

DANIELLE SCERNE FADUL

AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONCORDÂNCIA DO TESTE
IMUNOCROMATOGRÁFICO OPTIMAL-IT[®] E A GOTA ESPESSA NO
DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA, NO MUNICÍPIO DE MAZAGÃO-AP, BRASIL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. R. D'Almeida Couto
Faculdade SEAMA/AMAPÁ

Banca Examinadora: Prof^a Dr^a Maristela Gomes da Cunha
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Dr^a Vanja S. Calvosa D'Almeida Couto.
Ministério da Saúde, NES/AP.

Prof Dr Antônio Carlos do Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Prof Dr Luiz Fernando Almeida Machado (suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

Belém
2007

“A fé em Deus nos faz crê no incrível, ver o invisível e realizar o impossível”.

(Autor desconhecido)

Dedicatória

A Deus,

Por nunca me desamparar nos momentos mais difíceis da vida, conduzindo-me com amor e sabedoria, deixando meu trilhar mais suave nesta longa jornada da vida.

Aos meus pais,

Célia e Assis Fadul, pela dedicação, força, amor e esperança de uma vida melhor, mostrando que vale a pena lutar pelos nossos ideais e acreditar que sempre existe uma solução para tudo em nossas vidas.

Aos amores da minha vida,

Luiz e Iameme, por todo amor a mim dedicado nos momentos mais difíceis, pela amizade incondicional mostrando-me que as grandes batalhas da vida são enfrentadas com humildade e amor.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Álvaro Augusto Ribeiro D'Almeida Couto pelo apoio, compreensão e orientação científica, imprescindíveis para elaboração deste trabalho.

A Profa. Dra. Maristela Cunha pela atenção, paciência e pelas valiosas sugestões dadas no processo de qualificação do projeto.

A Dra. Vanja Calvosa D'Almeida Couto, pelas sugestões durante a fase de qualificação.

A Universidade Federal do Pará – UFPA, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, na pessoa do Prof. Dr. Antonio Vallinoto, pelo empenho em nos oportunizar essa Pós-Graduação.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pelo repasse dos conhecimentos.

A todos os integrantes da Gerência do Projeto Ensino e Pesquisa em Saúde GPEPS/SESA, Dina, Eronildo Penha, Job Ferreira, Laura Monteiro e Terezinha Severino, pelo imprescindível apoio a mim dispensado durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Aos técnicos João Batista e Bruno Lima, do laboratório da Unidade Mista de Saúde de Mazagão, pela contribuição no trabalho de diagnóstico laboratorial dos pacientes.

A senhora Maria José, bibliotecária do Instituto Evandro Chagas, pela disposição em ajudar-me na procura de tantos artigos para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos (1ª e 2ª turma) do mestrado, pelo companheirismo e amizade.

As minhas amigas Margarete Gomes e Natalia Guerreiro por toda amizade, paciência e pelos momentos bons e ruins que passamos juntas aprendendo a cada dia sobre a convivência humana.

Aos meus primos e amigos Carlos Scerne, Priscilla Scerne, Thiago Viana e Danilo Fernandez, pelo incentivo e incondicional apoio dispensado no período da qualificação.

A minha família pelo apoio e incentivo. Em especial a minha madrinha Ruth Scerne por todo carinho e palavras de incentivo e por ser um exemplo a seguir.

A minha amiga e fiel companheira, Ângela Vieira, que sempre esteve ao meu lado, dando o melhor de si.

Aos pacientes de malária, que foram importantes para a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

A todos que de algum modo me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	08
	LISTA DE TABELAS	09
	LISTA DE ABREVIATURAS	10
	RESUMO	11
	ABSTRACT	12
1	INTRODUÇÃO	13
1.1	A HISTÓRIA DA MALARIA.....	13
1.2	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1.3	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA MALÁRIA	18
1.4	CICLO DE TRANSMISSÃO DA MALÁRIA	24
1.4.1	Vetores	24
1.4.2	Agentes Etiológicos	25
1.4.3	Ciclo Biológico	26
1.5	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	28
1.5.1	Diagnóstico Microscópico	28
1.5.2	Diagnóstico Imunológico	31
1.5.3	Diagnóstico Molecular	38
1.6	OBJETIVOS.....	41
1.6.1	Objetivo Geral	41
1.6.2	Objetivos Específicos	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	TIPO DE ESTUDO.....	42
2.2	ÁREA DE ESTUDO.....	42

2.3	CASUÍSTICA	43
2.4	AMOSTRA	44
2.4.1	Amostras para o Diagnóstico da Malária e Determinação da Parasitemia.....	44
2.5	MÉTODO LABORATORIAL.....	44
2.5.1	Diagnóstico Parasitológico da Malária e Quantificação da Parasitemia.....	44
2.6	DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA COM O TESTE OptiMAL-IT®.....	45
2.6.1	Leitura dos Resultados do OptiMal- IT®	47
2.7	ASPECTOS ÉTICOS.....	49
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
3	RESULTADOS.....	52
3.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE MAZAGÃO.....	52
3.2	CARACTERÍSTICAS DA REDE DE LABORATÓRIOS.....	55
3.3	CONCORDÂNCIA DO TESTE OPTIMAL-IT® FRENTE A GOTA ESPESSA.....	56
4	DISCUSSÃO.....	59
4.1	FATORES ASSOCIADOS A EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	60
4.2	FATORES ASSOCIADOS AO DIAGNÓSTICO.....	62
4.3	FATORES ASSOCIADOS À RESOLUÇÃO DOS MÉTODOS	64
5	CONCLUSÕES.....	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
	ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1	Distribuição da Malária no Mundo em 2005.....	19
Figura – 2	Distribuição dos Casos de Malária na Região das Américas, 2004.....	20
Figura – 3	Distribuição da Malária no Brasil e na Região da Bacia Amazônica, Segundo Níveis de Incidência Parasitaria Anual (IPA), em 2006.....	22
Figura -4	Proporção de Casos de Malária por Espécie de Plasmódio na Região Amazônica, 2006.....	23
Figura – 5	Caracterização de Risco da Malária por Município no Estado do Amapá de Janeiro a Dezembro de 2006.....	24
Figura – 6	Ciclo Biológico do Parasito da Malária.....	28
Figura – 7	Ciclo Catalítico, Incluindo o Complexo Inibitório da Enzima - NAD^+ - Piruvato, E: enzima, R: NADH, O: NAD, P: Piruvato e L: Lactato.....	32
Figura – 8	Localização do Município de Mazagão - AP-Brasil.....	43
Figura – 9	Representação Esquemática do Teste OptiMAL-IT [®]	47
Figura – 10	Possíveis Resultados do Teste OptiMAL-IT [®]	49

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1	Número de casos notificados de malária no município de Mazagão-AP. e sua distribuição por espécie, no período de 2005 e 2006.....	52
Tabela – 2	Distribuição dos casos suspeitos de malária, nas áreas urbana e rural do município de Mazagão -AP, dezembro de 2005 a junho de 2006.....	53
Tabela – 3	Avaliação da eficácia do diagnóstico em função do tempo entre o início do tratamento e após a coleta da amostra, no município de Mazagão, dezembro de 2005 a junho de 2006.....	54
Tabela – 4	Avaliação da eficácia do diagnóstico em função do tempo entre o início do tratamento e o início dos primeiros sintomas, no município de Mazagão, dezembro de 2005 a junho de 2006	55
Tabela – 5	Avaliação da concordância entre o TDR-OptiMAL-IT [®] e a Gota Espessa, no diagnóstico da malária no município de Mazagão, AP- Brasil, Dezembro de 2005 a junho de 2006.....	57
Tabela – 6	Avaliação da sensibilidade do TDR-OptiMAL-IT [®] no diagnóstico da malária, frente a estratificação por densidade parasitária, dezembro de 2005 a junho de 2006 no município de Mazagão- AP- Brasil.....	58

LISTA DE AREVIATURAS

OMS: Organização Mundial da Saúde

DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano

CEM: Campanha de Erradicação da Malária

PIACM: Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal

PNCM: Programa Nacional de Controle da Malária

OPAS: Organização Pan Americana da Saúde

IPA: Índice Parasitário Anual

PfHRP-II: Proteína II rica em histidina de *P. falciparum*.

TDR: Teste de Diagnóstico Rápido

pLDH: Enzima desidrogenase láctica de Plasmódio

LDH: Enzima desidrogenase láctica

NAD: Adenina nicotinamida

QBC: Quantitative Buffy Coat

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAVREDA: Rede Amazônica de Vigilância da Resistência às Drogas Antimaláricas.

GE: Gota Espessa

LACEN - AP: Laboratório Central de Saúde pública - Amapá

RESUMO

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado dos casos de malária é a principal estratégia para o controle da doença. Várias alternativas para o diagnóstico microscópico tradicional foram propostas nos últimos anos, os testes imunocromatográficos que capturam antígenos alvos dos parasitos da malária estão sendo propostos, como o teste OptiMAL-IT[®] que detecta a desidrogenase láctica do *Plasmodium sp.*. O estudo teve como objetivo a avaliação do nível de concordância entre o teste imunocromatográfico (OptiMAL-IT[®]) e a gota espessa para o diagnóstico da malária no Município de Mazagão – Amapá. Foram analisados 413 indivíduos com sintomatologia de malária, que procuraram o serviço da Unidade Mista de Saúde de Mazagão, com idade entre 01-68 anos. Os resultados do teste OptiMAL-IT[®] foram comparados com os resultados obtidos (das amostras) através da gota espessa corada pelo Giemsa. Dos 413 pacientes suspeitos de apresentarem malária, 317(76.8%) eram positivos através da GE e 311 (75.3%) eram positivos pelo TDR. Das lâminas de GE positivas, foram encontrados 27.4% de *P. falciparum* e 72.6% de *P. vivax*. O teste OptiMAL-IT[®] detectou 27.7% de *P. falciparum* e 72.3% de *P. vivax*. A sensibilidade obtida com o TDR para o *P. falciparum* foi de 97.7% e para o *P. vivax* foi de 98.2%, a sensibilidade global do TDR foi de 98.1% e a especificidade global e para ambas as espécies foi de 100%. Foram encontrados valores preditivos positivos e negativos de 100% e 94.1%, respectivamente. O teste OptiMAL-IT[®], teve uma alta concordância com a GE, foi específico e eficiente, podendo ser usado no diagnóstico de malária nas situações onde a microscopia não está disponível.

ABSTRACT

The precocious diagnosis and the opportune treatment of the cases of malaria is one of the main strategies for the control of the disease. Several alternatives for the traditional microscopic diagnosis were proposed in the last years, the Immunochromatographic tests that capture white antigens of the parasites of the malaria they are being proposed, as the test OptiMAL-IT[®] that captures the lactic desidrogenase of the *Plasmodium sp.*. The study had as objective the evaluation of the level of agreement between the Immunochromatographic test (OptiMAL-IT[®]) and the thick drop for the diagnosis of the malaria in the City of Mazagão – Amapá, Brazil. 413 individuals were analyzed with malaria sintomatology that had looked for the service of the unit of health service of the city, with age among 01-68 years. The results of the OptiMAL-IT[®] test were compared with the obtained results, of the same samples, through the thick drop red-faced by the Giemsa. Of the 413 patients suspicious to present malaria, 317(76.8%) were positive through GE and 311 (75.3%) were positive for TDR OptiMAL-IT[®]. Of the positive blades of GE, had been found 27.4% of *P. falciparum* and 72.6% of *P. vivax* . The OptiMAL-IT[®] test detected 27.7% of *P. falciparum* and 72.3% of *P. vivax*. The sensibility obtained with TDR for *P. falciparum* was of 97.7% and for *P. vivax* was of 98.2%, the global sensibility of TDR was of 98.1% and the global specificity for both the species was of 100%. They were found preditivos values positive and negative of 100% and 94.1%, respectively. The OptiMAL-IT[®] test had a high agreement with thick drop, it is specific and efficient. It can be used in the diagnosis of malaria in the situations where microscopy is not available.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DA MALÁRIA

A malária é conhecida desde a antigüidade. Provavelmente sua origem foi na África, há milhões de anos e se espalhou para as regiões tropicais, subtropicais e temperadas do Velho Mundo através das migrações e, posteriormente, para o Novo Mundo com os exploradores, missionários e escravos. Na China em 2.700 a.C. já se referiam a febres intermitentes com esplenomegalia atingindo simultaneamente muitas pessoas. Na Grécia, Hipócrates descreveu com clareza quadros febris típicos da malária, além de registros de esplenomegalia (Bruce-Chwatt, 1985; Deane, 1992; Carter & Mendis, 2002; Cox, 2002).

No século XVIII, a forma de transmissão não era conhecida pelas populações antigas que atribuíam aos “miasmas” (emanações dos pântanos) a causa da doença. Este fato deu origem ao termo malária “mal aire” do italiano, e paludismo ou impaludismo do francês, cuja origem vem de “pallus” que significa água estagnada (Rey, 2001).

A introdução da malária nas Américas pode ter ocorrido logo após 1492, trazida por europeus e africanos, contribuindo com muitas mortes, incluindo os nativos. Desde aquela época, já havia o conhecimento, por parte dos indígenas do uso da casca da quina, uma árvore de origem peruana, usada para diminuir a temperatura; foram os indígenas que apresentaram aos jesuítas a casca da *Chinchona* e que a experimentaram no tratamento dos indivíduos acometidos pela malária. Comprovada a sua eficácia, teve início o transporte da casca do vegetal para a Europa, Ásia, África e América do Norte,

onde a malária ocorria de forma epidêmica. Entretanto, somente em 1820, Joseph Pelletier e Joseph Caventou isolaram o alcalóide quinino. (Bruce-Chwatt, 1985; Deane, 1992; Farrel, 2003).

A transmissão das febres intermitentes por mosquitos ligados ao pântano, foi primeiramente sugerida pelo médico italiano Lancisi, em 1871, até que em 1880, Laveran, na Argélia, identificou em hemácias de pacientes africanos, o protozoário causador da doença, descrevendo assim a primeira espécie encontrada e o nomeou de *Plasmodium malariae*. Em 1897, Ronald Ross, descreveu o ciclo parasitário em mosquitos do gênero *Anopheles* e nos anos seguintes, Giovanni Grassi & Giuseppe Bastianelli e Amico Bignami, em 1898 e 1899, respectivamente, completaram as informações com a descrição completa do ciclo biológico do *Plasmodium sp* (Deane, 1992).

1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença infecciosa, parasitária, de evolução crônica, com manifestações de caráter agudo, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitida ao homem pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, é caracterizada principalmente pela tríade: febre, calafrio e cefaléia. É também conhecida como Paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, febre quartã, maleita, sezão ou tremedeira (Matsumoto, 1998).

A malária é hoje considerada uma das principais doenças infecciosas existentes no mundo. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorra cerca de 500 milhões de casos anuais, nas

regiões tropicais da África, da Ásia e das Américas. Sua distribuição espalha-se por 107 países e territórios, expondo ao risco de contraí-la cerca de 40% da população mundial dos trópicos (WHO, 2005).

Várias estratégias foram lançadas pela OMS para o combate da malária mundialmente. A partir de 1944, foi introduzido o uso do dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) como principal medida de controle do vetor, com o objetivo de erradicar a doença. A estratégia de erradicação da malária, fortemente calculada nos ciclos semestrais de borrifação dos domicílios com o DDT e na administração de tratamento supressivo, não foi devidamente implementada, havendo entre os técnicos da época o consenso de não considerar a adaptação biológica do vetor, o que a tornou insuficiente para interromper a transmissão em áreas como a região Amazônica (Tadei, 1983).

