PCR e PCR em Tempo Real, em relação à microscopia óptica (MO). Para tal, índices de sensibilidade, especificidade e concordância Kappa foram calculados para cada faixa de parasitemia. Na tabela 9 pode-se observar que a sensibilidade e especificidade para as técnicas moleculares frente a MO foram de 100% nas parasitemias acima de 100 parasitas/ $\mu$ L de sangue. Porém, nas parasitemias abaixo dessa faixa, essas técnicas apresentaram menores índices de sensibilidade. Resultados semelhantes foram obtidos com o índice de concordância kappa, cujos valores oscilam de 1.0 ( $>100$  parasitas/ $\mu$ L de sangue) a 0.72 ( $<100$  parasitas/ $\mu$ L de sangue). Contudo, as diferenças encontradas não foram estatisticamente significativas ( $p>0.05$ ).

**Tabela 9** - Sensibilidade e especificidade de duas técnicas moleculares tendo a Microscopia Óptica como padrão ouro, em diferentes parasitemias.

Método Molecular		Parasitas/ $\mu$ L de sangue (n)			
		0-100 (22)	101-300 (16)	301-1000 (16)	$>1000$ (20)
Nested	Sensibilidade*	0.73	1.0	1.0	1.0
	Especificidade	1.0	1.0	1.0	1.0
	Kappa	0.72	1.0	1.0	1.0
Real Time	Sensibilidade	0.73	0.94	1.0	1.0
	Especificidade	1.0	1.0	1.0	1.0
	Kappa	0.72	0.94	1.0	1.0

\* Não houve diferença estatisticamente significativa entre as faixas de densidade parasitária ( $p=0.18$ ), para sensibilidade, especificidade e índice kappa.

## 5.2 Desempenho da Nested-PCR em amostras de sangue extraídas de sangue total e estocadas em papel de filtro

Uma vez que a técnica de Nested-PCR teve desempenho semelhante ao PCR em Tempo Real, optou-se por utilizar apenas a Nested-PCR para avaliar o desempenho da PCR nos diferentes métodos de extração sanguínea. Para tal, foram utilizadas 70 amostras da área endêmica, sendo 54 positivas e 16 negativas pela microscopia óptica (Tabela 3). As extrações mediante sangue total e papel de filtro foram comparadas, sendo que para as extrações a partir de papel de filtro utilizaram-se volumes de aproximadamente 30 e 60 $\mu$ L de sangue (Tabela 10). Pode-se observar que houve concordância entre os métodos de extração testados na reação de

Nested-PCR ( $\kappa=1$ , dados não mostrados), bem como elevada concordância dos métodos moleculares frente a microscopia óptica,  $\kappa$  igual a 0.85 ( $\leq 100$  parasitas/ $\mu\text{L}$ ) e 0.86 (101-300 parasitas/ $\mu\text{L}$ ). No entanto, a Nested-PCR deixou de amplificar 3 amostras que apresentaram parasitemias  $\leq 300$  parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue. Apesar da reação de PCR ter sido específica, não amplificando amostras negativas, a sensibilidade foi maior para a faixa  $>300$  parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue (Tabela 11). Como a PCR não amplificou algumas amostras positivas na MO, utilizou-se a técnica de amplificação do DNA genômico total (WGA), cujo produto amplificado foi submetido novamente a PCR parasito-específica. Entretanto, a pré-amplificação do DNA molde não resultou em ganho na sensibilidade, já que de 9 amostras amplificadas por WGA (3 amostras por paciente), apenas uma foi positiva para malária (dados não mostrados).

**Tabela 10** - Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária na Nested-PCR e na Microscopia Óptica (MO), mediante três protocolos de extração de DNA genômico.

Amostras	MO Parasitas/ $\mu\text{L}$ (n)*	PCR em diferentes métodos de extração (%)		
		Sangue Total	Sangue Total em Papel de Filtro	
			30 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$
<b>Positivas</b>	>3000 (16)	16 (100)	16 (100)	16 (100)
	3000-1001 (13)	13 (100)	13 (100)	13 (100)
	1000-301 (6)	6 (100)	6 (100)	6 (100)
	300-101 (14)	12 (86)	12 (86)	12 (86)
	1-100 (5)	4 (80)	4 (80)	4 (80)
<b>Total</b>	1->3000 (54)	51 (96)	51 (96)	51 (96)
<b>Negativas</b>	0 (16)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

\* Parasitas/ $\mu\text{L}$  de sangue detectados pela Microscopia Óptica.

**Tabela 11** - Sensibilidade, especificidade e concordância kappa de diferentes métodos de extração de DNA, sangue versus papel de filtro, em diferentes densidades parasitárias.

Método de Extração		Parasitas/ $\mu$ L de sangue (n)				
		0-100 (5)	101-300 (14)	301-1000 (6)	1001-3000 (13)	>3000 (16)
Sangue	Sensibilidade*	0.94	0.88	1	1	1
	Especificidade	1	1	1	1	1
	Kappa	0.85	0.86	1	1	1
Papel de Filtro	Sensibilidade	0.94	0.88	1	1	1
	Especificidade	1	1	1	1	1
	Kappa	0.85	0.86	1	1	1

\* O teste Wilcoxon foi feito para comparar a sensibilidade e a especificidade entre as diferentes parasitemias ( $p=0.18$ ).

A positividade por espécie parasitária de cada uma das amostras desta etapa do estudo foi representada na Tabela 12. Foram caracterizadas 8 infecções por *P. falciparum*, 42 pelo *P. vivax*, sendo que uma infecção mista (Pf/Pv) foi detectada apenas pelo diagnóstico molecular.

