

**ANDRÉA LUCIANA SOARES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DO TESTE ELISA LACTATO DESIDROGENASE  
PLASMODIAL (pLDH) COMO MÉTODO DE TRIAGEM DE  
MALÁRIA EM DOADORES DE SANGUE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.  
Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos.

BELÉM  
2006

**ANDRÉA LUCIANA SOARES DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DO TESTE ELISA LACTATO DESIDROGENASE  
PLASMODIAL (pLDH) COMO MÉTODO DE TRIAGEM DE  
MALÁRIA EM DOADORES DE SANGUE**

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

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos  
Departamento de Genética, UFPA.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Lacy Cardoso de Brito Júnior  
Departamento de Patologia, UFPA.

Profa. Dra. Marinete Marins Póvoa  
Seção de Parasitologia, IEC.

Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha  
Departamento de Patologia , UFPA.

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto (Suplente)  
Departamento de Patologia , UFPA.

Belém, 02 de outubro de 2006.

“A arte tem dupla face, a da expressão da realidade e a da ilusão. Assim como a ciência tem duas caras, a da realidade do erro e a do fantasma da verdade.”

(René Daumal)

## **DEDICÁTORIA**

Aos meus pais Paulo e Geraldina, pelo amor e dedicação de vocês durante a minha trajetória.

Aos meus irmãos Aldo e Paulo André pela carinho despendido nessa caminhada.

A minha querida vizinha Zenaide pelos seus ensinamentos sábios.

Ao meu noivo Igor pelo amor incondicional demonstrado por mim ao longo dessa caminhada. Eu te amo muito! Obrigada por existir na minha vida.

**AMO TODOS VOCÊS!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter iluminado meu caminho nesta longa e dura estrada da vida.

A minha irmã que não veio dos meus pais: minha cunhada Gracielle, onde me trouxe mais uma alegria com a minha primeira sobrinha a linda “Gabi”.

As minhas outras duas cunhadinhas (Márcia e Brenda), por me aturarem nos meus inúmeros momentos de mau-humor.

Aos colegas do laboratório: Adriana, Aldemir, Carol Moreira, Magaly, Maslova, Marcos e Priscilla, pelos favores realizados, e por me aturar nos momentos mais estressantes.

Ao meu orientador Prof. Alexandre pela paciência, dedicação e principalmente pela confiança que depositou em mim nos momentos em que eu menos confiava.

Ao Professor Lacy Cardoso de Brito Júnior pela sua amizade e companheirismo durante o mestrado, além da imensa contribuição na realização desse trabalho.

A Fundação HEMOPA, pela oportunidade oferecida para o desenvolvimento deste projeto.

A CAPES pelo suporte financeiro a mim concedido durante o período referente ao curso de mestrado realizado na UFPA.

À Universidade Federal do Pará, curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela oportunidade de avançar os meus conhecimentos profissionais.

A DiaMed por ceder os kits de ELISA utilizados na realização desse estudo.

A todos os membros da seção de parasitologia do IEC, em especial aos pesquisadores Dra. Marinete Marins Póvoa, Msc. Giselle Rachid Viana e Msc. Ediclei

do Carmo, por de terem cedidos seus laboratórios e material para realização desse trabalho, além das inúmeras sugestões, vocês foram peças fundamentais para a conclusão do mesmo. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, pela paciência e compreensão durante esses dois anos de curso.

Aos meus amigos de infância Lalá, Hal, Thay, Miga e Rafa, que apesar da distância sempre estarão no coração.

Aos amigos do mestrado: Auris, Bruna, Clayton, Izis, Karol, Maria Helena, Renato e Victor pelas caronas, pelas risadas, pelas brigas e por todos os outros momentos especiais que passamos durante esses dois anos.

A minha amiga Áurea Leonor pelas correções e sugestões feitas no abstract.

Ao meu amigo Dani que sempre está disposto a me socorrer e ajudar nos meus maiores momentos de aflição.

A minha amiga Nathália pelo companheirismo até altas horas da noite nos laboratórios do IEC.

## SUMÁRIO

EPÍGRAFE .....	03
DEDICATÓRIA .....	04
AGRADECIMENTOS .....	05
SUMÁRIO .....	07
RESUMO .....	09
ABSTRACT.....	10
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	11
1.2 TIPOS DE PLASMÓDIOS .....	13
1.3 CICLO EVOLUTIVO .....	13
1.4 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA .....	17
1.4.1 <b>No Mundo</b> .....	17
1.4.2 <b>Nas Américas</b> .....	18
1.4.3 <b>No Brasil</b> .....	19
1.5 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MALÁRIA .....	20
1.5.1 <b>Métodos Laboratoriais</b> .....	21
1.6 LACTATO DESIDROGENASE PLASMODIAL (pLHD).....	25
1.7 INFECÇÕES ASSINTOMÁTICAS POR <i>Plasmodium</i> .....	26
1.8 MALÁRIA TRANSFUSIONAL.....	27
1.9 OBJETIVOS.....	31
1.9.1 <b>Geral</b> .....	31
1.9.2 <b>Específicos</b> .....	31