No Brasil, desde a década de 60, quando os esforços desenvolvidos por meio da Campanha de Erradicação da Malária (CEM) não foram suficientes para a eliminação da doença na área da Amazônia Legal, várias outras estratégias foram desenvolvidas para a diminuição de sua incidência, com resultados satisfatórios em alguns aspectos. Entre essas estratégias, inclui-se o lançamento do Programa de Controle da Malária na Bacia Amazônica (PCMAM), que iniciou a melhoria das estruturas das unidades de saúde locais, a partir de 1988 até 1996 (Loiola *et al.*, 2002).

Já na década de 1990 iniciou-se a mudança da estratégia de erradicação para o controle integrado, a partir da Conferência Interministerial, realizada em Amsterdã, em 1992. A nova estratégia consistia em focalizar o diagnóstico e tratamento dos casos como prática geral do controle e na escolha

seletiva de objetivos, estratégias e métodos específicos de controle ajustados às características particulares de transmissão, existentes em cada localidade (Brasil, 1999).

O Brasil acompanhou as recomendações da OMS (OMS, 1992) com a regionalização das medidas para o controle da malária e, dessa forma, novas estratégias foram implantadas para a Amazônia Legal. As medidas consistiam na ampliação da rede de laboratórios públicos para diagnóstico da doença, com a incorporação das unidades permanentes de saúde, e na melhoria do tratamento e da infra-estrutura local (Passos & Filho, 1998). Ainda assim, houve um aumento na incidência da malária na Amazônia Legal.

Em 1999, dos mais de 600 mil casos registrados, mais de 90% eram da região Amazônica, o que significava um aumento de 34,3% em relação ao ano anterior e a manutenção do aumento das infecções causadas por *P. falciparum*, das internações hospitalares e do número de óbitos. (Ferreira, 2004)

Diante dessa realidade, o Ministério da Saúde (MS) posicionou-se no sentido de buscar novas estratégias e lançou, em 2000, o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) em parceria com Estados e Municípios. O objetivo do Plano foi o de “Intensificar” as ações de controle da malária na região Amazônica, reduzindo a sua morbi-mortalidade a níveis sustentáveis de controle, evitando o surgimento de epidemias localizadas, reduzindo a sua gravidade e, conseqüentemente, o número de internações e óbitos (BRASIL, 2000).

Com o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) - que vigorou no período de 2000 a 2002 – houve uma redução de 45% na incidência da doença na região da Amazônia Legal, ao final do ano de 2002, comparando-se com 1999. Esta estratégia resultou na expansão da rede de diagnóstico e garantiu um tratamento rápido em áreas endêmicas (Brasil, 2003).

Apesar dos resultados obtidos, a incidência desta doença na região Amazônica, ainda é muita elevada, e precisa ser reduzida a números que possam dar sustentabilidade ao processo de descentralização das ações de epidemiologia e controle da doença para estados e municípios. Foi com a visão de dar continuidade aos avanços proporcionados pelo PIACM, que o Ministério da Saúde estabeleceu uma política permanente para prevenção e controle da endemia, criando em dezembro de 2002, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) (Brasil, 2003).

No ano de 2006, foram realizados aproximadamente 3,4 milhões de exames para diagnóstico da malária na Amazônia Legal, havendo um aumento de 13,1% no número de unidades de diagnóstico em 2006 quando comparado com a situação de 2005, passando de 2.909 para 3.290 unidades. O aumento deste número deu-se em todos os estados da região levando a uma diminuição no número de casos, contudo, no Estado do Amapá houve um incremento de 3,8% dos registros de malária (Brasil, 2007).

Nos pacientes com malária, um diagnóstico rápido e precoce constitui a estratégia para o controle eficaz da doença. O exame microscópico da lâmina de sangue pelo método da gota espessa é o diagnóstico padrão

“Ouro” (Moody, 2002). Entretanto, a interpretação correta de lâminas de sangue requer perícias consideráveis que não estão necessariamente, disponíveis em centros médicos periféricos nos países endêmicos. Assim, a disponibilidade de um teste simples e preciso vem contribuir com o diagnóstico da infecção malárica em áreas remotas onde a facilidade de cobertura da saúde é baixa e o risco da população de contrair a doença é alto. (Moody, 2002; WHO, 2000).

Em muitos lugares onde malária é endêmica, a falta de infraestrutura de laboratório e recursos humanos apropriados impede o uso de técnicas diagnósticas baseadas na microscopia. Para superar este problema, alguns testes rápidos imunocromatográficos, que poupam o uso de equipamento e pessoal altamente qualificado, estão atualmente disponíveis (Palmer *et al.*, 1998).

Os testes imunocromatográficos são capazes de captar parasitemias maiores que 100 parasitos/ μ l (0.002% parasitemia), capturam antígenos parasitários e dão resultados rápidos (15 a 20 min). Eles estão comercialmente disponíveis em kits com todos os reagentes necessários, e a facilidade de desempenho dos procedimentos não requer treinamento extensivo ou equipamento para executar ou interpretar os resultados (Peyron *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1997).

1.3 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA MALÁRIA

De acordo com os dados da OMS aproximadamente 107 países ou territórios no mundo são considerados como áreas de risco para malária,

principalmente os países tropicais e subtropicais situados ao Sul do deserto do Saara, os do Sudeste Asiático e os da América Latina, particularmente os situados na região da Bacia Amazônica, conforme distribuição geográfica apresentada na Figura 1 (WHO, 2005).

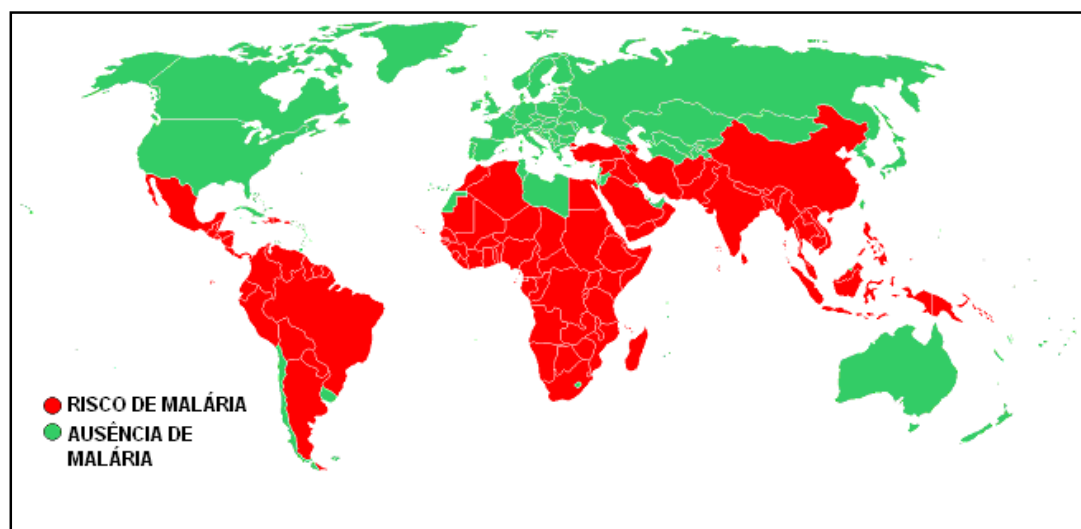


Figura1- Distribuição da Malária no Mundo em 2005 (Fonte: commons wikimedia.org/wiki/Image:Malaria_map.PNG)

A malária, apesar de conhecida há mais de três mil anos, é ainda uma das principais endemias mundiais. Cerca de 2,4 milhões de pessoas ainda estão expostas a este risco. A ocorrência mundial da malária é calculada entre 300 a 500 milhões de casos clínicos anuais com 1% a 2% de óbitos. (Baird, 2005).

Segundo a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), na região das Américas, ocorre transmissão da malária em 21 dos seus estados

membros. Nestes países, 77 milhões de pessoas moram em áreas de risco moderado e alto de transmissão, produzindo aproximadamente 1,5 milhão de casos por ano (OPAS/OMS, 2005).

Considerando o Índice Parasitário Anual (IPA) nas Américas, o Brasil, em 2004, notificou o maior número de casos de malária (52,6%), seguido da Sub-região Andina (Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) (34.1%) e 13.3% distribuídos nos demais países de menor ocorrência, conforme apresentado na Figura 2 (OPAS/OMS, 2006).

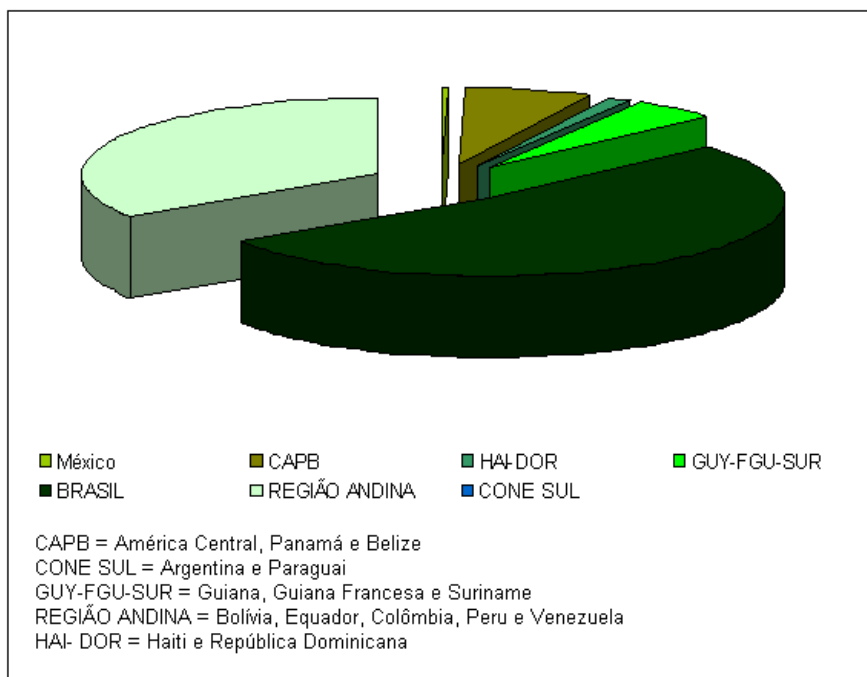


Figura 2 - Distribuição dos Casos de Malária na Região das Américas, 2004. (Fonte: OPAS/OMS, 2006)

A região Amazônica registra cerca de 99.5% do total de casos da malária notificada no país (Figura 3). A distribuição dos casos registrados em 2006, demonstra a não homogeneidade da distribuição da endemia, pois os estados do Amazonas, Rondônia, Pará e Acre foram responsáveis por 87.9% dos casos. Os municípios de Cruzeiro do Sul, Manaus e Porto Velho foram notificados 22.5% dos casos da região. A variação de 2006 em relação a 2005 mostra uma redução em sete estados, entretanto o Acre e o Amapá apresentaram um incremento de 63.4% e 3.8%, respectivamente. O estado que apresentou maior redução foi Tocantins (47%) (Brasil, 2007).

Nas diferentes áreas com potencial malarígeno a dinâmica de transmissão é variável entre os grupamentos humanos que habitam diferentes nichos ecológicos, onde existe uma interação de fatores de risco de diferentes origens (Marques & Gutierrez, 1994). Fatores biológicos formam os elos da cadeia de transmissão; fatores ecológicos, ligados a condições ambientais, favorecem ou dificultam a transmissão; fatores sócio culturais originam as atitudes das pessoas para evitar a infecção e determinam seu comportamento em caso de adoecer; fatores de ordem econômica e política influenciam na extensão das medidas de proteção e dos cuidados à saúde das populações expostas (Marques & Gutierrez, 1994).

A malária está associada à deterioração social e econômica, e suas vítimas principais são as populações rurais não privilegiadas. Pressões demográficas, sociais e econômicas induzem esses contingentes populacionais a procurar melhores condições de vida, propiciando migrações dentro das áreas endêmicas e, destas, para aquelas livres da malária, o que resulta em

geração de novos focos. Os fluxos migratórios e a intensa urbanização, na maioria das vezes, não são acompanhados de programas adequados de saúde e saneamento (Molineaux, 1988).

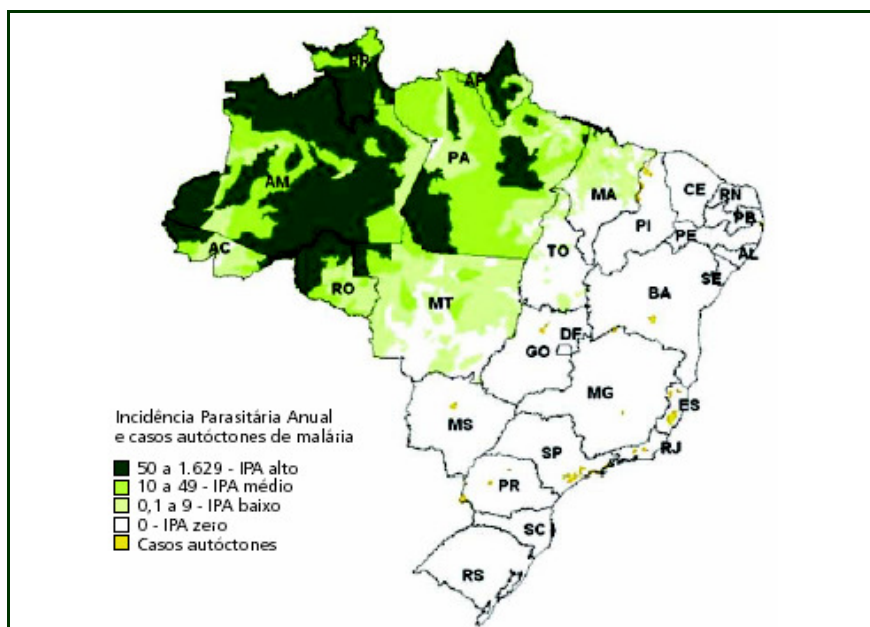


Figura 3 – Distribuição da Malária no Brasil e na Região da Bacia Amazônica, Segundo Níveis do Índice Parasitário Anual (IPA), em 2006. (Fonte: SIVEP – Malária, Sinan/SVS/MS, 2007)

Na Amazônia Legal, em 2006 a espécie predominante foi o *P. vivax* com 73.4% das notificações, ficando o *P. falciparum* com 24.9% e a malária mista (*P. vivax* + *P. falciparum*) com 1,6% (Figura 4). O risco de adoecer de malária baseado no índice parasitário anual (IPA) na Amazônia Legal foi de 22.9 casos para cada mil habitantes. Ficou estabelecida para o ano

de 2007 a redução de 10% da incidência da malária além da proporção de casos de *P. falciparum* e de internações (Brasil, 2007).