**Tabela 12** - Positividade por espécie parasitária nos protocolos de Nested-PCR e Microscopia Óptica (MO).

Parasitemia <sup>1</sup>	Espécie parasitária (MO - n)	Espécie parasitária (PCR)		
		Sangue	Papel de Filtro	
			30 $\mu$ L	60 $\mu$ L
>3000	<i>P. falciparum</i> (1)	1	1	1
	<i>P. vivax</i> (15)	15	15	15
1001-3000	<i>P. falciparum</i> (3)	3	3	3
	<i>P. vivax</i> (10)	9	9	9
	Mista <sup>2</sup> (0)	1	1	1
301-1000	<i>P. falciparum</i> (1)	1	1	1
	<i>P. vivax</i> (5)	5	5	5
101-300	<i>P. falciparum</i> (3)	3	3	3
	<i>P. vivax</i> (9)	9	9	9
1-100	<i>P. falciparum</i>			
	<i>P. vivax</i> (4)	4	4	4

<sup>1</sup> Parasitas/ $\mu$ L de sangue detectados pela Microscopia Óptica; <sup>2</sup> Infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax*.

### 5.3 Avaliação da Nested-PCR nos Serviços de Saúde do Estado de Minas Gerais com referência para o diagnóstico laboratorial de malária

Uma vez que a extração do DNA a partir de sangue total e em papel de filtro tiveram igual desempenho pela Nested-PCR, escolheu-se, devido a simplicidade da coleta, a extração apenas com amostras de sangue em papel de filtro para o uso nos serviços de saúde. Para isto, a PCR foi utilizada em paralelo à MO em Serviços de Referência para o diagnóstico de malária das cidades de Uberlândia e Belo Horizonte, de fevereiro a novembro de 2009. De 70 indivíduos que procuram os serviços de saúde no período do estudo, 22 (31.4%) foram diagnosticados pela microscopia com infecção malárica e 48 (68.6%) não apresentaram infecção (Tabela 4). Por outro lado, a PCR identificou os mesmos indivíduos com malária aguda, sendo que a positividade das amostras coletadas, em função da parasitemia, está representada na tabela 13. Pode-se observar que a concordância entre a MO e a PCR foi de 100%.

**Tabela 13** - Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para malária na Nested-PCR e na Microscopia Óptica nas amostras de sangue dos indivíduos suspeitos para infecção malárica dos Serviços de Saúde de Minas Gerais, no período de fevereiro a novembro de 2009.

Amostras	MO	PCR
	Parasitemia <sup>1</sup> (n)	Positividade(%)
Positivas	> 300 (16)	16 (100)
	300-101 (4)	4 (100)
	100-1 (2)	2 (100)
Total	1->300 (22)	22 (100)
Negativas <sup>2</sup>	0 (48)	0 (0)

<sup>1</sup> Parasitas/ $\mu$ m de sangue detectados pela Microscopia Óptica. <sup>2</sup> Pacientes negativos na MO, mas suspeitos por apresentarem histórico e sintomatologia característicos de malária.

Os resultados demonstraram que houve total concordância entre as espécies detectadas pela Nested-PCR. Cada uma das espécies diagnosticadas em função da parasitemia, detectada na MO dentre os indivíduos positivos que procuraram os serviços de saúde em 2009 está representada na Tabela 14.

**Tabela 14** - Positividade por espécie parasitária nos protocolos de Nested-PCR e Microscopia Óptica (MO), indivíduos suspeitos para infecção malárica dos Serviços de Saúde de Minas Gerais, fevereiro a novembro de 2009.

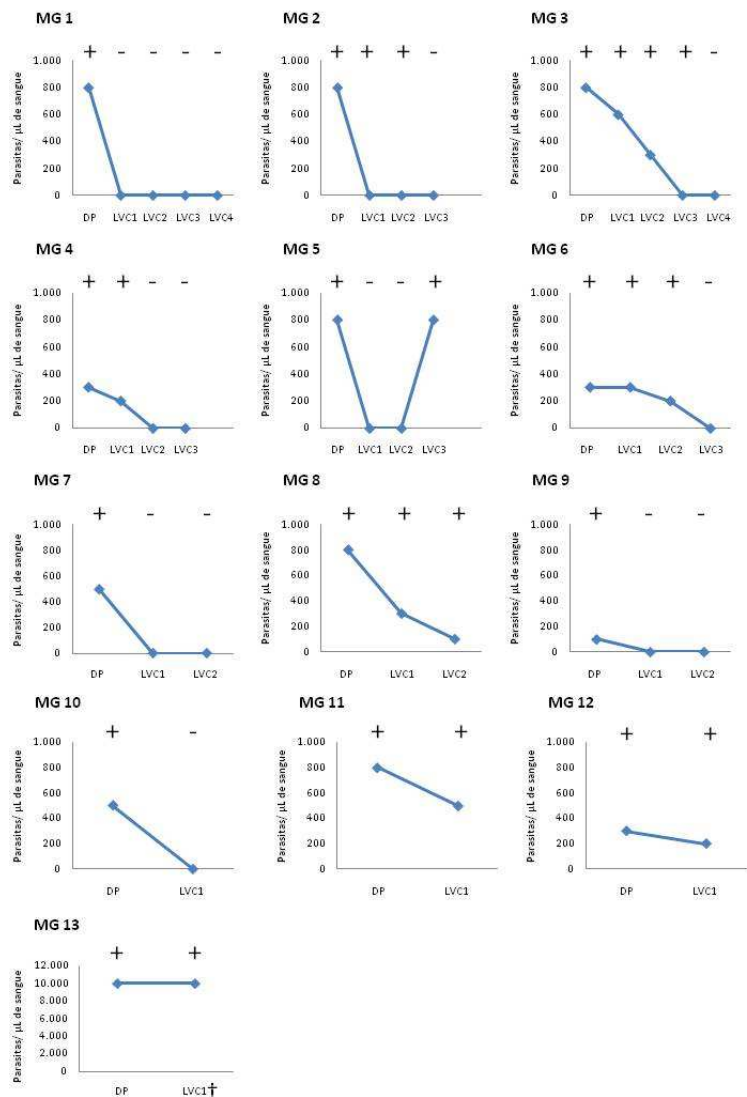
Parasitemia <sup>1</sup>	Espécie parasitária (MO - n)	Espécie parasitária (PCR)
>300	<i>P. falciparum</i> (5)	5
	<i>P. vivax</i> (9)	9
	Mista <sup>2</sup> (2)	2
101-300	<i>P. falciparum</i> (2)	2
	<i>P. vivax</i> (2)	2
1-100	<i>P. falciparum</i> (1)	1
	<i>P. vivax</i> (1)	1

<sup>1</sup> Parasitas/μl de sangue detectados pela microscopia óptica (MO).