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
2.1	DESENHO DO ESTUDO.....	32
2.2	ÁREAS DE ESTUDO.....	32
2.3	AMOSTRAS.....	36
2.3.1	<b>Controles</b> .....	37
2.4	ELISA-Malária <i>Antigen Test</i> .....	38
2.5	EXTRAÇÃO DO DNA.....	42
2.6	REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	43
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	46
3.1.	AVALIAÇÃO DO TESTE ELISA.....	46
3.2	ANÁLISE DOS CONTROLES.....	47
3.3.	TESTE ELISA X IPA.....	51
3.4	ANÁLISE DE DO/ <i>Cutoff</i> ENTRE CIDADES.....	52
3.5	ANÁLISE DO NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS POR CIDADE.....	53
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	69
	<b>ANEXO</b> .....	85

## RESUMO

A TTM (Malária Transmitida por Transfusão) ocorre através de qualquer componente de sangue que contenha eritrócitos que possam abrigar parasitas viáveis, porém, casos envolvendo plaquetas, leucócitos e plasma congelado têm sido reportado. As principais causas de relatos de TTM é a presença de baixa parasitemias em pacientes assintomáticos. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do *ELISA-Malaria Antigen Test*, que faz a captura do antígeno pLDH (Lactato Desidrogenase Plasmodial), como método de triagem de malária em doadores de sangue. Para a realização deste estudo selecionamos 1670 amostras das Unidades de Coleta e Transfusão (UCTs) das cidades do interior Estado do Pará: Altamira, Castanhal, Marabá, Santarém e Tucuruí e da capital Belém, sendo que desta tivemos amostras de um outro grupo, os de doadores que estiveram em zonas endêmicas 30 dias antes da doação. As amostras foram coletadas em duas estações (seca e chuva). Observou-se que o *ELISA-Malaria Antigen Test* é um teste sensível e prático, porém ajustes ainda devem ser feitos no ponto de corte estabelecido pelo fabricante, pois de acordo com a sua faixa só foi possível a detecção de 0,42% de amostras positivas e quando o ponto de corte foi ajustado com amostras do grupo controle, esse número passou para 4,37%. Não foi encontrada diferença sazonal no número de casos positivos e negativos, mas quando analisamos os  $\Delta DO/Cutoff$  das amostras de todas as cidades, observamos diferenças significativas, o que demonstrou que a cidade de Belém possuía a menor possibilidade de encontro de casos de malária do que nas amostras das cidades de Altamira, Santarém e nas da Zona Endêmica. Os casos de TTM, embora não sejam comuns dentro de áreas não endêmicas, podem ocorrer, pois os doadores implicados em TTM invariavelmente apresentam baixas parasitemia, o que dificulta a detecção dos parasitas pelos métodos disponíveis. Assim, para uma boa triagem de doadores, estratégias efetivas devem ser criadas, incluindo triagens clínico-epidemiológicas, associadas a ferramentas sorológicas eficazes para assegurar a qualidade do sangue disposto à doação.

## ABSTRACT

The TTM (Transfusion-Transmitted Malaria) happens through any component of blood that contains erythrocytes that can shelter viable parasites, even so, cases involving platelets, leukocytes and frozen plasma have been reported. The main causes of reports of TTM is the presence of low parasitemias in patients without signs. The objective of this work was, initially, to verify the efficiency of the ELISA-Malaria Antigen Test, that makes the capture of the antigen pLDH (Lactate Dehydrogenase Plasmodial), to be used in the future as malaria screen in donors of blood. For the accomplishment of this study we selected 1670 samples of the Units of Collection and Transfusion (UCTs) of the cities of the interior of Pará: Altamira, Castanhal, Marabá, Santarém, Tucuruí and Belém, and of this last city, capital of the State, we had samples of another group, the one of donors that were in endemic zones 30 days before the donation. All the samples had its collection divided in two periods (dryness and rain). It was observed that ELISA-Malaria Antigen Test is a sensible and practical test, even so, repairs still should be done in the court point established by the maker, because in agreement with its strip it was only possible the detection of 0,42% of positive samples and when the court point was adjusted with samples of the group it controls, that number passed for 4,37%. It was not found seasonal difference in the number of positive and negative cases, but when an analysis was made with  $\Delta DO/Cutoff$  of the samples of all the cities, we noticed that they presented significant differences in its results, demonstrating that the city of Belém possesses the smallest probability of meeting cases of malaria than in the samples of the cities of Altamira, Santarém and in the one of the Endemic Zone. The cases of TTM although they are not common inside non endemic areas, they can happen, because the donors invariably implied in TTM possess low parasitemias, wich make difficult the detection of the parasites for the available methods. Thus, for a good screen of donors, effective strategies should be created, including clinical-epidemic screens, associated to effective tools serological enough to assure the quality of the blood arranged to the donation.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A palavra malária surgiu na Itália no século XVII onde eles atribuíram os quadros de febre romana ao mau ar (mal'aria) vindo dos pântanos. O primeiro a descrever as manifestações da doença e correlacioná-las ao local em que viviam e época do ano foi Hipócrates. Em 1880 o agente etiológico da malária foi identificado, pelo médico francês Charles Alphonse Laveran, quando observou organismos em movimento em uma preparação de sangue de uma paciente com sinais e sintomas sugestivos de malária (Bruce-Chwatt, 1980). Em 1899, o ciclo evolutivo completo do agente etiológico em seres humanos foi descrito por Grassi e colaboradores. No ano seguinte foi confirmado por Ronald Ross que a malária era transmitida por mosquito do gênero *Anopheles* (Bruce-Chwatt, 1985).