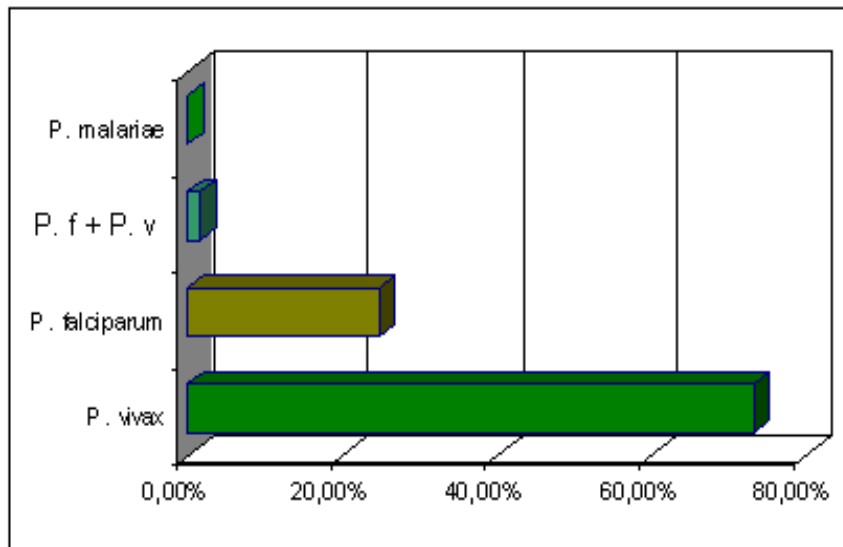


Figura 4 – Proporção de Casos de Malária por Espécie de Plasmódio na Região Amazônica, 2006. (Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS, 2007).

No ano de 2007, o estado do Amapá, até o mês de abril, notificou 6.181 casos da doença, dos quais 66% foram causados por *P. vivax*, 31,6% por *P. falciparum* e 2,4% por *P. falciparum* + *P. vivax*, mostrando a situação peculiar que ocorre no Estado do Amapá quando se compara com os outros estados Amazônicos, onde a malária por *P. falciparum* está em torno de 24,9% (Figura 5) (SIVEP/MAL, 2007).

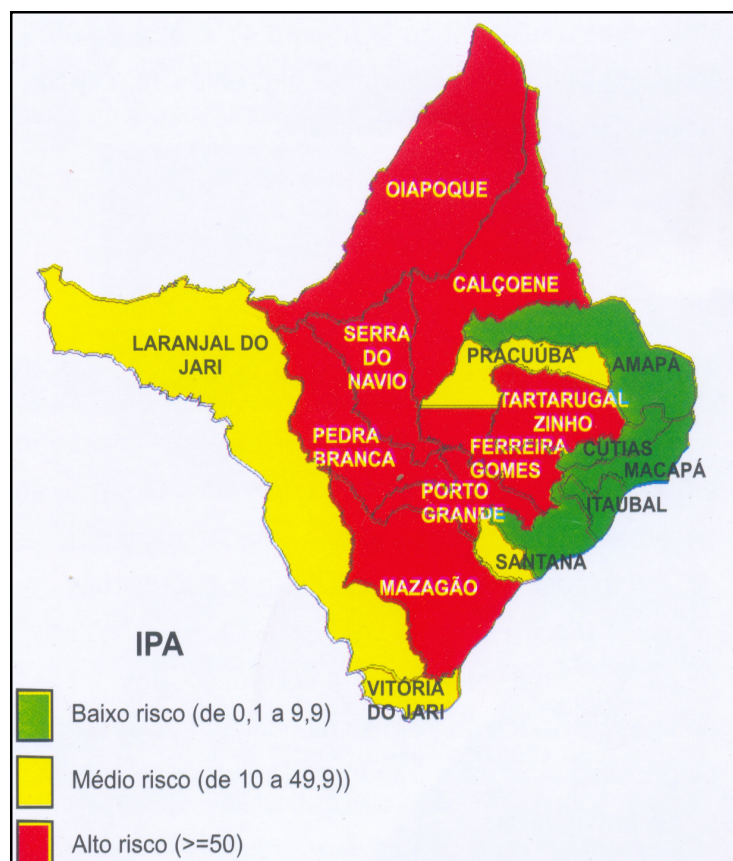


Figura 5 – Caracterização de Risco da Malária por Município no Estado do Amapá de Janeiro a Dezembro de 2006. (Fonte: SIVEP – Malária, 2007).

1.4. CICLO DE TRANSMISSÃO DA MALÁRIA.

1.4.1 Vetores

O parasito é transmitido, naturalmente, de uma pessoa para outra, pela picada de uma fêmea de anofelino infectada, que utiliza o sangue para o amadurecimento de seus ovos. Existem cerca de 400 espécies de anofelinos, mas apenas 60 podem transmitir malária ao homem (Forattini, 2002).

Os vetores da malária humana são insetos da ordem Díptera, da família Culicidae, do gênero *Anopheles* (Russel *et al.*, 1946; Forattini, 2002).

No Brasil, as principais espécies transmissoras pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhincus*, destacando-se as espécies *Anopheles (N.) darlingi* (Root, 1926) *Anopheles (N.) aquasalis* (Curry, 1932) e o *Anopheles (N.) albitarsis* (Lynch Arribalzaga, 1878) e o subgênero *Kerteszia*, com as principais espécies; *Anopheles (K) cruzii* (Dyar & Knab, 1908) e *Anopheles (K) bellator* (Dyar & Knab, 1908) (Rachou 1958; Deane 1986).

O *Anopheles (N.) darlingi* (Root 1926) é considerado o mais importante vetor da malária no Brasil, particularmente na região Amazônica brasileira (Shannon, 1933; Rachou, 1958). É a espécie de maior importância epidemiológica, pela abundância, ampla distribuição no território nacional, atingindo todo o interior do país, por seu alto grau de antropofilia, endofagia e pela capacidade de transmitir diferentes espécies de plasmódio. Possui como criadouros preferenciais às coleções de águas limpas, quentes, sombreadas e de baixo fluxo, situação muito freqüente na região Amazônica (Deane, 1989; De Oliveira-Ferreira *et al.*, 1990).

Estudo realizado por Segura (1998), em áreas próximas a Macapá, demonstrou que o *Anopheles aquasalis* e o *Anopheles marajoara* (Galvão e Damasceno, 1942), também são vetores importantes na transmissão da malária, no Município de Macapá.

1.4.2 Agentes Etiológicos

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, Ordem Eucoccidiidae, Subordem Haemosporinae, Família Plasmodiidae, Gênero *Plasmodium* (Machiafava &

Celli, 1885), com aproximadamente 172 espécies e que infectam aves, répteis e mamíferos (Levine, 1988). Segundo Garnham & Duggan (1986) quatro dessas espécies infectam naturalmente o homem: *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881), *Plasmodium vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) e, *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922).

O *P. falciparum* é o causador da terçã maligna; o *P. vivax*, responsável pela terçã benigna; o *P. malariae*, determinante da forma quartã, e estão distribuídos geograficamente pelas áreas tropicais e subtropicais. O *P. ovale*, causador da terçã benigna é restrito a África tropical, Filipinas, Nova Guiné e Vietnã (Bruce-Chwatt, 1985).

O *P. vivax* é uma espécie amplamente distribuída no mundo, ocorrendo em regiões tropicais, subtropicais e, raramente, em regiões temperadas. O *P. falciparum* predomina na África e no sudeste da Ásia. Estas duas espécies coexistem em muitas partes do mundo, mas o *P. vivax* é raro no oeste da África. *P. malariae* tem uma prevalência menor que no passado, com distribuição limitada à África e mais raramente no Oeste Pacífico e na América do Sul. O *P. ovale* é o que tem a mais limitada distribuição, restringindo-se à África sub-Saariana e à Ásia, sendo endêmico somente na Papua Nova Guiné e nas Filipinas (Carter & Mendis, 2002).

1.4.3 Ciclo Biológico

O ciclo biológico dos plasmódios ocorre em dois hospedeiros. No homem que é considerado o hospedeiro intermediário onde ocorre reprodução assexuada do tipo esquizogonia, e no mosquito, hospedeiro definitivo, onde

ocorre a reprodução sexuada do tipo esporogonia, de acordo com o ciclo descrito na Figura 6 (CDC, 2006).

Conforme esquematizado na figura 6, o ciclo inicia-se quando a fêmea infectada do mosquito *Anopheles*, ao exercer a hematofagia no homem, inocula esporozoítos na corrente sangüínea. Estas formas desaparecem da circulação sangüínea do indivíduo suscetível e alcançam os hepatócitos, onde evoluem. Após invadirem os hepatócitos, os esporozoítos se multiplicarão por reprodução assexuada do tipo esquizogonia, dando origem aos esquizontes teciduais, que em seguida se rompem e liberam milhares de merozoítos. Essa fase primária do ciclo é chamada pré ou exo-eritrocítica ou tecidual (CDC, 2006).

A segunda fase do ciclo é denominada eritrocítica, e inicia-se quando os merozoítos teciduais invadem os eritrócitos. O desenvolvimento intra-eritrocítico do parasito se dá por esquizogonia. Após a invasão no eritrócito, os merozoítos sofrem maturações morfológicamente distintas, compreendendo três fases, respectivamente: anel, trofozoíto e esquizonte. Após a maturação completa, os eritrócitos se rompem liberando novos merozoítos na circulação sangüínea, que em seguida invadem novos eritrócitos reiniciando o ciclo. Depois de sucessivas gerações de merozoítos sangüíneos, algumas formas se diferenciam em estágios sexuais, os gametócitos (femininos e masculinos), que são as formas infectantes para o mosquito (CDC, 2006).

A infecção do vetor ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles* durante a hematofagia em um indivíduo infectado ingere

gametócitos macho (microgametócitos) e fêmea (macrogametócitos). No estômago do mosquito, o microgametócito fecunda o macrogametócito, gerando o zigoto, o qual se alonga, originando o oocineto, que atravessa a parede do estômago do inseto e se transforma em oocisto, cujo conteúdo divide-se para formar os esporozoítos, que são liberados na hemocele e migram para as glândulas salivares do mosquito estando assim prontos para infectar um novo indivíduo (CDC, 2006).

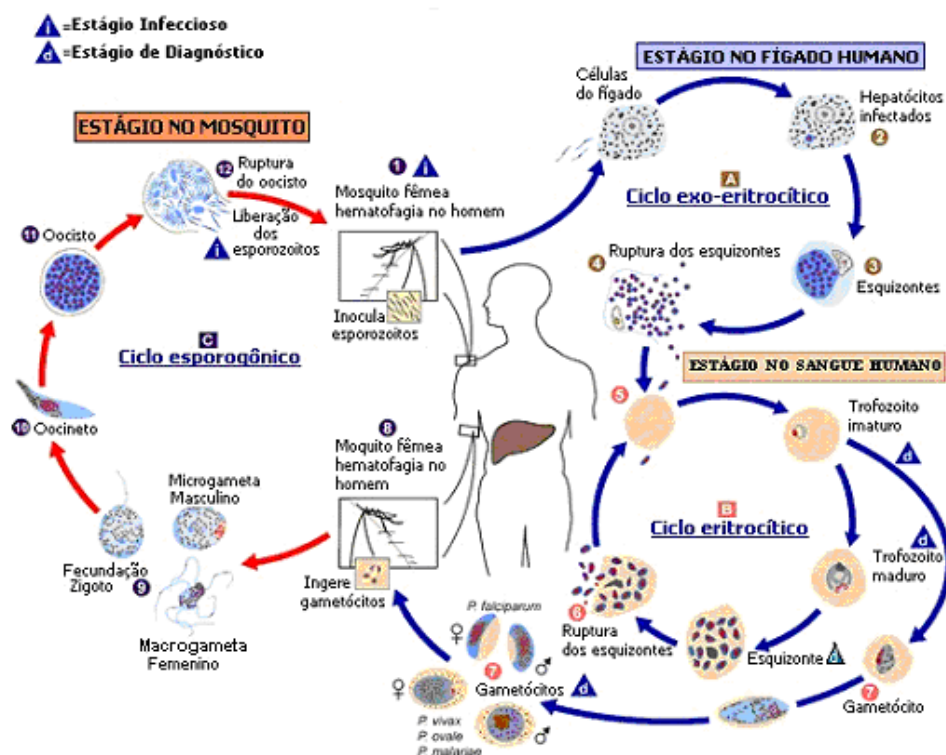


Figura 6– Ciclo Biológico do Parasito da Malária. (Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso, julho, 2006).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.5.1 Diagnóstico Parasitológico

A confirmação etiológica da malária é basicamente realizada por meio do encontro dos plasmódios no sangue periférico. Laveran, 1880, foi o pioneiro no diagnóstico laboratorial da malária quando descobriu o parasito em distensão sanguínea em lâmina de sangue de pacientes com febre. Ronald Ross verificou que o aumento da concentração do sangue numa área desmoglobinizada aumentava a sensibilidade da técnica em 20 vezes, originando o método da gota espessa. Hoje, os programas de controle da malária utilizam esse método, tendo em vista que este exame aumenta a chance do diagnóstico, devido a possibilidade de examinar um volume sanguíneo 3 a 5 vezes maior, elevando a sensibilidade do método. No entanto, a distensão em lâmina permite uma boa análise morfométrica, sendo dessa forma a técnica que apresenta maior facilidade para observação das características morfológicas dos parasitos presentes nas hemácias, permitindo com certa facilidade e segurança diferenciar as diversas espécies de plasmódios (Igreja *et. al.*, 2001; Ferreira, 2004; Ross, 1903; OPAS, 1975).

A gota espessa é uma técnica considerada de baixo custo, de US\$ 0,12 a US\$ 0,40 por lâmina examinada. Uma outra vantagem é a possibilidade de realização do controle de qualidade dos exames realizados. Entretanto para identificação da espécie, o exame é de mais difícil interpretação, em decorrência das limitações do método como: i) o material não é fixado; ii) ocorre lise das hemácias, durante o processo de coloração, deixando os parasitos livres; iii) a morfologia dos parasitos não é bem preservada (Dowling & Shute, 1966; WHO, 2000).

No momento da coloração da gota espessa pode ocorrer perda de 66% dos trofozoítos e de 80 a 90% de gametócitos. Essa perda pode dificultar o diagnóstico quando o paciente tem um nível baixo de parasitemia, exigindo um tempo maior no exame da lâmina de 30 minutos para o microscopista detectar a forma trofozoíto de *P. falciparum* e 90 minutos para detectar gametócito, exigindo dessa forma microscopistas bem treinados para fazer uma avaliação crítica, pois pode ocorrer também algum defeito no momento da preparação da lâmina como: i) permanência demasiada da gota sobre a lâmina antes de proceder ao espalhamento; ii) inobservância do cuidado de secar completamente o dedo do paciente; iii) provocação de hemólise parcial da camada de sangue pelo suor do paciente e do operador; iv) uso de corantes inadequados e v) o dedo gorduroso do paciente (Igreja *et al.*, 2001; Ávila & Ferreira, 1996; Dowling & Shute, 1966; WHO, 2000).

No diagnóstico pela observação em lâminas, deve-se estar atento para as características das diversas espécies. O *P. falciparum* pela sua propriedade de citoaderência, só permite a detecção de trofozoítos e gametócitos na periferia e ao se observar à lâmina só se verificará, em geral, a presença dessas formas evolutivas. No caso do *P. vivax* são observadas parasitos em vários estágios de evolução e hemácias aumentadas de tamanho e hipocoradas, ao contrário do *P. falciparum* onde as hemácias têm tamanho e cor normais. No diagnóstico do *P. malariae* se observa tendência à apresentação diagonalmente nas hemácias, ou em banda (Igreja *et al.*, 2001; Ávila & Ferreira, 1996; WHO, 2000).