<sup>2</sup> Infecção mista por *P. falciparum* e *P. vivax*.

### 5.3.1 Avaliação da Nested-PCR para o acompanhamento de cura de pacientes com malária humana

Durante os dez meses de coleta nos Serviços de Saúde, 22 pacientes foram diagnosticados com malária aguda pela microscopia (Tabela 4). Destes, 13 retornaram aos serviços para verificação de cura parasitológica. Para esses pacientes, também foram coletadas amostras de sangue em papel de filtro para avaliar como a Nested-PCR se comportaria no acompanhamento de cura. Foram confeccionadas 30 lâminas de verificação de cura (LVC), sendo 11 positivas para malária e 19 negativas. Os gráficos representados na Figura 3 mostram os resultados individuais da Nested-PCR e da MO. A Nested-PCR foi capaz de detectar todos os pacientes positivos pela microscopia óptica (MO), concordando com a avaliação realizada pela MO. No entanto, os pacientes MG 2 e MG 3 continuaram positivos pela PCR enquanto a MO já havia negativado.



**Figura 3 - Acompanhamento de cura pela Microscopia Óptica(MO) e Nested-PCR, de pacientes diagnosticados como positivos para malária nos Serviços de Saúde de Minas Gerais (n=13).** Em cada gráfico foi representada a parasitemia detectada pela MO. Os sinais positivos (+) e negativos (-) no topo de cada gráfico correspondem a positividade ou negatividade pela Nested-PCR. Os indivíduos foram codificados como MG 1 a MG 13. DP= demanda passiva, correspondente ao primeiro dia de tratamento para malária. LVC= Lâmina de Verificação de Cura. LVC 1 a 4 correspondem a mediana do tempo de acompanhamento: 3 dias (LVC1), 16 dias (LVC2), 26 dias (LVC3) e 45 dias (LVC4). † = óbito.

## 6 Discussão

### 6.1 Desempenho da Nested-PCR e PCR em Tempo Real em função da parasitemia

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada para fins de pesquisa em malária, particularmente para identificar infecções assintomáticas (Gama *et al.*, 2007; Tada *et al.*, 2007; Marangi *et al.*, 2009), infecções mistas (Shokoples *et al.*, 2009) e espécies morfológicamente similares na microscopia, como é o caso de *P. malariae* e *P. vivax* (Scopel *et al.*, 2004; Veron, Simon & Carme, 2009; Rahman *et al.*, 2010). Para detectar diferentes espécies de plasmódios, uma variedade de protocolos de PCR altamente específicos tem sido publicada, sendo mais utilizados aqueles baseados na detecção de sequências gênero e espécie específicas, dentro da região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal (Lal, 1989; Snounou *et al.*, 1993; Das *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1998). Embora no Brasil a reação de PCR para o diagnóstico de malária tenha sido amplamente utilizada para fins de pesquisa (Zalis *et al.*, 1996; Cavasini *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2002; Di Santi *et al.*, 2004; Scopel *et al.*, 2004a), poucas publicações tem enfatizado o problema da sensibilidade da reação frente aos diferentes protocolos de PCR ou a variação de densidade parasitária de amostras de campo. Estes dados são de fundamental importância uma vez que a sensibilidade da PCR pode ser altamente variável dependendo não só do protocolo, mas também da população a ser diagnosticada (Berry *et al.*, 2005; Jelinek *et al.*, 2007)

No presente trabalho, otimizou-se um protocolo de PCR para ser validado como diagnóstico auxiliar de malária em Serviços de Saúde de Minas Gerais. Para tal, dois protocolos de PCR foram inicialmente comparados. Os protocolos selecionados foram a Nested-PCR e a PCR em Tempo real, baseados na amplificação do gene 18 S (SSU rRNA). Para a Nested-PCR optou-se por otimizar o protocolo baseado em Snounou e colaboradores (1993) e para a PCR em Tempo Real utilizou-se o protocolo descrito por Mangold *et al.* (2005), onde um único par de iniciadores permite diferenciar as espécies de plasmódios que infectam o homem. A abordagem metodológica inicial incluiu avaliar o desempenho destes protocolos frente a um painel de amostras de campo, cujas parasitemias detectadas pela microscopia óptica variaram de 0 a >1000 parasitas/ $\mu$ L de sangue.

Os resultados permitiram concluir que tanto a Nested-PCR quanto a PCR em Tempo Real tiveram igual desempenho, não sendo detectada diferença estatisticamente significativa de sensibilidade e especificidade entre as técnicas testadas. Resultados semelhantes foram



encontrados por Shokoples *et al.* (2009), em um estudo realizado em laboratórios regionais de Alberta (Canadá), e por Perandin *et al.* (2004), em um estudo conduzido em serviços de saúde da Itália. Em ambos os estudos, foi demonstrado uma concordância de 100% entre a Nested-PCR e a PCR em Tempo Real. Além disso, as técnicas moleculares foram capazes de detectar infecções mistas não detectadas pela MO. Portanto, os resultados aqui apresentados concordam com aqueles descritos na literatura e confirmam o desempenho similar em nossas condições, entre as técnicas de Nested-PCR e PCR em Tempo Real.