O diagnóstico por este método pode ser trabalhoso, por requerer até 60 min de tempo para sua preparação além da necessidade de um examinador experiente para sua interpretação, particularmente em baixos níveis de parasitemia (Dourado *et al.*, 1994; Moody, 2002). Depende também da qualidade da coloração, do microscópio e da técnica de preparação das lâminas. (Dowling & Shute, 1966; Killian *et al.*, 2000). Há um limiar de detecção, segundo o grau de parasitemia existente no paciente e do número de campos lidos (Thellier, *et al.*, 2002). Em condições ideais, um microscopista é capaz de detectar densidades parasitárias tão baixas como 10 a 20 parasitos por cada microlitro de sangue. Em condições de campo, o que ocorre normalmente na maior parte das áreas malarígenas do mundo é que a capacidade de detecção necessita de até 100 parasitos por cada microlitro de sangue (WHO, 1988).

No Brasil, o diagnóstico laboratorial adotado pelo PNCM é o método da gota espessa na identificação qualitativa e quantitativa da malária. É um método eficaz e de baixo custo.

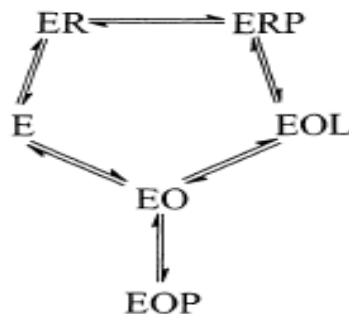
1.5.2 Diagnóstico Imunológico

Os testes imunológicos são baseados na detecção de antígenos parasitários. Primeiramente os testes utilizavam como antígeno alvo a proteína II rica em histidina (PfHRP-II) produzida pelos trofozoítos e gametócitos jovens de *P. falciparum* (Beadle *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1997; Durrheim *et al.*, 1998; Wongsrichanalai, 1999). A HRP-2 é uma proteína solúvel em água (Rock *et al.*, 1987), expressa na superfície da membrana dos eritrócitos infectados e por

causa de sua abundância em hemácias infectadas por *Plasmodium falciparum*, foi o primeiro antígeno a ser usado para desenvolver um TDR. Entretanto a grande limitação dos testes que utilizam essa proteína é que a PfHRP-2 é produzida somente por *P. falciparum*, assim, em áreas onde ocorrem outras espécies de *Plasmodium ssp.*, sua utilidade fica reduzida. Além disso, estudo realizado por Humar *et al.* (1997), demonstraram a persistência dessa proteína por até 28 dias após o desaparecimento da parasitemia, não sendo, portanto, um bom indicador de controle de cura.

Atualmente, o antígeno-alvo utilizado amplamente é a desidrogenase láctica (pLDH), produzida pelas formas assexuadas e sexuadas dos parasitos (Palmer, *et al.*, 1998; Iqbal, *et al.*, 1999; Moody, *et al.*, 2000; Iqbal, *et al.*, 2001).

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima intracelular que catalisa a reação reversível que envolve a oxidação do piruvato para lactato com o dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD), servindo como coenzima (Stryer, 1982). (Figura 7)



Figuras 7 - Ciclo Catalíticas, Incluindo o Complexo Inibitório Enzima-NAD⁺ - Piruvato, E: enzima, R: NADH, O: NAD, P: Piruvato e L: Lactato. (Fonte: Hewit *et al.* 1997).

A LDH é uma enzima classificada como verdadeiramente intracelular (Sullivan & Alpers, 1971) devido seu alto grau de especificidade tecidual, onde suas concentrações no tecido são 500 vezes maiores que nos níveis séricos em circunstâncias normais. (Podlasek & McPherson, 1989).

São encontradas altas concentrações de LDH no fígado, no coração, nos eritrócitos, nos músculos esqueléticos e nos rins (Calbreath, 1992). Por conseguinte, doenças que afetam esses órgãos, tais como infecções renais, infarto do miocárdio e hemólise, têm sido relacionadas às elevações significantes da atividade da LDH no soro total (Wills, 1971; Castaldo *et al.*, 1994). Além disso, outros estudos demonstraram a importância desta enzima no direcionamento do diagnóstico, prognóstico e tratamento de várias patologias de natureza crônica, como cânceres de pulmão, ovário e linfomas (Schwartz, 1992).

O ciclo de vida do *Plasmódio ssp.* no hospedeiro humano inclui o ciclo desenvolvido nas hemácias e o ciclo que acontece no parênquima das células do fígado, que provoca uma série de transformações nos hepatócitos do hospedeiro. As hemólises associadas pela invasão dos merozoítos podem contribuir para o aumento da atividade da LDH no soro durante as infecções (Miller *et al.*, 2002). Acredita-se, portanto, que a LDH assumirá importante papel, como marcador nas infecções de malária não complicadas, haja vista suas altas concentrações nos hepatócitos e hemácias (Garba & Ubom, 2005).

Estudos das vias metabólicas do plasmódio têm conduzido à identificação de enzimas estruturalmente diferentes as do hospedeiro. A lactato desidrogenase (LDH) do parasito tem sido identificada como diferente da LDH-

humana tanto em nível bioquímico quanto em nível imunológico. Os plasmódios necessitam da presença da LDH para assegurar o metabolismo dos carboidratos (25 – 50 vezes maior que nos glóbulos vermelhos sadios), considerando que requerem um alto nível de produção energética para uma rápida multiplicação durante o desenvolvimento intraeritrocitário (Deharo *et al.*, 2000).

Os testes rápidos utilizam o princípio da imunocromatografia e são realizados em fitas de nitrocelulose contendo anticorpos monoclonais contra antígenos específicos do parasito. São úteis para triagem e mesmo para confirmação diagnóstica, podendo ser utilizados em situações em que há dificuldades para o processamento do exame da gota espessa, como em áreas longínquas e de difícil acesso aos serviços de saúde (Brasil, 2004).

Segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde, os testes de diagnóstico rápido imunocromatográficos devem ser tão precisos quanto os resultados derivados da microscopia executada por um técnico em condições de campo. A sensibilidade deve ser superior a 95% quando comparada com a microscopia, e a detecção da parasitemia, em níveis de 100 parasitos/ μ l (0,002% parasitemia) deve ser detectada confiantemente com uma sensibilidade de 100%. Informações quantitativas ou semiquantitativas sobre as densidades parasitárias circulantes no sangue é essencial. Outros critérios essenciais sugeridos são a habilidade para distinguir parasitos viáveis de produtos de parasito como antígenos ou ácidos nucléicos associados com organismos não viáveis e também indicar o prognóstico de resultados de tratamento ou resistência a drogas antimaláricas comuns (WHO, 2000).

Palmer *et al.* (1998) avaliaram o desempenho do teste OptiMal[®] em detectar *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* durante uma epidemia de malária em Honduras. Os resultados do teste OptiMal[®] foram comparados com os resultados obtidos, da mesma amostra, através da gota espessa corada pelo Giemsa. Dos 202 pacientes suspeitos de apresentarem malária; 96 (48%) das amostras eram positivas através do exame microscópico e 91 (45%) eram positivas com o teste OptiMal[®]. Das lâminas positivas através da microscopia, foram encontradas 82% *Plasmodium vivax* e 18% de *Plasmodium falciparum*. O teste OptiMal[®] detectou *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* em 81 e 19% de casos positivos, respectivamente. A sensibilidade global obtida com o teste OptiMal[®] para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* nesta série era 94 e 88%, respectivamente, com uma especificidade de 100 e 99%, respectivamente. Amostras encontradas positivas através de microscopia, porém negativas pelo OptiMal[®] (3%) tinham menos que 100 parasitos/ μ l de sangue (0,002% parasitemia).

Palmer *et al.* (2003) realizaram um estudo multicentrico em seis hospitais norte americanos, para o diagnóstico da malária, através do teste OptiMal[®] e comparados com a microscopia óptica. O teste OptiMal[®] identificou e diferenciou os parasitos da malária de *P. falciparum* de não - *P. falciparum* em amostras de sangue de pacientes. Das 216 amostras de pacientes suspeitos de malária testados, 43 amostras (20%) era positivo para parasitos da malária pela microscopia (32 *P. falciparum* e 11 não - *P. falciparum*) enquanto 42 (19%) era positivo pelo teste OptiMal[®] (31 *P. falciparum* e 11 não - *P. falciparum*). A sensibilidade do teste OptiMal[®] foi de 98%, sua

especificidade era de 100%, com valor preditivo positivo e negativo de 100% e 99%, respectivamente. Os médicos que faziam parte da equipe do hospital e os diretores de laboratórios informaram independentemente que o teste rápido OptiMal[®] foi preciso, fácil usar, e bem aceito pelos trabalhadores do laboratórios de diagnóstico. A conclusão geral foi que a integração do teste rápido OptiMal[®] na infra-estrutura dos hospitais norte-americanos forneceria uma ferramenta importante e de fácil utilização para o diagnóstico da malária.

Um estudo realizado por Penhabel *et al.* (2005), avaliou o desempenho do teste de imunocromatografia, OptiMAL-IT[®] para o diagnóstico da malária em uma região da Amazônia brasileira sob diferentes condições de armazenamento. O OptiMAL-IT[®] foi armazenado a três diferentes temperaturas (25°C, 30°C e 39°C) para 24, 48 e 72 horas antes de uso. Um total de 141 amostras foram testadas pela gota espessa e pelo teste OptiMAL-IT[®], sendo que 111 foram positiva para malária (75 *P. vivax*, 34 *P. falciparum* e 02 de *P. malariae*). O teste OptiMAL-IT[®] detectou todas as amostras positivas corretamente, com exceção das duas amostras de *P. malariae*. Possivelmente pelo fato que estas amostras mostraram baixa parasitemia, menor que 100 parasitos por microlitro de sangue, que é uma limitação do teste. Os resultados mostram excelente desempenho do teste OptiMAL-IT[®] sob as diferentes condições avaliadas.

Chayani *et al.* (2004), compararam a habilidade do teste OptiMal[®] e da gota espessa, para o diagnóstico da malária. Amostras de 232 pacientes suspeitos de terem malária foram analisadas. Um total de 122 amostras (52,5%) era positivo para a gota espessa, enquanto, 118 (50,8%) era positivo

para o teste OptiMal[®]. A gota espessa indicou que 21,4% (26 de 122) dos pacientes eram positivos para o *Plasmodium falciparum* e 78,6% (96 de 122) estavam infectados com *plasmodium vivax*. O teste OptiMal[®] mostrou que 21,2% (25 de 118) eram positivos para *plasmodium falciparum* e 78,8% (93 de 118) estavam infectados com *Plasmodium vivax*. Este ensaio teve sensibilidades de 88,4% e 96,8% comparadas respectivamente com a gota espessa para descoberta de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*. Assim o teste OptiMal[®] pode ser efetivo para a diagnóstico rápido da malária.

Os testes sorológicos utilizados para detectar anticorpos não são aplicados rotineiramente, pois a presença de anticorpos no soro de pacientes, não significa necessariamente presença da infecção ativa, tendo em vista que os anticorpos podem permanecer algum tempo depois da cura. Por essa razão, nas áreas onde a malária é endêmica ou já foi, eles são úteis para medir o grau de endemicidade da doença; verificar a presença ou ausência de infecções maláricas; delinear as zonas maláricas; detectar as mudanças estacionais de transmissão; investigar a reintrodução da malária nas zonas com programas de controle; e avaliar as atividades antimaláricas. Nas zonas onde a malária não é endêmica, os métodos sorológicos são úteis para selecionar doadores de sangue; elucidar casos clínicos indefinidos; avaliar a terapêutica; diagnosticar casos febris com exame parasitológico negativo; detectar malária em pessoas que regressam de zonas endêmicas; e detectar indivíduos com formas latentes da doença (principalmente os infectados por *P. vivax* e *P. malariae*) (Rey, 2001).

Entre os inúmeros testes sorológicos, os métodos de Imunofluorescência indireta, hemaglutinação, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), radioimunoensaio estão entre os mais usados rotineiramente, entretanto nenhum deles, até o momento, pode substituir a demonstração do parasito no sangue, pois são limitados pela necessidade de um aparato complexo, apresentam baixa sensibilidade ou especificidade, e uma inabilidade para distinguir infecções ativas de infecções pregressas. No entanto, podem ser úteis em estudos soropidemiológicos, na determinação da endemicidade de uma determinada área ou na identificação de um provável foco da doença (Ávila & Ferreira, 1996; Rey, 2001; Ferreira, 2004; WHO, 2000; Srinivasan *et al.*, 2000).

1.5.3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Diferentes métodos têm sido propostos visando alcançar melhor índice de sensibilidade e especificidade em comparação com o da gota espessa. O Quantitative Buffy Coat (QBC) (Spieman *et al.*, 1988), é uma técnica em que os parasitos da malária são detectados por meio de um microscópio fluorescente em tubos capilares centrifugados contendo laranja de acridina e um anticoagulante. Constitui um teste específico e oito vezes mais sensível que a gota espessa, apresenta maior reprodutibilidade, e é considerado um teste rápido, de fácil execução e leitura, e, portanto, uma técnica recomendada para triagem em banco de sangue. Porém apresenta alto custo, além da dificuldade de realização em áreas remotas, pois necessitam de

um conjunto de aparatos sofisticados essenciais para sua realização. (Rey, 2001; Ferreira, 2004; WHO, 2000).

O método da Polymerase Chain Reaction (PCR) (Barker *et al.*, 1992), de amplificação gênica usando oligonucleotídeos contendo seqüência específica de cada espécie de plasmódio, é uma técnica com alta sensibilidade e especificidade. A importância da PCR reside na possibilidade do seu uso em laboratórios de referência para o diagnóstico de malária e na caracterização da área de estudo com avaliação da dinâmica de transmissão do parasito. Entretanto, requer procedimento demorado e condições de laboratório e de equipamentos sofisticados, permanecendo sua utilização em investigações científicas. A PCR pode detectar um único parasito em uma amostra de 20 µl de sangue, além de diferenciar cepas de cada espécie de plasmódio (Laserson *et al.*, 1994; WHO, 2000; Igreja *et al.*, 2001; Rey, 2001; Farrell, 2003; Di Santi *et al.*, 2004).

Kain *et al.* (1994), estudando o desaparecimento de parasitos de *P. falciparum* durante o tratamento encontraram que a PCR permanecia positiva, em média de 144 h, comparado a 66 h com a microscopia. Os autores também informaram que se a PCR rendesse resultados positivos durante 5 a 8 dias após o tratamento, poderia ser indicativo de fracasso terapêutico, possivelmente devido a resistência do parasito à droga. Porém, estudos posteriores realizados por Srinivasan *et al.*, (2000), detectaram através da PCR a existência de DNA circulante de parasitos não-viáveis, após instituição de terapêutica adequada, indicando desse modo, que essa reação é capaz de

detectar qualquer fração de DNA parasitário, não sendo eficaz na avaliação de sucesso ou fracasso terapêutico.

Sendo a malária uma das principais endemias a assolar a região Amazônica e ter como característica distribuição heterogênea, padrões epidemiológicos distintos, áreas onde o acesso é difícil e às vezes impossível, ainda contamos com a deficiência de pessoal capacitado para executar o diagnóstico através da microscopia convencional da gota espessa. Na região existem várias áreas onde a infra-estrutura não permite a utilização da microscopia óptica, sendo assim, esse trabalho se propõe a avaliar o nível de confiabilidade do teste OptiMAL-IT[®], no diagnóstico da malária, em áreas de transmissão do estado do Amapá, comparando-os com os resultados obtidos na gota espessa em procedimento concomitante.