Apesar da concordância entre as técnicas moleculares, a sensibilidade das mesmas foi inferior a da MO, quando as parasitemias foram menores que 300 parasitas/ $\mu$ L de sangue. Existe a possibilidade dos resultados positivos na MO serem falso-positivos, entretanto, este não parece ser o caso, já que os microscopistas que avaliaram as lâminas possuíam uma experiência média de 20 anos no diagnóstico microscópico de malária humana. Portanto, considerou-se os resultados negativos na PCR como falso-negativos.

A princípio, os resultados aqui encontrados, de baixa sensibilidade da PCR, parecem discordar da literatura, já que a maior parte dos estudos relata protocolos de PCR com limite de detecção menor que 1 parasita/ $\mu$ L de sangue (Perandin *et al.*, 2004; Veron, Simon & Carme, 2009). Porém, a maior parte dos estudos publicados avaliou a sensibilidade das técnicas moleculares por meio de curvas de titulação a partir de sangue de cultivo de *P. falciparum* e/ou plasmídeos contendo o gene 18 S. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Gama e colaboradores (2007), onde os autores descreveram um protocolo de PCR em Tempo Real capaz de detectar baixas cargas parasitárias (até 0.5 parasita/ $\mu$ L de sangue). No entanto, os autores utilizaram 33 amostras de pacientes de área endêmica sem descrição da carga parasitária e todas as curvas de quantificação foram feitas a partir de sangue de cultivo. De fato, na nossa experiência, DNA proveniente de cultivo e/ou DNA de plasmidial funcionam excepcionalmente bem na PCR, sendo capaz de detectar produtos correspondentes a <1 parasita/ $\mu$ L de sangue (Cardoso & Madureira, dados não publicados). Ainda na experiência do grupo, a PCR a partir de diluição de sangue de pacientes com altas parasitemias também permite inferir sobre uma positividade <5 parasitas/ $\mu$ L de sangue, limite de detecção da MO. Portanto, no presente trabalho, optou-se por utilizar amostras de campo com parasitemias variando de 0 a >1000 parasitas/ $\mu$ L de sangue.

Poucos tem sido os trabalhos que avaliaram comparativamente o desempenho da PCR em função da densidade parasitária. De fato, Singh *et al.* (1996) relataram uma baixa sensibilidade da

Nested-PCR em baixas parasitemias, sendo que 2 amostras com parasitemia menor que 50 parasitas/ $\mu$ L de sangue não foram amplificadas pelo diagnóstico molecular. O achado mais significativo foi observado por Coleman e colaboradores (2006), na Tailândia. Estes autores observaram que a Nested-PCR, em parasitemias menores que 100 parasitas/ $\mu$ L de sangue foi capaz de detectar apenas 20% das infecções maláricas confirmadas pela MO, resultando com isso em um número considerável de resultados falso-negativos. Esses trabalhos reforçam os resultados aqui obtidos, onde as baixas parasitemias das amostras de campo podem ser um fator limitante para a sensibilidade da PCR.

## **6.2 Desempenho da Nested-PCR a partir de amostras de sangue coletadas em sangue total e em papel de filtro**

A estocagem e o transporte das amostras de sangue de remotas regiões endêmicas para os laboratórios centrais têm sido um problema para muitos estudos epidemiológicos de malária, particularmente os que utilizam a extração de DNA para os ensaios de PCR. A fim de suprir esta limitação, diversos autores têm buscado protocolos alternativos para preservar o DNA/RNA. Exemplos disso são as extrações de sangue a partir da lâmina de microscopia e também a partir de amostras de sangue em papel de filtro (Singh *et al.*, 1996; Chaorattanakawee *et al.*, 2003; Bereczky *et al.*, 2007; Mangold *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2006; Menge *et al.*, 2008; Khaminsou *et al.*, 2008), incluindo no Brasil (Scopel *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008). Devido a praticidade da extração pelo papel de filtro, optou-se aqui por otimizar uma reação de PCR utilizando-se amostras de sangue coletadas em papel de filtro, o que poderia viabilizar o estudo de validação da PCR no serviço de referência de MG.

Para avaliar o desempenho da PCR a partir da extração de sangue total ou em papel de filtro, escolheu-se a Nested-PCR. Os motivos da escolha da Nested-PCR em relação ao PCR em Tempo Real foram: (i) desempenho igual entre as técnicas, (ii) no Brasil, o uso da PCR em Tempo Real para malária é ainda restrito, (iii) custo mais elevado do PCR em Tempo Real.

Os resultados aqui obtidos mostraram que a Nested-PCR a partir de amostras extraídas em papel de filtro foi tão eficiente (coeficiente kappa=1) quanto a extração mediante sangue total (Tabela 11). Além disso, não houve diferença de sensibilidade utilizando-se diferentes volumes de sangue, sendo que a PCR detectou, com igual sensibilidade, volumes de 30 ou 60 $\mu$ L de sangue (Tabela 12). Atribui-se o sucesso da extração a partir de papel de filtro a um kit de extração específico para amostras em papel de filtro.

Outra vantagem da técnica aqui validada foi em relação ao tipo de papel de filtro. Foi utilizado o papel de filtro xaroposo que apresenta custo bastante reduzido (R\$27,00, pacote com 50 folhas). Em contrapartida, um pacote de cem círculos do papel de filtro FTA Classic Cards (Whatman, England) custa aproximadamente R\$1.305,00. Apesar disso, em um experimento preliminar, foram realizadas curvas de diluição seriada a partir de DNA de cultivo de *P. falciparum*, variando de 0.1 a 10000 parasitas/ $\mu$ L, onde foi possível demonstrar sensibilidade similar entre os papéis de filtro comum e Whatman (dados não mostrados).

Os resultados deste trabalho são importantes, pois otimizar uma técnica de PCR a partir de amostras de sangue coletadas em papel de filtro é de grande aplicabilidade para pesquisas epidemiológicas. A aplicabilidade dos resultados obtidos é particularmente importante para nosso grupo de pesquisa, que realiza diversos trabalhos na área endêmica do país e tem enfrentado problemas em relação à estocagem e transporte das amostras de sangue.

Como era de se esperar, apesar da validação das amostras em papel de filtro ter sido otimizada com sucesso, também houve menor sensibilidade da técnica para baixas parasitemias. A Nested-PCR não foi capaz de detectar 3 amostras positivas na MO, todas elas abaixo de 300 parasitas/ $\mu$ L de sangue (Tabela 10). Em contrapartida, a PCR foi capaz de detectar uma infecção mista em todos os protocolos de extração, que não fora detectada pela microscopia óptica (Tabela 12). De fato, uma grande vantagem da PCR é a detecção de infecções mistas, como já descrito por outros autores (Perandin *et al.*, 2004; Graffeo *et al.*, 2008 e Shokoples *et al.*, 2009) e inclusive no Brasil (Costa *et al.*, 2008)

### **6.3 Avaliação da Nested-PCR em Serviços de Saúde de Referência de Minas Gerais**

A técnica de PCR foi utilizada como ferramenta auxiliar em Serviços de Saúde de Minas Gerais, referência para o diagnóstico laboratorial de malária. Tal ferramenta foi utilizada para o diagnóstico de infecção malárica, bem como no acompanhamento de cura dos indivíduos. Os resultados demonstraram uma concordância total entre os resultados obtidos pela PCR com relação a MO, inclusive no que se refere à espécie de plasmódio envolvida na infecção. Devido à característica peculiar deste grupo de pacientes, as baixas parasitemias não foram frequentes. De fato, entre os indivíduos positivos pela MO (n=22), mais de 70% apresentaram parasitemias acima de 300 parasitas/ $\mu$ L de sangue. Isto ocorreu porque estes indivíduos se infectaram nas áreas endêmicas e procuram tardiamente os serviços de saúde de Minas Gerais (área não

endêmica). Concordando com esta hipótese, o período médio desde o início dos sintomas até o diagnóstico destes pacientes foi de 13 dias, sendo que em alguns o diagnóstico foi realizado 3 ou 6 meses após o início dos sintomas. Consequentemente, dois pacientes infectados por *P. falciparum* evoluíram para óbito, sendo que em um deles o diagnóstico foi “post-mortem”. Felizmente, a espécie predominante deste grupo foi o *P. vivax*, que é menos patogênica que o *P. falciparum*, evitando, dessa forma, outras mortes.

A letalidade observada no decorrer do estudo (2/22) reforça a importância da malária importada na região extra-amazônica, cuja letalidade continua superior a da região Amazônica. Como exemplo, a letalidade da malária em Minas Gerais no ano de 2006 foi de 0.7, enquanto na região Amazônica foi de 0.02 (SINAN, 2009). A inexperiência dos profissionais da saúde de áreas não endêmicas, que geralmente não incluem suspeita clínica de malária em casos febris de etiologia desconhecida, deve ser levada em consideração nas medidas do Programa de Controle da malária no Brasil.

Dos 22 indivíduos diagnosticados com malária, 13 retornaram para o acompanhamento de cura (Tabela 6). Em 11(85%) foi observada concordância da PCR em relação à microscopia óptica. No entanto, em dois pacientes (MG2 e MG3) a PCR permaneceu positiva enquanto a MO já havia negativado (Figura 3). Como esses pacientes foram considerados curados da infecção malárica, considerou-se que a MO detectou a cura precocemente. De fato, o resultado de uma PCR positiva ainda é questionado, pois a detecção de DNA do parasito não necessariamente significa DNA viável. Na comunidade científica, o significado de uma PCR positiva tem sido assunto de debate e, recentemente, em um encontro realizado no Brasil sobre malária assintomática, não se chegou a um consenso (44º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Porto Alegre, 4 a 7 de março de 2008). Portanto, apesar da Nested-PCR ter sido validada nos serviços de saúde de Minas Gerais, fazem-se necessários estudos multicêntricos futuros para avaliar o significado de uma PCR positiva, tanto do ponto de vista do indivíduo, da comunidade (controle) e dos hemocentros.

## **7 Conclusões**

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

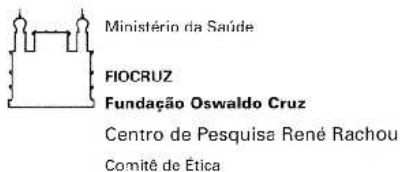
O desempenho da Nested-PCR é similar ao da PCR em Tempo Real;

Em amostras de campo, a sensibilidade das técnicas de PCR está diretamente relacionada à densidade parasitária;

A PCR realizada com DNA extraído de sangue total estocado em papel de filtro é adequada aos trabalhos de campo, sendo a técnica de escolha pela simplicidade de armazenamento e facilidade de transporte das amostras;

A PCR teve igual desempenho frente a Microscopia Óptica nos Serviços de Saúde de Minas Gerais, entretanto, a MO parece ser mais viável para o acompanhamento de cura.

## 8 Anexo: Carta de Aceite do Comitê de Ética



### CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2009 – CEP/SH-CPqRR

Protocolo CEP - CPqRR nº: 24/2008

**Projeto de Pesquisa:** "Padronização e Validação da Nested e Real Time PCR para o diagnóstico de malária humana a partir de amostras extraídas em papel de filtro"

**Pesquisador Responsável:** Lúzia Helena Carvalho

**Instituição:** Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

**Data de entrada no CEP:** 24/10/2008

**CAAE:** 0021.0.245.000-06 / Grupo III

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, constatou-se que o projeto atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto, bem como do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação: **PROJETO APROVADO**

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

- Parcial: Novembro 2009;

- Final: Julho 2010.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 12 de Janeiro de 2009.