Considerando o acima exposto, pode-se evidenciar que esse estudo poderá contribuir para a demonstração da aplicabilidade da metodologia como um instrumento alternativo para o diagnóstico da malária em áreas remotas ou naquelas onde há dificuldade de execução do método tradicional, tornando, portanto, o diagnóstico ágil e eficaz para a identificação dos casos e orientação dos respectivos tratamentos.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral

- ❖ Avaliar o nível de concordância entre o teste imunocromatográfico OptiMAL-IT[®] e a gota espessa (GE) na rotina do diagnóstico da malária no Município de Mazagão.

1.6.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar a sensibilidade e especificidade do teste OptiMAL-IT[®] comparando-o com a gota espessa;
- ❖ Avaliar o impacto da nova metodologia na rotina da rede de laboratórios;
- ❖ Avaliar as limitações do teste OptiMAL-IT[®] frente as baixas parasitemias, infecções mistas e infecções com detecção apenas de gametócitos pela gota espessa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo descritivo do tipo transversal para avaliar o método imunocromatográfico (Medeiros & Ferraz, 1998) que consistiu da avaliação dos resultados do diagnóstico laboratorial da malária, realizado no laboratório da Unidade de Saúde do Município de Mazagão – AP, durante o período de dezembro de 2005 a junho de 2006.

As lâminas examinadas pelo laboratório da Unidade de Saúde foram encaminhadas para o LACEN-AP (Laboratório Central de Saúde Pública) para a realização do controle de qualidade das mesmas.

2.2 ÁREA DE ESTUDO

O Município de Mazagão encontra-se a 36 Km da capital ao sul do Estado do Amapá, com uma área de aproximadamente 1.313 km e uma população, segundo o IBGE (2000), estimada em 11.989 habitantes. Com relação aos aspectos geográficos do município, se destaca a contribuição das bacias hidrográficas dos rios Jari, Cajari, Tambaqui, Ariramba, Ajuruxi, Maracá-Pucu, Mazagão, Rio Preto e Vila Nova. O relevo é constituído pela Serra do Iratapuru e pelas planícies e áreas de igapó. A vegetação caracteriza-se por matas densas, arbustos e campos alagados (Figura 8).

A maioria dos habitantes não é beneficiada pelo sistema de abastecimento de água tratada e a coleta de lixo domiciliar é bastante precária, o que tem contribuído para a disseminação de doenças no local. A população dispõe de serviços de energia elétrica durante 24 horas.

A comunidade conta com atendimento do serviço público do estado, através da Unidade Hospitalar Estadual de Saúde e com o apoio da Prefeitura municipal, que é responsável pelo funcionamento de seis (06) equipes do Programa Saúde da Família, PSF (AMAPA.NET, 2007).

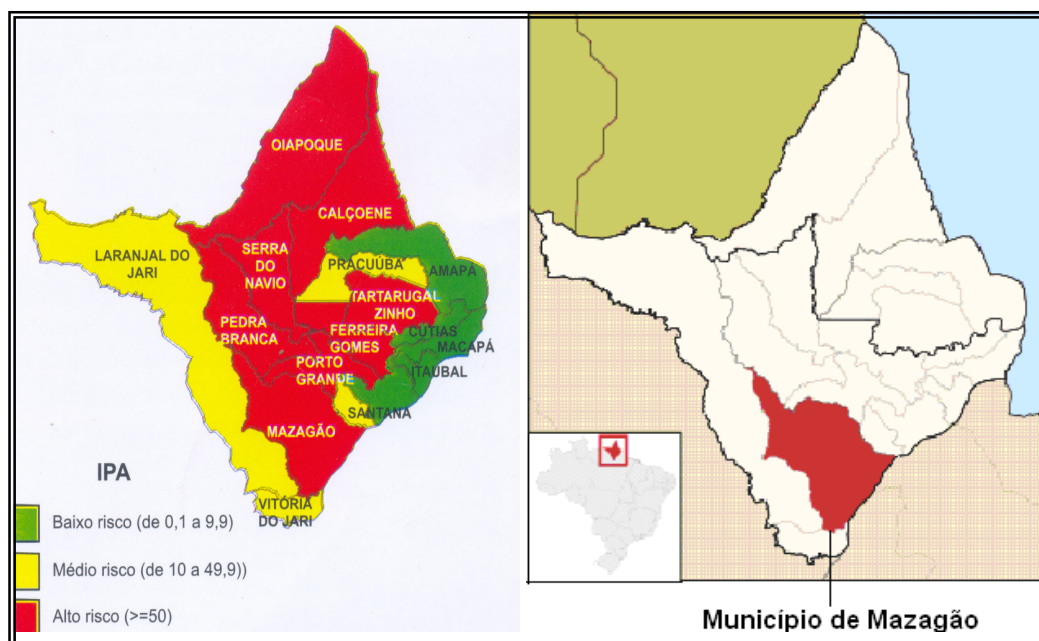


Figura 8: Localização do Município de Mazagão - AP - Brasil. (Fonte:

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Mazag%C3%A3o_\(Amap%C3%A1\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Mazag%C3%A3o_(Amap%C3%A1)))

2.3 CASUÍSTICA

Os 413 indivíduos incluídos no estudo foram selecionados por demanda espontânea e atendidos na Unidade Mista de Saúde de Mazagão. Em cada um dos pacientes foi realizado o teste OptiMAL-IT® e confeccionadas duas lâminas de gota espessa, sendo que uma lâmina foi lida no local da coleta

e a outra destinada ao LACEN para controle de qualidade. Utilizaram-se como critérios de inclusão a demanda espontânea. A idade variou de 8 a 60 anos, indivíduos de ambos os sexos, residentes no município de Mazagão e com sinais e sintomas de malária não grave. Foram excluídos, aqueles que não aceitaram participar do estudo ou não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I).

2.4 AMOSTRA

2.4.1 Amostras Para o Diagnóstico da Malária e Determinação da Parasitemia

Foram coletados gotas de sangue com volume aproximado de 20 μ L extraídas com lancetas descartáveis, através de punção da polpa digital dos participantes do estudo, e aplicados em lâminas de vidro para a confecção da gota espessa.

2.5 MÉTODO LABORATORIAL

2.5.1 Diagnóstico Parasitológico da Malária e Quantificação da Parasitemia

O diagnóstico parasitológico da malária é definido pela presença de formas eritrocíticas do parasito no sangue periférico. Neste estudo foi utilizada a técnica da gota espessa, que consistiu na coleta de uma gota de sangue por punção digital. O sangue coletado foi desmembrado, utilizando-se corantes vitais, azul de metileno e o Giemsa, segundo a técnica de Walker (OPAS/OMS, 1975).

A leitura foi feita por meio da microscopia óptica, com o aumento de 100X com a objetiva de imersão e examinando-se 100 campos microscópicos. Considerou-se negativa quando, ao examinar, no mínimo 200 campos da gota espessa, não se visualizou formas assexuadas do agente etiológico. A margem de erro admissível no momento da revisão das lâminas pela Organização Pan-Americana da Saúde é o encontro de no máximo três parasitos em uma lâmina diagnosticada como negativa, uma vez que pacientes febris em decorrência da infecção malárica apresentam na maioria das vezes parasitos em abundância (BRASIL, 2004; OPAS, 1975; 1988).

2.6 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA COM O TESTE OPTIMAL-IT[®]

As amostras de sangue total foram testadas com o OptiMAL-IT[®], que utiliza uma fita de nitrocelulose coberta com anticorpos monoclonais contra a enzima pLDH (lactato desidrogenase do plasmódio). Essa enzima é um metabólico produzido ativamente por todas as espécies de parasito da malária humana durante o seu ciclo nas hemácias. O OptiMAL-IT[®] mede a atividade enzimática do parasito, indicando apenas a presença dos que estão viáveis. O princípio do ensaio é que a enzima pLDH tem características bioquímicas diferentes da LDH humana, podendo ser então medidas distintamente usando um ensaio colorimétrico por detecção de anticorpos.

Esse teste permite a rápida detecção dessas proteínas dos plasmódios em virtude de serem produzidas apenas por parasitos vivos, logo seus níveis acompanham a parasitemia periférica funcionando como um bom

indicador de infecção. Vale ressaltar que o teste utiliza anticorpos monoclonais contra a pLDH não ocorrendo reação cruzada com a LDH humana.

O resultado permite a identificação do *P. falciparum*, mas não das demais espécies (*P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*), além disso, detecta a pLDH a partir 100 a 200 parasitos/ μ l, e normalmente torna-se negativo 4 a 5 dias após um tratamento eficaz. Pode ser útil na determinação de sucesso ou falha terapêutica, sendo utilizado no controle de cura. O desempenho do teste varia de acordo com o nível de parasitemia, sendo de forma geral a sensibilidade superior a 90%, com especificidade próxima a 100%.

O princípio do teste Imunocromatográfico consiste na migração de um líquido através da superfície de uma membrana de nitrocelulose. Três anticorpos monoclonais são usados no OptiMAL-IT[®] (Flow Inc., Portland, Oreg.), dois deles são panespecíficos (6C9 e 19G7) e reconhecem todas as quatro espécies de plasmódio humano. O terceiro é específico (17E4), somente para a LDH do *Plasmódio falciparum*. O anticorpo panspecífico 6C9 é conjugado à partícula de ouro (indicador) e é usado para capturar toda a pLDH antigênio malárica presente na amostra de sangue e é capturada. Os outros dois anticorpos monoclonais (19G7 e 17E4) agem como um ponto de captura fixos no Dipstick imunocromatográfico. O 19G7 é um anticorpo panspecífico para captura do antigênio das quatro espécies. O complexo ouro conjugado antigênio /anticorpo forma uma linha vermelha à faixa de captura. A presença de anticorpo de cabra monoclonal de captura na linha do controle indica um teste favorável (Figura 9) (Moody, 2002).

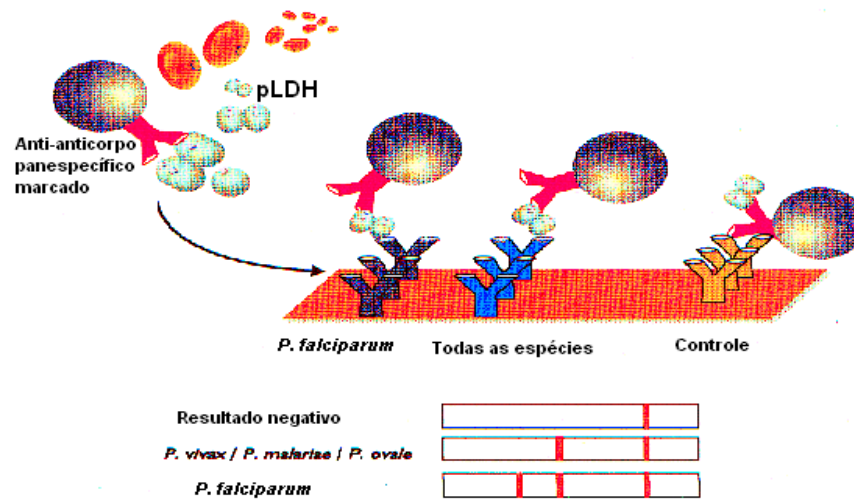


Figura 9- Representação Esquemática do Teste OptiMAL-IT®. (Fonte: DIAMED).

O teste rápido baseia-se na determinação da desidrogenase láctica (OptiMal®) do *P.falciparum* e do não-*P. falciparum*, com os seguintes procedimentos: a) Depositou-se uma gota da solução tampão, no primeiro poço marcado de vermelho (20 μ L de solução tampão) e quatro gotas (80 μ L de solução tampão) no segundo poço; b) Seguidamente realizou-se uma punção digital e se obteve uma amostra de sangue (aproximadamente entre 10 e 20 μ L) com a ajuda de uma micropipeta descartável; c) Colocou-se a amostra no primeiro poço com a gota da solução tampão e homogeneizou-se por um minuto; d) Emergiu-se a fita de nitrocelulose no primeiro poço por 10 minutos; e) Depois de 10 minutos transferiu-se a tira reativa para o segundo poço que continha a solução tampão, onde permaneceu por mais 10 minutos. Em seguida, realizou-se a leitura e a interpretação do teste.

2.6.1 Leitura do resultado do teste OptiMAL-IT®

A tira reativa utilizada contém zonas de reação com diferentes anticorpos. O primeiro é um anticorpo monoespecífico que reconhece somente a enzima desidrogenase láctica do *P. falciparum* e fica localizado na zona inferior terminal da tira. O segundo anticorpo é panspecífico e está localizado imediatamente acima do anterior e reconhece a enzima desidrogenase láctica do não-*P. falciparum*. Uma terceira zona de reação está localizada na zona superior da tira e contém anticorpos que capturam o excesso de conjugado, servindo como controle para o ensaio.

As interpretações dos testes foram realizadas de acordo com o protocolo estabelecido: A) Positivo para *P. falciparum*: presença de uma linha na zona do anticorpo específico para *P. falciparum*, outra linha na zona controle e outra na zona do anticorpo panspecífico; B) Positivo para não - *P. falciparum*: presença de uma linha na zona controle e uma linha na zona do anticorpo panspecífico; C) Negativo: Presença somente da linha controle no início da fita (Figura 10).

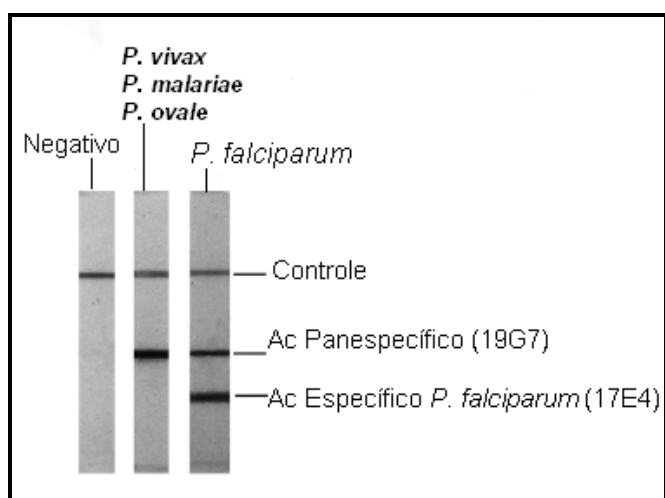


Figura 10 - Possíveis Resultados do Teste OptiMAL-IT® (Fonte: Piper *et. al.* 1999.)

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

Os pacientes candidatos ao presente estudo, manifestaram por escrito a sua concordância em participar da pesquisa, exigência para que fossem incluídos.

O estudo foi desenvolvido com material biológico coletado para as pesquisas vinculadas ao Projeto da Rede Amazônica da Vigilância da Resistência Às Drogas Antimaláricas (RAVREDA), aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas.

Os pacientes incluídos tiveram seus resultados confirmados por dois métodos distintos além de receberem tratamento imediato e seus respectivos controles, implicando em menores possibilidades de evolução para casos graves.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações foram armazenadas em banco de dados Microsoft® Access 2000, e foi utilizado o programa BioEstat 4.0 (Ayres *et al.*, 2005) para as análises estatísticas dos resultados obtidos.

Para estimar o desempenho do teste foram considerados os valores da sensibilidade, da especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN).