  
João Carlos Pinto Dias  
Coordenador do CEP/SH-CPqRR  
DRA. LÚZIA HELENA CARVALHO  
Vice-coordenadora  
Comitê de Ética - CPqRR/FIOCRUZ

Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto - 30190-000, Belo Horizonte - MG - Brasil  
Tel.: 051 3295 3666 (canal 181) Fax: 051 3295 3115 <http://www.cqrr.fiocruz.br>

## 9 Referências Bibliográficas

- Alves, F. P., R. R. Durlacher, M. J. Menezes, H. Krieger, L. H. Silva, and E. P. Camargo. (2002). High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations: Am J Trop Med Hyg, 66, 641-8.
- Amino, R., Thiberge, S., Martin, B., Celli, S., Shorte, S., Frischknecht, F., Ménard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. Nat Med, 12, 220-224.
- Ávila, S. L. M. & Ferreira, A. W. (1996). Malaria diagnosis: a review. Braz J Med Biol Res, 29, 431-443.
- Barillas-Mury, C., Wizel, B. & Han, Y. S. (2000). Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. Mol Biol, 30, 429-442.
- Barker, R. H.Jr., Banchongaksorn, T., Courval, J. M., Suwonkerd, W., Rimwungtragoon, K., Wirth, D. F. (1994). *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. Exp Parasitol, 79, 41-49.
- Baton, L. A. & Ranford-Cartwright, L. C. (2004). *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut pithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. Parasitol, 129, 663-676.
- Berezcky S, Liljander A, Rooth I, Faraja L, Granath F, Montgomery SM, Färnert A. (2007). Multiclonal asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections predict a reduced risk of malaria disease in a Tanzanian population. Microbes Infect, 9, 103-110.
- Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. (2005). Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. Med Trop, 65, 176-183.
- Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de terapêutica da malária. Brasília: MS, 2001. 104 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Terapêutica da Malária. 6. ed. Brasília: FUNASA, 2001.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre? Cuidado Pode ser malária. Brasília: MS, 2003. 24 p.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Malária: PNCM. 2. ed. Brasília: MS/SVS, 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6. ed. Brasília: MS/SVS, 2005. 816 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica. Brasília: MS/SVS, 2006. 52p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: MS/SVS, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. SINAN. Brasília: MS, s.d. Disponível em: < [www.portal.saude.gov.br/casos\\_conf\\_malaria](http://www.portal.saude.gov.br/casos_conf_malaria) > Acesso em: 18 dez. 2009.

Bronner, U., P. C. Divis, A. Farnert & B. Singh (2009) Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. Malar J, 8, 15.

Buss, P. M. (2007). Globalization, poverty and health. Ciênc. saúde coletiva, 12, 1575-89.

Castro, M. C. & Singer, B. H. (2007). Meio ambiente e saúde: metodologia para análise espacial da ocorrência de malária em projetos de assentamento. Rev Bras Estud Popul, 24, 247-262

Cavasini, M. T., W. L. Ribeiro, F. Kawamoto, and M. U. Ferreira, 2000, How prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, western Brazilian Amazon?: Rev Soc Bras Med Trop, 33, 489-92.

Center of Disease Control. (2009). Simian Malarian in a USA traveler - New York, 2008. CDC, 58, 229-232.

Chaorattanakawee S, Natalang O, Hananantachai H, Nacher M, Brockman A, Krudsood S, Looareesuwan S, Patarapotikul J. (2003). Storage duration and polymerase chain reaction detection of *Plasmodium falciparum* from blood spots on filter paper. Am J Trop Med Hyg, 69, 42-44.

Chaves, K., J. Zumpano, M. Resende, F. J. Pimenta & M. Rocha. (1995). Malaria in the state of Minas Gerais, Brazil, 1980-1992. Cad Saude Publica, 11, 621-3.

Chen JH, Lu F, Lim CS, Kim JY, Ahn HJ, Suh IB, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J, Han ET. (2010). Detection of *Plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Acta Trop, 113, 61-65.

Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, Rachapaew N, Zollner G, Miller RS, Vaughan JA, Thimasarn K, Khuntirat B. (2006). Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. Malar J, 14, 1-7.

Collins, W. E. & G. M. Jeffery (2005). *Plasmodium ovale*: parasite and disease. Clin Microbiol Rev, 18, 570-81.

Costa MR, Vieira PP, Ferreira Cde O, Lacerda MV, Alecrim WD, Alecrim MG. (2008). Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. Rev Soc Bras Med Trop, 41, 381-385.