Os parâmetros foram determinados pelo Crivo teste ou *Screenig* teste foi aplicado nas tabelas de contingência, para serem encontrados os valores da sensibilidade, da especificidade, VPP e VPN. Os resultados gerados pela gota espessa foram considerados como o padrão ouro.

Os resultados foram fundamentados em quatro interpretações: Verdadeiro-positivo, quando positivo é confirmado pelo teste ouro (Gota Espessa); Falso-positivo se o teste revelou positividade na ausência da confirmação do teste ouro; Verdadeiro-negativo, ao excluir a possibilidade da doença em indivíduo que realmente não a possui, logo concordando com o resultado negativo do teste ouro; Falso-negativo, quando não detecta a doença nos casos positivos.

Os resultado encontrados pelo método de diagnóstico TDR-OptiMAL-IT[®] foram comparados com os resultados obtidos pela gota espessa e interpretados segundo os arranjos de uma tabela de contingência de 2 x 2, conforme esquematizado no quadro 1.

Para estimar a sensibilidade evidenciamos o número de testes (OptiMAL-IT[®]) positivos que foram confirmados pelo teste ouro (GE) que realmente apresentem a doença, com a demonstração do agente etiológico (Diagnóstico Parasitológico), VP(a) sobre o número total de testes positivos. Ou seja: **Sensibilidade = $a / a+c$ ou $VP / VP+FN$.**

Quadro 1. Interpretações possíveis para os resultados do teste em avaliação.

		GOTA ESPESSA	
		(+)	(-)
OptiMAL-IT [®]	(+)	VP(a)	FP(b)
	(-)	FN(c)	VN(d)

Legenda: VP = Verdadeiro-positivo; VN = Verdadeiro-negativo; FP = Falso-positivo; FN = Falso-negativo.

Conforme Sabbatini (1995), Define-se especificidade como a proporção de testes (OptiMAL-IT[®]) negativos confirmados pelo teste ouro (GE), ou seja os verdadeiros-negativos, VN(d) sobre o número total de testes negativos. Ou seja: **Especificidade = $d / b+d$ ou $VN / VN+FP$.**

Distinguem-se dois outros parâmetros importantes nessa avaliação. O Valor Preditivo Positivo (VPP), que se referem à probabilidade dos indivíduos terem a doença, já que o teste é positivo, e o Valor Preditivo Negativo (VPN) refere-se à probabilidade dos indivíduos não terem a doença, visto que o resultado do teste foi negativo.

O VPP pode ser expresso pela relação entre os testes (OptiMAL-IT[®]) positivos que realmente foram confirmados pela GE sobre o total de todos os testes positivos. Ou seja: **VPP = $a / a+b$ ou $VP / VP + FP$.**

O VPN será o número de testes (OptiMAL-IT[®]) positivo, mas que não foram confirmados pela (GE) sobre o total de testes negativos. Ou seja: **VPN = $d / c + d$ ou $VN / VN + FN$.**

Quanto a precisão do teste, esta foi estimada pela acurácia, ou seja, a frequência com que o (OptiMAL-IT[®]) acerta o resultado em concordância com a GE (Sabbatini, 1995).

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE MAZAGÃO

O número de casos de malária registrados no município de Mazagão nos anos de 2005 e 2006 está ilustrado na Tabela 1. Evidenciou-se que apesar da significativa redução no número absoluto de casos de malária nesse período, o município continua apresentando índices malariométricos que refletem elevados riscos de transmissão, tais como IPA = 424,7/1000 hab. e IFA= 31,6% em 2005 e IPA= 191,8/1000 hab. e IFA= 23,1% em 2006.

Considerando o relatório epidemiológico da malária para o Estado do Amapá referente ao biênio 2005/2006, reportado pelo SIVEP-Malária, evidencia-se que a contribuição do município de Mazagão para o total de casos do Estado é de 24,6% e 11% respectivamente nos anos 2005 e 2006.

Tabela 1 - Número de casos notificados de malária no município de Mazagão – AP. e sua distribuição por espécie, no período de dezembro de 2005 a junho de 2006.

Anos	População	IPA	IFA	Pf*	Pv*	Pm*	Total
							Positivos
2005	13.235	424,7	31,6	1.730	3.872	19	5.621
2006	13.912	191,8	23,1	598	2.045	25	2.668

Fonte: SIVEP-MAL, 2007

IPA: Índice Parasitário Anual

IFA: Índice de Falciparum Anual

* Pf: *P.falciparum*; Pv: *P.vivax*; Pm: *P.malariae*

A distribuição espacial dos casos suspeitos de malária no município de Mazagão segundo observações da demanda espontânea na Unidade Mista de Saúde, reporta 413 atendimentos para pesquisa de plasmódio que estratificados por área de procedência registram-se 292 (70,7%) de origem rural e 121 (29,3%) da área urbana. Tabela 2.

Esse quadro sugere que a busca pelo diagnóstico na sede do município é decorrente de uma deficiência na rede de diagnóstico do município quer pela má qualidade, quer pela ausência deste serviço em função da dificuldade de acesso a essas áreas ou pela total ausência de infra-estrutura nas mesmas.

Tabela 2 - Distribuição dos casos suspeitos de malária, nas áreas urbana e rural do município de Mazagão -AP, dezembro de 2005 a junho de 2006.

ÁREA	NÚMERO ABSOLUTO	PERCENTUAL
URBANA	121	29,3%
RURAL	292	70,7%
TOTAL	413	100%

Fonte: Unidade Mista de Saúde de Mazagão.

As Tabelas 3 e 4 consolidam informações relativas à eficácia do diagnóstico quando avaliadas em função do tempo decorrido entre o início

efetivo do tratamento e a coleta da amostra de sangue para o diagnóstico, bem como do início dos primeiros sintomas da doença, respectivamente.

Com relação ao tempo de coleta, o diagnóstico e o início do tratamento estão acontecendo em torno das primeiras 24 horas e alcançando uma eficácia de 98,97% e 99,24% no período. Entretanto, quando se considera diagnóstico e tratamento em relação ao início dos primeiros sintomas a resolução para diagnóstico e tratamento fica em 28,1% e 21,68% para um período menor ou igual a 24 horas; 14,44% e 11,87% entre 25 e 48 horas e além de 49 horas, 21,24% e 13,95%, respectivamente, para os anos de 2005 e 2006 com elevada proporção de situações não informadas, registrando-se 36,31% e 52,5% nos respectivos anos, fato que demonstra uma elevada fragilidade no serviço de diagnóstico e tratamento na rede de serviços do município.

Tabela 3 - Avaliação da eficácia do diagnóstico em função do tempo entre o início do tratamento e após a coleta da amostra, no município de Mazagão, dezembro de 2005 a junho de 2006.

ANOS	EXAMES REALIZADOS	TEMPO EM HORAS			NÃO INFORMADO
		≤ 24	25 A 48	≥ 49	
2005	3.870	98,97	0,28	0,75	00
2006	1.979	99,24	0,10	0,66	00

Fonte: SIVEP-Malária (20/11/2007)

Tabela 4 - Avaliação da eficácia do diagnóstico em função do tempo entre o início do tratamento e o início dos primeiros sintomas, no município de Mazagão, dezembro de 2005 a junho de 2006.

ANOS	EXAMES REALIZADOS	TEMPO EM HORAS			NÃO INFORMADO
		≤ 24	25 A 48	≥ 49	
2005	3.870	28,01	14,44	21,24	36,31
2006	1.979	21,68	11,87	13,95	52,5

Fonte: SIVEP-Malária, 2007

3.2 CARACTERÍSTICAS DA REDE DE DIAGNÓSTICO DO MUNICÍPIO DE MAZAGÃO

Atualmente existem 17 unidades ou laboratórios locais notificantes para a malária em todo o município de Mazagão, objetivando atender as 324 localidades existentes no mesmo. (SIVEP-SVS/MS, 2007). Nesses laboratórios locais, o diagnóstico da malária é realizado através da gota espessa, onde 100% das lâminas positivas e 10% das lâminas negativas são enviadas para os laboratórios de revisão, considerados referência para o diagnóstico da endemia e que executam o controle de qualidade desses exames microscópicos.

No estado do Amapá existem dois laboratórios de revisão, um no município de Santana e outro no município de Porto Grande. As lâminas de GE dos laboratórios locais de Mazagão são enviadas para o Laboratório de

Revisão de Santana, onde após a revisão, são encaminhadas para o Laboratório Central (LACEN), em Macapá, para a realização do controle de qualidade do diagnóstico (SIVEP/SVS/MS, 2007).

No que diz respeito à saúde, a população urbana de Mazagão conta com atendimento do serviço público do Estado e com o apoio da Prefeitura Municipal, a Unidade Mista de Saúde é a única unidade notificante da sede do município, embora esse posto de notificação funcione em condições precárias.

3.3. CONCORDÂNCIA DO TESTE OPTIMAL-IT[®] FRENTE A GOTA ESPESSA

Com relação a concordância nos diagnósticos entre o teste OPTIMAL-IT[®] e a Gota Espessa, a Tabela 5 evidencia que das 413 amostras analisadas, o Optimal e a Gota Espessa concordaram para o *P. vivax* em 225 amostras, para o *P. falciparum* em 85 amostras e em 96 resultados negativos, determinando uma sensibilidade global do teste de 98,1%, uma sensibilidade para o *P. falciparum* de 97,7% e para o não - *P.falciparum* de 98,2%. Nas amostras analisadas não foram detectadas infecções mistas, assim como, infecções somente de gametócitos.

Podemos observar na Tabela 6, que quando estratificamos a parasitemia, a sensibilidade do teste OPTIMAL-IT[®] reduz em nível de 75% para *P. vivax* e *P. falciparum* na presença de baixas parasitemias (< 50/mm³), elevando sua concordância a medida que a parasitemia atinge níveis a partir de 100 parasitos/mm³

Tabela 5 - Avaliação da concordância entre o TDR-OptiMAL-IT[®] e a Gota Espessa, no diagnóstico da malária no município de Mazagão- AP- Brasil, Dezembro de 2005 a junho de 2006.

GOTA ESPESSA					
		<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	Negativo	TOTAL
O P T I M A L	<i>P. falciparum</i>	86	00	00	86
	<i>P. vivax</i>	00	225	00	225
	Negativo	02	04	96	102
	TOTAL	88	229	96	413
		S Pf = 97,7% E Pf = 100%	S Pv = 98,2% E Pv = 100%	S _{Global} = 98,1%	

Fonte: Primária , 2007

Tabela 6 - Avaliação da sensibilidade do TDR-OptiMAL-IT® no diagnóstico da malária, frente a estratificação por densidade parasitária, no Município de Mazagão, dezembro de 2005 a junho de 2006.

Parasitemia mm ³	Espécies	GE Positiva	OptiMAL-IT®		Sensibilidade %
			Positivo	Negativo	
< 50	<i>P. vivax</i>	12	09	03	75%
	<i>P. falciparum</i>	08	06	02	75%
50 – 100	<i>P. vivax</i>	02	01	01	50%
	<i>P. falciparum</i>	02	02	00	100%
101 – 200	<i>P. vivax</i>	01	01	00	100%
	<i>P. falciparum</i>	00	00	00	00
201 – 500	<i>P. vivax</i>	11	11	00	100%
	<i>P. falciparum</i>	11	11	00	100%
501 – 1000	<i>P. vivax</i>	34	34	00	100%
	<i>P. falciparum</i>	10	10	00	100%
> 1000	<i>P. vivax</i>	169	169	00	100%
	<i>P. falciparum</i>	57	57	00	100%

Fonte: Primária, 2007

GE = gota espessa

4- DISCUSSÃO

No Brasil, a região Amazônica concorre com mais de 99,5% dos casos de malária (Brasil, 2007). O diagnóstico precoce e tratamento oportuno dos casos é a atual e principal estratégia recomendada pela OMS frente ao controle da doença. O método de referência para o diagnóstico parasitológico da malária é o da gota espessa. Apesar de apresentar inquestionável vantagem para o diagnóstico da doença e ser considerado como padrão ouro, o exame da gota espessa pode apresentar uma série de fatores que podem interferir nos resultados obtidos, entre eles, a competência técnica no preparo da lâmina, seu manuseio e coloração, qualidade ótica e iluminação do microscópio, competência e cuidado por parte do microscopista e grau de parasitemia.

Considerando-se esses fatores, realizar o diagnóstico da malária torna-se difícil em muitos locais, seja pela precariedade dos serviços de saúde, seja pela dificuldade de acesso da população aos centros de diagnóstico. Por esta razão, nos últimos 15 anos, métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos a fim de amenizar esses problemas. São alternativas eficazes para o diagnóstico microscópico tradicional da malária que podem ser utilizados em áreas de difícil acesso ou onde não há disponibilidade para realização da gota espessa.

Os testes de diagnóstico rápido para malária funcionam como ferramentas alternativas para o diagnóstico da doença e assim aumentam as chances de um diagnóstico precoce acompanhado de um tratamento mais rápido e adequado, interrompendo a transmissão da doença na área e

diminuindo os níveis de morbi-mortalidade, daí a proposição para este estudo, uma vez que faltam dados na literatura acerca do comportamento destes testes no Estado do Amapá.

4.1. FATORES ASSOCIADOS À EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

Contribuindo para ratificar a falta de uma vigilância epidemiológica eficaz, observamos que a intensidade da transmissão, apesar do número absoluto de casos não ser o maior da região Amazônica, é elevada em grande área do Estado, onde o risco de adoecer ou morrer por malária segundo a classificação do IPA, passou de 41,2/1000 habitantes em 2005 para 40,4/1000 habitantes em 2006. Segundo a classificação deste indicador malariométrico, o Amapá apresenta 50% dos seus municípios com elevado risco de transmissão (IPA > 50/1000 habitantes), 12,5% com moderado risco (IPA entre 49 a 20/1000 habitantes) e 37,5% com baixo risco (IPA abaixo de 20/1000 habitantes) (SIVEP-MAL, 2007).

A contribuição do Estado em função do agente etiológico neste período mostra que a espécie prevalente foi o *P. vivax*, com 16.073 casos em 2005 e 17.770 casos em 2006. A situação com relação à malária por *P. falciparum*, no entanto, não está menos preocupante com um pequeno decréscimo nas notificações de 6.385 para 5.860 casos em 2005 e 2006 respectivamente. Apesar de se ter uma predominância do *P. vivax*, podemos observar que a malária por *P. falciparum* continua sendo um problema, pois o IFA (Índice de *Falciparum* Anual) que mede o risco de se contrair malária por *P. falciparum*, passou de 28,9/1000 habitantes em 2005 para 25,4/1000

habitantes em 2006 se mantendo num patamar elevado com 6.385 e 5.860 casos registrados em 2005 e 2006. O fato desta espécie de plasmódio estar elevada sinaliza a fragilidade na qualidade do diagnóstico no Estado, apesar da ampliação da rede com a implantação do PIACM. A oferta de gametócitos de *P. falciparum* que começa por volta do 5º dia de doença, provavelmente está intensa nestas áreas, o que justifica o aumento deste índice malariométrico.

Na Amazônia, a maior parte dos casos de malária é devida ao *P. vivax*, no entanto, apesar de haver uma redução geral no número de casos na região, é preocupante o incremento do percentual de casos de malária por *P. falciparum*, o que favorece a ocorrência da doença nas suas formas graves e aumento da possibilidade de óbitos. No período de 1999 a 2004, a proporção de malária por *P. falciparum* aumentou 27,4%, sendo os principais responsáveis por esta situação o Amapá (272,6%), Maranhão (112,3%), Rondônia (22,5%), Pará (19,2%) e Amazonas (11,5%) (Brasil, 2005).