- Das A, Holloway B, Collins WE, Shama VP, Ghosh SK, Sinha S, Hasnain SE, Talwar GP, Lal AA. (1995). Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. *Mol Cell Probes*, 9, 161-165.
- Di Santi, S. M., Kirchgatter, K., Brunialti, K. C., Oliveira, A. M., Ferreira, S. R., Boulos, M. (2004). PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 46, 183-187.
- Eede, P.V., Van, H. N., Overmeir, C., Vythilingam, I., Duc, T.N., Hung, X., Manh, H. N., Anné, J., D'alessandro, U., Erhart, A. Human (2009). *Plasmodium knowlesi* infection in young children in central Vietnam. *Malar J*, 8, 249.
- Erdman, L. K., & Kain, K. C. (2008). Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med Infect Dis*, 6, 82-99.
- Galinski, M. R. & J. W. Barnwell (2009). Monkey malaria kills four humans. *Trends Parasitol*, 25, 200-4.
- Gama BE, Silva-Pires Fdo E, Lopes MN, Cardoso MA, Britto C, Torres KL, de Mendonça Lima L, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz Mde F. (2007). Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol*, 116, 427-432.
- Graffeo R, Masucci L, Bugli F, Damiano F, Pinnetti C, Federico G, Fadda G. (2008). Multiple malaria infection in a pregnant woman from Nigeria: detection by multiplex PCR. *New Microbiol*, 31, 565-567.
- Greenwood, B. & T. Mutabingwa (2002). Malaria in 2002. *Nature*, 415, 670-2.
- Greenwood, B. M., K. Bojang, C. J. Whitty & G. A. Targett (2005). Malaria. *Lancet*, 365, 1487-98.
- Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F. H., Duffy, P. E. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest*, 118, 1266-1276.
- Gupta, L, Kumar, S., Han, Y. S., Pimenta, P. F., Barillas-Mury, C. (2005). Midgut epithelial responses of different mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11, 4010-4015.
- Hall, N., M. Karras, J. D. Raine, J. M. Carlton, T. W. Kooij, M. Berriman, L. Florens, C. S. Janssen, A. Pain, G. K. Christophides, K. James, K. Rutherford, B. Harris, D. Harris, C. Churcher, M. A. Quail, D. Ormond, J. Doggett, H. E. Trueman, J. Mendoza, S. L. Bidwell, M. A. Rajandream, D. J. Carucci, J. R. Yates, 3rd, F. C. Kafatos, C. J. Janse, B. Barrell, C. M. Turner, A. P. Waters & R. E. Sinden (2005). A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science*, 307, 82-6.

- Hänscheid, T. & Grobusch, MP. (2002). How useful is PCR in the diagnosis of malaria? Trends Parasitol, 9, 395-398.
- Hänscheid, T. (1999). Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clin Lab Haematol, 4, 235-245.
- Hay, S.I, Guerra, C.A, Gething, P.W., Patil, A.P., Tatem, A.M.N, Kabaria, C.W., Manh, B.H., Elyazar, R.F., Brooker, S., Smith, D.L., Moyeed, R.A., Snow, R.W. (2009). A world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2007. PLoS Med, 6, 286-302.
- Hawkes, M. & K. C. Kain (2007). Advances in malaria diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther, 5, 485-95.
- Jelinek T, Behrens R, Bisoffi Z, Bjorkmann A, Gascon J, Hellgren U, Petersen E, Zoller T; TropNetEurop, the European Network on Imported Infectious Disease, Andersen RH, Blaxhult A. (2007). Recent cases of falciparum malaria imported to Europe from Goa, India, December 2006-January 2007. Euro Surveill, 11, 12-17.
- Jongwutiwes, S., Putapornitp, C., Iwasaki, T., Sata, T., Kanbara, H. (2008). Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. Emerg Infect Dis, 10: 2211-213
- Kain, K.C.; Macpherson, D.W.; Kelton, T.; Keystone, J.S.; Mendelson, J.; MacLean, J.D. (2001). Malaria deaths in visitors to Canada and in Canadian travelers: a case series. CMAJ, 5, 654-659.
- Khaminsou N, Kritpetcharat O, Daduang J, Kritpetcharat P. (2008). A survey of malarial infection in endemic areas of Savannakhet province, Lao PDR and comparative diagnostic efficiencies of Giemsa staining, acridine orange staining, and semi-nested multiplex PCR. Parasitol Int, 57, 143-149.
- Krotoski, W.A. (1985). Discovery of the hypnozoite and a new theory of malaria relapse. Trans R Soc Trop Med Hyg, 79, 1-11
- Kumar, S & Barillas-Mury, C. (2005). ookinete-induced midgut peroxidases detonate the time bomb in anopheline mosquitoes. Insect Biochem Mol. Biol, 35, 721-727.
- Lal, A. A., Changkasiri, S., Hollingdale, M. R., McCutchan T. F. (1989). Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. Mol Biochem Parasitol, 36, 67-71.
- Liu Q, Zhu S, Mizuno S, Kimura M, Liu P, Isomura S, Wang X, Kawamoto F. (1998). Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China. J Clin Microbiol, 36, 3378-3381.
- Luchavez, J. Lintag, M. E., Coll-Black, M., Baik, F., Bell, D. (2007). An assessment of various blood collection and transfer methods used for malaria rapid diagnostic tests. Mal J, 15, 146-149.
- Luchavez, J., F. Espino, P. Curameng, R. Espina, D. Bell, P. Chiodini, D. Nolder, C. Sutherland, K. Lee & B. Singh. (2008). Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. Emerg Infect Dis, 14, 811-3.

- Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, Peterson LR, Kaul KL. (2005). Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J Clin Microbiol, 43, 2435-2440.
- Marangi M, Di Tullio R, Mens PF, Martinelli D, Fazio V, Angarano G, Schallig HD, Giangaspero A, Scotto G. (2009). Prevalence of *Plasmodium* spp. in malaria asymptomatic African migrants assessed by nucleic acid sequence based amplification. Malar J, 12, 8:12.
- Martens, P. & Hall, L. (2000). Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. Emerg Infect Dis, 2, 103-109.
- Meis, J. F., Wismans, P. G., Jap, P. H., Lensen, A. H., Ponnudurai, T. (1992). A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. Acta Trop, 3, 227-236.
- Menge DM, Ernst KC, Vulule JM, Zimmerman PA, Guo H, John CC. (2008). Microscopy underestimates the frequency of *Plasmodium falciparum* infection in symptomatic individuals in a low transmission highland area. Am J Trop Med Hyg, 79, 173-177.
- Mens, P., Spieker, N., Omar, S., Heijnen, M., Schallig, H., Kager, P. A. (2007). Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. Trop Med Int Health, 12, 238-244.
- Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde. Superintendência de Epidemiologia. Análise da Situação de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte: SES/MG, 2007. 176 p.
- Moody, A. H. & Chiodini, P. L. (2002). Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. Br J Biomed Sci, 59, 228-231.
- Mota, M., Pradel, G., Vanderberg, J., Hafalla, J., Frevert, U., Nussenzweig, R., Nussenzweig, V. and Rodríguez, A. (2001). Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. Science, 291, 141-144.
- Mota, M., Hafalla, J., Rodríguez, A. (2002). Migration through host cells activates *Plasmodium* sporozoites for infection. Nat Med, 8, 1318-1322.
- Mota, M. M., & Rodríguez, A. (2004). Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. Cell Microbiol, 12, 1113-1118.
- Murray, C. K., Bennett, J. W. (2009). Rapid Diagnosis of malaria. Interdiscip Perspect Infect Dis, 53, 41-49.
- Ng, O., E. Ooi, C. Lee, P. Lee, L. Ng, S. Pei, T. Tu, J. Loh & Y. Leo. (2008). Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. Emerg Infect Dis, 14, 814-6.

- Noedl, H., Yingyuen, K., Laoboonchai, A., Fukuda, M., Sirichaisinthop, J., Miller, R. S. (2006). Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 1205-1208.
- Olsson, M. L., Hansson, C., Arent, N. G., Akesson, I.E., Green, C. A., Daniels, G. L. (1998). A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*, 38, 168-173.
- Parajui, K., Hanchana, S., Inwong, M., Pukrittayakamee, S., Ghimire, P. (2009). Comparative evaluation of microscopy and polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis in suspect malaria patients of Nepal. *Nepal Med Coll J*, 11, 23-27.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol*, 18, 407-421.
- Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, Lee SJ, Day NP, Dondorp AM. (2007). Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 77, 972-976.
- Perandin, F. Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. (2004). Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*, 42, 1214-1219.
- Prata, A., M. Urdaneta, P. McGreevy & M. Tada. (1988). Infrequency of asymptomatic malaria in an endemic area in Amazonas, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 21, 51-4.
- Prudêncio, M., Rodriguez, A. and Mota, M. (2006). The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*, 4, 849-856.
- Rahman W, Chotivanich K, Silamut K, Tanomsing N, Hossain A, Faiz MA, Dondorp AM, Maude RJ. (2010). *Plasmodium malariae* in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104, 78-80.
- Rubio, J.M., Benito, A., Berzosa, P.J., Roche, J., Puente, S., Subirats, M., López-Vélez, R., García, L., Alvar, J. (1999). Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 3260-4.
- Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. (2004). High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apuacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop*, 90, 61-64.
- Scopel, K. K., Fotes, C. J., Nunes, A. C., Horta, M. F., Braga, E. M. (2004a). Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitaemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Mal J*, 31, 3-8.

- Seethamchai, S., C. Putaporntip, S. Malaivijitnond, L. Cui & S. Jongwutiwes. (2008). Malaria and Hepatocystis species in wild macaques, southern Thailand. *Am J Trop Med Hyg*, 78, 646-53.
- Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. (2009). Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol*, 47, 975-980.
- Singh B, Cox-Singh J, Miller AO, Abdullah MS, Snounou G, Rahman HA. (1996). Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90, 519-521.
- Sinnis, P. & Zavala, F. (2008). The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. *Future Microbiol*, 3, 275-278.
- Snounou, G.; Viriyakosol, S.; Jarra, W.; Thaithong, S.; Brown, K.N. (1993). Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol*, 58, 283-289.
- Snounou, G. (1996). Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol Biol*, 50, 263-291.
- Suarez-Mutis, M. C. & J. R. Coura. (2007). Changes in the epidemiological pattern of malaria in a rural area of the middle Rio Negro, Brazilian Amazon: a retrospective analysis. *Cad Saude Publica*, 23, 795-804.
- Tada, M. S., R. P. Marques, E. Mesquita, R. C. Dalla Martha, J. A. Rodrigues, J. D. Costa, R. R. Pepelascov, T. H. Katsuragawa & L. H. Pereira-da-Silva. (2007). Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102, 263-9.
- Trigg, P. I. & A. V. Kondrachine. (1998). Commentary: malaria control in the 1990s. *Bull World Health Organ*, 76, 11-6.
- Van den Eede, P., H. N. Van, C. Van Overmeir, I. Vythilingam, T. N. Duc, X. Hung le, H. N. Manh, J. Anne, U. D'Alessandro & A. Erhart. (2009). Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. *Malar J*, 8, 249.
- Veron V, Simon S, Carme B. (2009). Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol*, 121, 346-351.
- Vythilingam, I., Y. M. Noorazian, T. C. Huat, A. I. Jiram, Y. M. Yusri, A. H. Azahari, I. Norparina, A. Noorain & S. Lokmanhakim. (2008). *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. *Parasit Vectors*, 1, 26.
- Waters, A. & McCutchan, T. (1989). Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet*, 17, 1343-1346.

- White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. Clin Infect Dis, 46, 172-3.
- World Health Organization. (2004). The use of Malaria Rapid Diagnostic tests. Geneva , WHO.
- World Health Organization. (2005). World malaria report in 2005. Roll Back Malaria. Geneva, WHO.
- World Health Organization. (2009). Disponível em: < ww.who.int > Acesso em: 15 nov. 2009
- World Health Organization. (2009a). World malaria report 2009. WHO, Geneva.
- Wongsrichanalai, C., Barcus, M. J., Muth, S., Sutamihardja, A., Wernsdorfer, W. H. (2007). A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Am J Tro Med Hyg, 77, 119-127.
- Yamauchi, L., Coppi, A., Snounou, G., Sinnis, P. (2007). *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. Cell Microbiol, 9, 1215-1222.
- Zalis, M. G., Ferreira-da-Cruz, M. F., Balthazar-Guedes, H. C., Banic, D. M., Alecrim, W., Souza, J. M., Druilhe, P., ADniel-Ribeiro, C. T. (1996). Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. Parasitol Res, 82, 612-616.
- Zhu, H. M., J. Li & H. Zheng (2006) Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, 24, 70-1.