Um estudo realizado por Snow *et al.* (2005), motivado pela necessidade de definir as populações de risco para malária, mostrou que ela está restrita às populações pobres e que reúnam condições climáticas apropriadas para sua manutenção. Eles usaram uma combinação de dados epidemiológicos, geográficos e demográficos e mapearam os casos de *P. falciparum* no mundo, detectando que em 2002 foram registrados 515 milhões de episódios de *P. falciparum*, significando 50% a mais do que o estimado pela OMS e 200% a mais para as áreas fora da África, refletindo a intensidade da subnotificação dos casos e as falhas na vigilância epidemiológica nestas áreas.

Na região Amazônica a predominância é do *P. vivax* com cerca de 75% dos casos em toda região contra 25% dos episódios de *P. falciparum* (Brasil, 2005).

Os indivíduos são contaminados tanto na área rural quanto na área urbana e são predominantemente adultos do sexo masculino. Isto está de acordo com estudos realizados na região Amazônica, onde o grande percentual de trabalhadores nos garimpos está concentrado no sexo masculino, apesar das mulheres já terem uma participação efetiva no desenvolvimento de atividades como cozinheira e comerciantes nestas áreas (Couto *et al.*, 1993; 1995; 2001).

4.2- FATORES ASSOCIADOS AO DIAGNÓSTICO

O tempo para procura do diagnóstico precoce e correto é um indicador da precariedade da educação em saúde nas áreas malarígenas do Estado e esta situação não é diferente em Mazagão. Um percentual de 28%, 14,4% e 21,2% procuraram o diagnóstico no 1º dia, entre o 2º e 3º dias, a partir do 4º dia no ano de 2005 além do percentual de 36,3% de casos não informados. Da mesma forma em 2006, 21,6% procurou o exame para realização do diagnóstico no 1º dia; 11,8% no 2º e no 3º dias; 13,9% tardiamente a partir do 4º dia, além do elevado percentual de casos não informados em 52,5%, o que tem sido decisivo para a manutenção da transmissão e gravidade da doença.

Quando analisamos o tempo de tratamento após a realização da hemoscopia temos que em 2005 e 2006, 98,9% e 99,2%, o fizeram dentro das primeiras 24 h respectivamente.

Avaliando os Estados do Amazonas, Pará e Rondônia no SIVEP-Malária, (2007), observamos que 31,4%, 39,2% e 45,8% procuraram o diagnóstico nas primeiras 24 h após início dos sintomas e 89,4%, 97,7% e 91,1% dos pacientes procuram o tratamento a partir de 24 h do resultado do exame respectivamente.

Quando observamos os dados da região Amazônica como um todo, verificamos que o tempo de procura do diagnóstico após início dos sintomas nas primeiras 24 h é de 39,9%, entre 25 a 48 h de 16,3% , mais de 49 h é de 33,6% e um percentual de 10% de casos não informados. Com relação ao tratamento após o resultado diagnóstico na região malarígena, temos que 93,9% o realizam nas primeiras 24 h; 0,15% entre 25 e 48 h; 1,04% após 49 h e um percentual de 4,8 % de casos não informados. Estes resultados estão de acordo com o que ocorre em Mazagão.

Podemos apontar vários fatores que justificam os baixos percentuais de busca de diagnóstico nas primeiras 24 h, como as áreas de difícil acesso, a insuficiência na estrutura dos serviços locais de saúde, a falta de infraestrutura nos laboratórios da rede e de recursos humanos devidamente capacitados no diagnóstico da malária, o baixo controle de qualidade do diagnóstico laboratorial, a falta de métodos diagnósticos rápidos para áreas de difícil acesso.

Observamos, no entanto que o tratamento após o diagnóstico ocorre em níveis bastante satisfatórios na região Amazônica, uma vez que o medicamento é dispensado no momento em que o paciente busca seu

resultado de exame que na grande maioria das localidades é realizado em pouco tempo, dando oportunidade ao paciente de aguardá-lo.

4.3- FATORES ASSOCIADOS À RESOLUÇÃO DOS MÉTODOS

Funcionando como ferramenta alternativa eficaz, os testes imunocromatográficos aumentam as chances nas regiões de difícil acesso e aonde não existe infraestrutura adequada para realização do diagnóstico precoce da malária, recomendação esta preconizada pela OMS e Ministério da Saúde, como uma das ferramentas principais no controle da endemia em áreas endêmicas.

Nossos resultados evidenciaram que das 413 amostras analisadas, obtivemos uma sensibilidade global do teste de 98,1%, assim como para a malária por *P.falciparum* a sensibilidade foi de 97,7% e para a malária por *P. vivax* de 98,2%, estes resultados estão de acordo com os de Ferro *et al.* (2002), que avaliaram o desempenho do teste OptiMal[®] para o diagnóstico da malária em um Centro de Referência da Colômbia, onde num total de 192 amostras coletadas obtiveram resultados confirmados pela gota espessa. Foram divididos dois grupos de amostras I e II, sendo que 112 faziam parte do grupo I (indivíduos positivos para *P. falciparum*, *P. vivax* ou negativos) e 80 no grupo II (que tinham seus diagnósticos realizados no Centro de Referência para Malária). A Sensibilidade global encontrada pelo OptiMal[®] para ambos os grupos de pacientes foi de 96.9%. Também encontraram elevada sensibilidade para o *P. vivax* (98.1%) e para o *P. falciparum* (94.9%).

Um outro estudo realizado por Lim & Kim (2001), também encontraram resultados bastante consistentes, onde a sensibilidade e especificidade do teste OptiMal[®] foi de 100% e os resultados estavam 100% em concordância com a microscopia da lâminas de gota espessa. Assim, o ensaio da pLDH pode ser usado como uma alternativa para a microscopia convencional em áreas onde *P. vivax* e *P. falciparum* co-existem e apóiam sua implementação onde o diagnóstico através microscopia é indisponível e em circunstâncias que excedem a capacidade da facilidade do diagnóstico microscópico local. O valor preditivo positivo, negativo e especificidade encontrados neste estudo foram de 100%, 94,12% e 100%, respectivamente.

Iqbal *et al.* (2003), avaliando a performance do teste OptiMAL[®] no Paquistão, em 930 pacientes suspeitos de malária em dois centros, encontrou sensibilidade variando de: 78 a 85%, Valor Preditivo Positivo de 89-97% e Valor Preditivo Negativo de 96 a 98% para o *P. falciparum* resultados inferiores foram encontrados para o *P. vivax*, como sensibilidade de 61-76%, Valor Preditivo Positivo de 88-95% e Valor Preditivo Negativo de 90-93%.

Grobusch *et al.* (2003), também detectaram especificidade de 100% para o teste OptiMAL[®] em turistas que retornavam de áreas endêmicas para Berlim, demonstrando a importância também nestas situações de se dispor de um teste rápido para diagnóstico e tratamento precoces.

Nossos resultados mostraram seis casos de falso-negativos com o teste OptiMAL-IT[®], quatro que apresentaram uma parasitemia menor que 50 parasitos/mm³ (sendo 02 *P. vivax* e 02 *P. falciparum*). Vale ressaltar que dois desses pacientes falso-negativos, tinham parasitemias variando entre 51-200

parasitos/mm³. A sensibilidade do teste OptiMAL-IT[®] foi menor nos casos onde a parasitemia variou entre 50 e 100 parasitos/mm³. Esses dados estão concordando com estudos realizados por Iqbal *et al.* (2002), que avaliaram o desempenho de dois testes (ICT Pf/Pv Malária e o OptiMal[®]) em relação a Gota espessa em 750 pacientes sintomáticos no Kuwait. Ambos os testes tiveram um alto grau de especificidade (>98%) para descoberta de infecção de malária, porém menos sensíveis que a microscopia. Dos 271 pacientes (11% com *P. falciparum* e 37% com *P. vivax*) o teste OptiMal[®] não detectou infecção em 41 (15%) de 271 pacientes de malária (7% de pacientes com *P. falciparum* e 13% de pacientes com *P. vivax*). A sensibilidade dos testes ICT Pf/Pv Malária e OptiMal[®] diminuíram significativamente a 23 e 44%, respectivamente, quando as densidades parasitárias eram menores que 500/μl.

Também Khan *et al.* (2004) avaliaram o desempenho do OptiMal[®] comparando sua sensibilidade e especificidade com a da microscopia em gota espessa de 215 amostras de pacientes atendidos no Hospital Militar de Rawalpindi, no Paquistão. O teste OptiMal[®] apresentou sensibilidades de 95% e 94.5% para *P. Vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, quando comparado com a microscopia em gota espessa. A especificidade para ambas as espécies foi de 100%. O OptiMal[®] não detectou duas amostras de *P. falciparum*, as quais, tiveram densidade parasitárias abaixo de 100 parasitos/μl.

Nenhum resultado falso-positivo foi encontrado com o teste OptiMAL-IT[®] em nossos resultados diferentemente do que ocorreu com os autores Pattanasin *et al.* (2003), que detectaram 17 (8%) casos de falso-positivo pelo OptiMAL-IT[®] para o *P. falciparum* (10 eram positivos para o *P.*

vivax e 7 eram negativos pela microscopia) em uma amostra de 271 pacientes na Tailândia. Assim como, Chayani *et al.* (2004), que detectaram dois (0.86%) casos de *P. falciparum* através do OptiMAL[®] e que não foram positivos na gota espessa e três casos de *P. falciparum* detectados na microscopia que também não foram detectados pelo teste rápido no estudo de 232 pacientes, na Índia, e também, Iqbal *et al.* (2003), que ao avaliarem a performance do teste OptiMAL[®] no Paquistão, em 930 pacientes suspeitos de malária em dois centros diferentes encontraram 18 (2%) casos de falso-positivo.

5- CONCLUSÕES

As observações realizadas no presente estudo permitiram uma considerável avaliação sobre a necessidade de utilização de testes de diagnóstico de rápida resolução e elevada especificidade, o que vem de acordo com as metas propostas pelo Ministério da Saúde para as áreas malarígenas do país de difícil acesso.

O estudo revela a evolução das técnicas de diagnóstico, através da aplicação de métodos imunocromatográficos, num estudo transversal no Estado do Amapá, utilizando parâmetros epidemiológicos de forma a se constituir num estudo inédito no território amapaense.

Considerando essa premissa, observamos que:

1. Tanto a área rural como a urbana do município de Mazagão, apresentaram perfis sócio-sanitários semelhantes que juntamente com as características climáticas da região, favorecem a transmissão da malária;
2. Evidenciou-se que em virtude da rapidez e eficiência do teste OptiMAL-IT[®], sua utilização em áreas de difícil acesso poderá contribuir de forma efetiva para resolução dos casos de malária, evitando principalmente que os casos de malária por *P. falciparum* evoluam para gravidade, tendo o teste uma utilização bastante promissora;
3. Evidenciou-se uma elevada sensibilidade global do teste em 98,1%, sensibilidade específica para o *P. falciparum* de 97,7% e para o não-*P. falciparum* de 98,2%, recomendando sua utilização nas áreas de difícil acesso.

4. O teste OptiMAL - IT[®] é operacionalmente importante nos casos de malária por *P.falciparum*, embora apresente uma redução na sensibilidade frente às baixas parasitemias, infecções mistas e aquelas que só apresentam gametócitos.
5. O impacto da utilização deste teste em áreas endêmicas sem infraestrutura e pessoal treinado para realização da gota espessa justifica o custo-benefício do teste em virtude da performance demonstrada no estudo.

Assim sendo, sugerimos que frente aos resultados obtidos com o teste imunocromatográfico OptiMAL-IT[®] no município de Mazagão no Amapá, sejam adotadas nas áreas de difícil acesso, no sentido de evitar o aumento da morbimortalidade por malária no Estado.

Existe a necessidade urgente de que o fortalecimento da vigilância epidemiológica seja intensificado, objetivando o monitoramento contínuo da expansão da rede de diagnósticos, já que este se traduz num dos principais pilares para o controle da malária na região.

É imprescindível que em áreas endêmicas que reúnem as principais características para manutenção da endemia e registros de resistência às drogas utilizadas para o tratamento, fato este importante no Estado do Amapá que sofre uma importante pressão das cepas da Guiana Francesa, se disponha de métodos diagnósticos eficazes e rápidos para contenção da endemia.

Assim sendo, este estudo se traduz de fundamental importância para o Estado constituído por 16 municípios que apresentam diversas áreas consideradas de difícil acesso, inclusive na fronteira (Oiapoque), hoje

considerada como um dos principais focos para a disseminação de cepas resistentes de *P. falciparum* e *P. vivax* no Estado. (Calvosa, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AYRES, M; AYRES JR, M; AYRES, D.L; SANTOS, A.S. **BIO ESTAT 4.0. Aplicação Estatísticas nas Áreas das Ciências Bio-Médicas.** Ed. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 2005.
- AMAPA.NET. **Município de Mazagão,** 2007. Disponível em: <http://www.amapa.net/info/mostra.phpid=58>. Acesso em 17/05/ 2007
- ÁVILA, S.L., FERREIRA, A.W. Malaria Diagnosis: a review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 29:** 431-43, 1996.
- BAIRD, J.K. Drug Therapy: Effectiveness of antimalarial Drugs. **Massachusetts Medical Society, 352:** 1565-1577, 2005.
- BEADLE, C., LONG, G.W., WEISS, W.R., MEELROY, P.D., MARET, S.M., OLOO, A.J., HOFFMAN, S.L. Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. **Lancet, 343:** 564 – 568, 1994.
- BARKER, R.H.Jr., BANCHONGAKSORN, T., COURVAL, J.M., SUWONKERD, N., RIMQUNGTRAGON, K., WIRTH, D.F. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood sample using PCR. **American journal of tropical Medicine and Hygiene, 41:** 266-272, 1992.
- BRASIL. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Controle seletivo de vetores da malária.** Brasília: FNS, 1999.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal.** Brasília: Ministério da Saúde; 2000.

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico da Malária** Nº 02 – Dezembro, Malária – Estratégia para Controle e prevenção e Situação Epidemiológica, 2003.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5^a ed. Brasília: MS/ FUNASA; 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. 1^a edição – 112 p. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**, 2007.
- BRUCE-CHWATT, L.J. **Essential Malariology**. Nova York, William Heinemann, Medical Books Ltd, 1985.
- CALBREATH, D.F. **Clinical Chemistry**. Philadelphia: WB Saunders, 1992.
- CALVOSA, V.S.P. **Resistência e Eficácia ao Tratamento da Malária no Estado do Amapá, 2001 a 2005**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Pará, Belém, 2005.
- CARTER, R., MENDIS, K.N. Evolutionary and Historical Aspects of the burden of malária. **Clinical Microbiology Reviews**, **15(4)**: 564-594, 2002.
- CASTALDO, G., ORIANI, G., CIMINO, L., TOPA, M., MOSTARDA, I., CASTELLANO, L., VECCHIO-BLANCO, C.D., BUDILLION, G., SALVATORE, F., SACCHETTI, L. Total discrimination of peritoneal malignant ascites from cirrhosis- and hepatocarcinoma associated ascites by assays of ascitic cholesterol and lactate dehydrogenase. **Clinical Chemistry**, **40**: 478-83, 1994.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of parasitic Disease- Malaria. Parasitic Disease Information, 2002.**

Disponível em < <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/malaria/default.htm> > em: 15 de julho de 2006.

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

COUTO, A. A., CALVOSA, V. S., LIMA, J. E., SOUZA, J. M. Evolução da resistência *in vitro* do *Plasmodium falciparum* a antimaláricos em áreas de prospecção de ouro no Estado do Amapá, entre 1983 e 1990. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 26(4):** 215 - 220, out-dez, 1993.

COUTO, A. A., CALVOSA, V. S., SANTOS, M. A., SOUZA, J. M. Evolução temporal da resistência *in vitro* do *Plasmodium falciparum* às drogas antimaláricas em duas áreas da Amazônia brasileira com distintas características sócio-econômicas e geográficas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 28(4):** 357 - 365, out-dez, 1995.

COUTO, A. A. , CALVOSA, V. S., LACERDA, R., CASTRO, F., SANTA ROSA, E., NASCIMENTO, J. M. Controle da transmissão da malária em área de garimpo no Estado do Amapá com participação da iniciativa privada. **Cadernos de saúde Pública, 17(4):** 897-907, 2001.

COX, F.E.G. History of human Parasitology. **Clinical Microbiology Revist, 15 (4):** 595-612, 2002.

DE OLIVEIRA-FERREIRA, J., LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R., TEVA, A., DEANE, L.M., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Natural malaria infections in anophelines in Rondonia State, Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **43**: 6-10, 1990.

DEANE, L.M. A Cronologia da Descoberta dos Transmissores da Malária na Amazônia Brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81(2)**: 149 - 56, 1989.

DEANE, LM. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81**: 5 -14, 1986.

DEANE, LM. Os Grandes marcos na história do controle da malária. Anais do 2º Simpósio de Malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **25**: 2, 1992.

DEHARO, E., GAUTRET, P., MUÑOZ, V., SAUVAIN, M. **Técnicas de laboratorio para la selección de substancias antimalaricas**. 1ª edición. La Paz, Bolívia, 2000. p. 64-66.

DI SANTI, S.M., KIRCHGATTER, K., BRUNIALT, K.C.S., OLIVEIRA, A.M., FERREIRA, S.R.S., BOULOS, M. PCR – Bases diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **46(4)**: 183 -7, 2004.

DOURADO, H., ABDON, N., MARTINS, S.J. Falciparum malaria. **Infectectious Disease Clinics of North America**, **8**:207–223, 1994.

DOWLING, M.A.C., SHUTE, G.T. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitemia. **Bulletin of the World Health Organization**, **34**:249-267, 1966.

- DURRHEIN, D.N., LA GRANGE, J.J., GOVERE, J., MNGOMEZULU, N.M.
Accuracy of a rapid immunochromatographic card test for *Plasmodium falciparum* in a malaria control programme in South Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **92(1)**: 32-3, 1998.
- FARRELL J. Malária: parasito e mosquito – a dupla imbatível. In: **A assustadora história das pestes & epidemia**. São Paulo: Editora Ediouro; 2003. p. 160-93.
- FERREIRA M.S. Malária. In: Veronesi R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo, Editora Atheneu, 2004. p. 1280-308.
- FERRO, B.E., GONZALEZ, I.J., CARVAJAL, F., PALMA, G.I., SARAIVA, N.G.
Performance of OptiMALâ in the Diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* Infections in a Malaria Referral Center in Colômbia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97(5)**: 731-735, 2002.
- FORATTINI, O.P. Culicidologia Médica: Identificação, Biologia e Epidemiologia. In: **Gênero Anopheles: Subgênero Anopheles**. EDUSP (Eds.), São Paulo, 2002, p.249.
- GARBA, I.H., UBOM, G. A. Total serum lactate dehydrogenase activity in acute *Plasmodium falciparum* malaria infection. **Singapore Medicine journal**, **46(11)**: 632-634, 2005.
- GARNHAM, P.C.C., DUGGAN, A.J. **Catalogue of the Gamhan Collection of Malaria Parasites and Other Haemosporidia**. London, William Clowes Ltd, 1986, p.191.
- GROBUSCH, M. P., HÄNSCHEID, T., GÖBELS, K., SLEVOGT, H., ZOLLER, T., RÖGLER, G., TEICHMANN, D. Sensitivity of *P. Vivax* rapid antigen

- detection tests and possible implications for self-diagnostic use. **Travel Medicine and Infectious Disease**, **1**: 119-122, 2003.
- HEWITT, C.O., SESSIONS, R.B., DAFFORN, T.R., HOLBROOK, J.J. Protein engineering tests of a homology model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase. **Protein Engineering**, **10**: 39-44, 1997.
- HUMAR, A., OHRT, C., HARRINGTON, M. A., PILLAI, D., AND KAIN, K. C. ParaSight® F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. **56**: 44 – 48, 1997.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **População residente por sexo e população cedida, segundo município, Amapá Contagem da população, 2002**. <<http://www.ibge.gov.br/estatistica/apcont96.shtm>>, 2002.
- IGREJA, R.P., GOMES, A.P., BATISTA, R.S., GONÇALVES, M.L.C. Malária In: Gomes AP, Batista RS, Gonçalves MLC, Igreja RP, Huggins WD (Org). **Medicina Tropical – Uma abordagem Atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, 2001, p.149-62.
- IQBAL, J., SHER, A., HIRA, P.R., AL-OWAISH, R. Comparison of the OptiMal-IT® test with PCR for diagnosis of malaria in immigrants. **Journal Clinical Microbiology**, **39**: 3644–3646, 1999.
- IQBAL, J., HIRA, P.R., SHER, A., AL-ENEZI, A.A. Diagnosis of imported malaria by Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) and histidine-rich protein 2 (PfHRP-2)-based immunocapture assays. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **64**: 20–23, 2001.

- IQUEBAL, J., KHALID, N. HIRA, P. Comparison of Two Commercial Assays with Expert Microscopy for Confirmation of Symptomatically Diagnosed Malaria. **Journal of Clinical Microbiology**, **40 (12)**: 4675-4678, 2002.
- IQBAL, J., MUNEEER, A., KHALID, N., AHMED, M. A. Performance of the OPTIMAL test for malaria diagnosis among suspected malaria patients at the rural health centers. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **68 (5)**: 624-628, 2003.
- KAIN, K.C., KYLE, D.E., WONGRICHANALAI, C., BROWN, A.E. Qualitative and semi-quantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. **Journal Infectious Diseases**, **170**: 1626–1630, 1994.
- KHAN, S. A., ANWAR, M., HUSSAIN, S., QURESHI, A. H., AHMAD, M., AFZAL, S. Comparison of Optimal Malarial Test with Light Microscopy for the diagnosis of Malaria. **Journal of Pakistan Medical Association**, **54**: 8, 2004.
- KILLIAN, A.H.D., METZGER, W.G., MUTSHELKNAUSS, E.J., KAGAMBE, G., LANGI, P., KORTE, R., SONNENGURG, F.V. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. **Tropical Medicine and International Health**, **5**: 3-8, 2000.
- LASERSON, K.F., PEDTROLANDA, I., HAMLIN, D.M. Use of the polimerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **50(2)**: 169-80, 1994.
- LEVINE, N.D. Blood parasites: The malaria and related parasites. In: **The**

Protozoan Phylum Apicomplexa, CRC Press Inc. Raton Florida. 02: 11-21, 1988.

LIM, H.S., AND KIM, H.S. Evaluation of Diagnostic Methods of Re-emerging Malaria in Korean Patients. **Yonsei Medical Journal**, **42(1)**: 84 -90, 2001.

LOIOLA, C.C.P., SILVA C.J.M., TAUIL, P.L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Pan-americana de Saúde Pública**, **11(4)**: 235- 44, 2002.

Malaria map. png. Disponível em: < http://commons.wikimedia.org/wiki/image:malaria_map.PNG > . Acesso em 17/05/2007.

MARQUES, A. C. GUTIERREZ, H.C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas . **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27 (3)**: 91-108, 1994.

MATSUMOTO, W. K., VICENTE, M. G., SILVA, M. A. Comportamento epidemiológico da malária nos municípios que compõem a Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso do Sul, no período de 1990 a 1996. **Caderno Saúde Pública**, **14: 4**, .797-802, 1998.

Mazagão Amapá. Disponível em: < [http://pt.wikipedia.org/wiki/Mazag%C3%A3o_\(Amap%C3%A1\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Mazag%C3%A3o_(Amap%C3%A1)) > . Acesso em: 17/05/2007.

MEDEIROS, M.M.C., FERRAZ, M.B., Pergunta principal do estudo / Conceitos básicos em epidemiologia clínica / Tipos de desenhos de estudo. **Revista Brasileira Reumatologia**, **38: 2**, 1998.

MILLER, L.H., BARUCH, D.I., MARSH, K., DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, **415 (6872)**: 673-92, 2002.

MOLINEAUX, L. The Epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implication for its control. In: WERNSDORFER,

- W. H., MCGREGOR, S.I. **Malaria – Principles and Practice of Malariology**. Edinburgh: Churchill Livingstone, V. 2, 1988. p. 913-998.
- MOODY, A, Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**: 66–78, 2002.
- MOODY, A., HUNT-COOKE, A., GABBETT, E., CHIODINI, P. Performance of the *OptiMal-IT®* malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. **Br. Journal Hematology**, **109**: 891–894, 2000.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, Organización Mundial de la Salud. **Manual para el diagnostico microscópico de la malaria**. Washington DC: OPS; 1975.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Diagnostico de la malaria**. Washington DC: OPS; 1988.
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. **Conferencia Ministerial sobre el Paludismo**; 1992 Oct 26-27; Ámsterdam, Países Bajos. Washington DC: OMS, 1992).
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **136a SESSÃO DO COMITÊ EXECUTIVO - MALÁRIA**, Buenos Aires, 2005.
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Regional Strategic Plan for Malaria in the Americas 2006 – 2010**. Washington, D.C: PAHO, 2006.
- PALMER, C.J., LINDO, J.F., KLASKALA, W.I., QUESADA, J.A., KAMINSKY, R., BAUM, M.K., AGER, A.L. Evaluation of the OptiMal-IT® test for rapid

diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria.

Journal Clinical Microbiology, **36**: 203–206, 1998.

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

PASSOS, A. D. C., FILHO, R. R. Malária: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31(2)**: 93–105, 1998.

PATTANASIN, S., PROUX, S., CHOMPASUK, D., LUWIRADAJ, K., JACQUIER, P., LOOAREESUWAN, S., NOSTEN, F., Evaluation of a new *Plasmodium* lactate dehydrogenase assay (OptiMAL-IT ®) for the detection of malaria. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **97**: 672-674, 2003.

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

PEYRON, F.G., MARTET, J.P., VIGLER, A. Dipstick antigen-capture assay for malaria detection. **Lancet**, **i**:1502–1503, 1994.

PIPER, R., LEBRAS, J., WENTWORTH, L., HUNT COOKE, A., HOUZE, S., CHIODINI, P., MAKLER, M. A capture diagnostic assay for malaria using

- Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **60**: 109–118, 1999.
- PODLASEK, S.J., MCPHERSON R.A. Streptokinase binds lactate dehydrogenase subunit-M, which shares an epitope with plasminogen. **Clinical Chemistry**, **35**: 69-73, 1989.
- RACHOU, R.G. Anofelinos no Brasil: comportamento das espécies vetoras da malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, **10**: 145-181, 1958.
- REY L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2001. p.
- ROCK, E. P., MARSH, K., SAUL, S. J., WELLEMS, T. E., TAYLOR, D. W., MALOY, W. L., AND HOWARD, R. J. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP1, HRP2 and HRP3 in malaria diagnosis of diverse origin. **Parasitology**, **95**: 209–227, 1987.
- ROSS, R. - An improved method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. **Lancet**, **i**: 86-87, 1903.
- RUSSEL, P.F., OCIDENTAL, L.S., MANWELL, R.D. **Practical Malariology**. W. B. Saunders Company (eds.), Philadelphia, 1946.
- SABBATINI, R. M.E. Um Programa para o Cálculo da Acurácia, Especificidade e Sensibilidade de Testes Médicos. **Revista Informédica**, **2 (12)**: 19-21, 1995.
- SCHWARTZ, M.K., Enzymes as prognostic markers and therapeutic indicators in patients with cancer. **Clinical Chemica Acta**, **206(1-2)**: 77-82, 1992.
- SEGURA, M.N.O. **Estudo do *Anopheles (Nyssorhyncus) darlingi* Root 1926 e *Anopheles (Nyssorhyncus) albitarsis* Arribalzaga 1878 (Diptera:**

- Culicidae) como vetores de malária numa mesma área de transmissão e caracterização das espécies do complexo albitarsis.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, 1998.
- SHANNON, R.C. Anophelines do Amazona Valley. **Proceedings of the Entomological Society of Washington, 35:** 117-143, 1933.
- SINGH, N., VALECHA, M., SHARMA, V.P. Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 91:** 396–397, 1997.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE MALÁRIA/SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA-MALÁRIA, 2007.
- SNOW, R. W., GUERRA, C. A., NOOR, A. M., MYINT, H. Y., HAY, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature, 434:** 214-118, 2005.
- SPIELMAN, A., PERRONE, J.B., TEKLEHAIMANOT, A., BALCHA, F., WARDLAN, S.C., LEVINE, R.A. Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 39:** 337-342, 1988.
- SRINAVASAN, S., MOODY, A.H., CHIODINI, P.L. Comparison of blood-film microscopy, the *OptiMa-IT*® dipstick, Rhodamine 123 and PCR for monitoring anti-malarial treatment. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 94:** 227–232, 2000.
- STRYER L. **Biochemistry.** 2nd ed. New York: WH Freeman, 1982.

- SULLIVAN, J.M., ALPERS, J.P. In vitro regulation of rat heart 5'-nucleotidase by adenine nucleotides and magnesium. **Journal of Biological Chemistry**, **246**: 3057-63, 1971.
- TADEI, W. P., MASCARENHAS, B. M., PODESTA, M. G. Biologia de Anofelinos Amazônicos VIII. Conhecimentos sobre a distribuição de espécies de *Anopheles darlingi* na região de Tucuruí – Marabá-PA. **Acta Amazônica**, **13 (1)**: p.103-140, 1983.
- THELLIER, M., DATRY, A., ALFA CISSÉ, O., SAN, C., BILIGUI, S., SILVIE, O., DANIS, M. Diagnosis of malaria using thick blood smears: definition and evaluation of a faster protocol with improvement readability. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **96**: 11-124, 2002.
- WILLS, M.R. **The Biochemical Consequences of Chronic Renal Failure**. New York: Harvey, Miller and Medcalf, 1971.
- WONGSRICHANALAI, C., CHUANAK, N., TULYAYON, S., THANOOSINGHA, N., LAOBOONCHAI, A., THAIMASARN, T.G., HAPPNER, D.G. Comparison of a rapid field immunochromatographic test to expert microscopy for the detection of *Plasmodium falciparum* asexual parasitemia in Thailand. **Acta Tropica**, **73**: 263–273, 1999.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria diagnosis. Memorandum from a WHO meeting. **Bulletin World Health Organization**, **66**: 575-594, 1988.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. New perspectives in malaria diagnosis. **Report of a joint WHO/USAID informal consultation, WHO/MAL/2000.1091**. Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. MALARIA CONTROL TODAY. Current WHO Recommendations. **WORKING DOCUMENT, Roll Back Malaria Department.** Geneva. 2005.