A malária é transmitida para humanos através da inoculação de esporozoítos por mosquito fêmea da ordem dos dípteros, família *Culicidae* e do gênero *Anopheles* que possuem como preferência criadouros de águas límpidas e sombreadas, mas também utilizam pequenas poças para o seu desenvolvimento. Existem cerca de 400 espécies distribuídas pelo mundo, mas somente 60 são vetores da malária humana (Bruce-Chwatt, 1988). As principais espécies transmissoras pertencem a dois subgêneros: *Nyssorhincus* e *Kerteszia* (Rachou, 1958, Deane, 1986). No Brasil, o principal vetor é o *Anopheles (N) darlingi*, bastante freqüente na Amazônia, presente em quase todo o território brasileiro, sendo responsável pela transmissão no interior do Brasil e cerca de 80% em todo país (Xavier & Rebelo, 1999). Porém outras espécies exercem importante papel na transmissão como o *A. (N.) aquasalis*, que se distribui pela

faixa litorânea que vai do Amapá até o norte de São Paulo e tem como criadouros preferenciais coleções de água salobra, o *A.(K) cruzii*, e o *A. (K) bellator*, que estão presentes na região da Mata Atlântica, e possuem como criadouros preferenciais a água acumulada nas folhas de plantas bromeliáceas (Deane, 1986). A espécie antes conhecida como *A.(N.) albitarsis*, atualmente é considerada um conjunto de quatro espécies, com diferentes capacidades vetoriais (Wilkerson *et al.*, 1995a, Segura, 1998). Duas delas já foram encontradas naturalmente infectadas por *Plasmodium*, no Brasil, o *A.(N.) marajoara* que existe tanto no interior como no litoral, encontrada naturalmente infectada no Amapá e tem hábitos domésticos (Wilkerson *et al.*, 1995b; Pova *et al.*, 2000; Silva-Vasconcelos *et al.*, 2002) e o *A.(N.) deaneorum*, encontrado no Acre e em Rondônia (Freitas, 1989; Wilkerson *et al.*, 1995b). As outras duas espécies o *A. (N.) albitarsis sensu strictu* e o *A. (N.) albitarsis B* não consideradas espécies transmissoras.

É observado que em áreas de alta transmissão ocorre uma variação sazonal no número de casos, onde o período de maior ocorrência é encontrado no final da estação chuvosa, quando há um aumento na densidade vetorial (Camargo *et al.*, 1996).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 500 milhões de pessoas estejam infectadas por plasmódios no mundo, das quais aproximadamente 2,5 milhões morrem anualmente.

A malária é uma endemia e ainda continua sendo um grave problema de saúde pública, que ocorre, principalmente, nos países de clima tropical e subtropical. Estimativas da Organização Mundial da Saúde é de que mais de 2 bilhões de pessoas estão expostas ao risco de adquirir malária, e as áreas geográficas onde ocorrem a transmissão compreendem cerca de 100 países. Essas áreas consideradas endêmicas,

estão localizadas nas regiões mais pobres (África, Ásia e América do Sul e Central), onde a malária tem atuado como um fator limitante do crescimento demográfico, social e econômico. (WHO, 2002).

## 1.2. TIPOS DE PLASMÓDIOS

A malária é uma doença parasitária sistêmica causada por protozoários intracelulares pertencentes ao filo *Apicomplexa*, ordem *Eucoccidiida*, família *Plasmodiidae* e gênero *Plasmodium*, existindo cerca de 125 espécies capazes de infectar répteis, aves e mamíferos, das quais apenas quatro infectam seres humanos, o *P. malarie* (Laveran, 1881), *P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welth, 1887) e o *P. ovale* (Stephens, 1922).

Os plasmódios humanos são parasitos intracelulares obrigatórios que infectam e destroem os eritrócitos durante a fase assexuada. O *Plasmodium falciparum* é responsável pela forma mais grave da malária humana, capaz de infectar os eritrócitos em qualquer etapa maturativa, produzindo alta parasitemia, sendo comumente encontrado nas regiões tropicais (Gilles, 1993; Souza *et al.*, 2000).

O *P. malarie* é responsável pela malária benigna e infecta as hemácias maduras, o *P. vivax* e o *P. ovale*, também são agentes de malária e que parasitam preferencialmente os reticulócitos (Souza *et al.*, 2000).

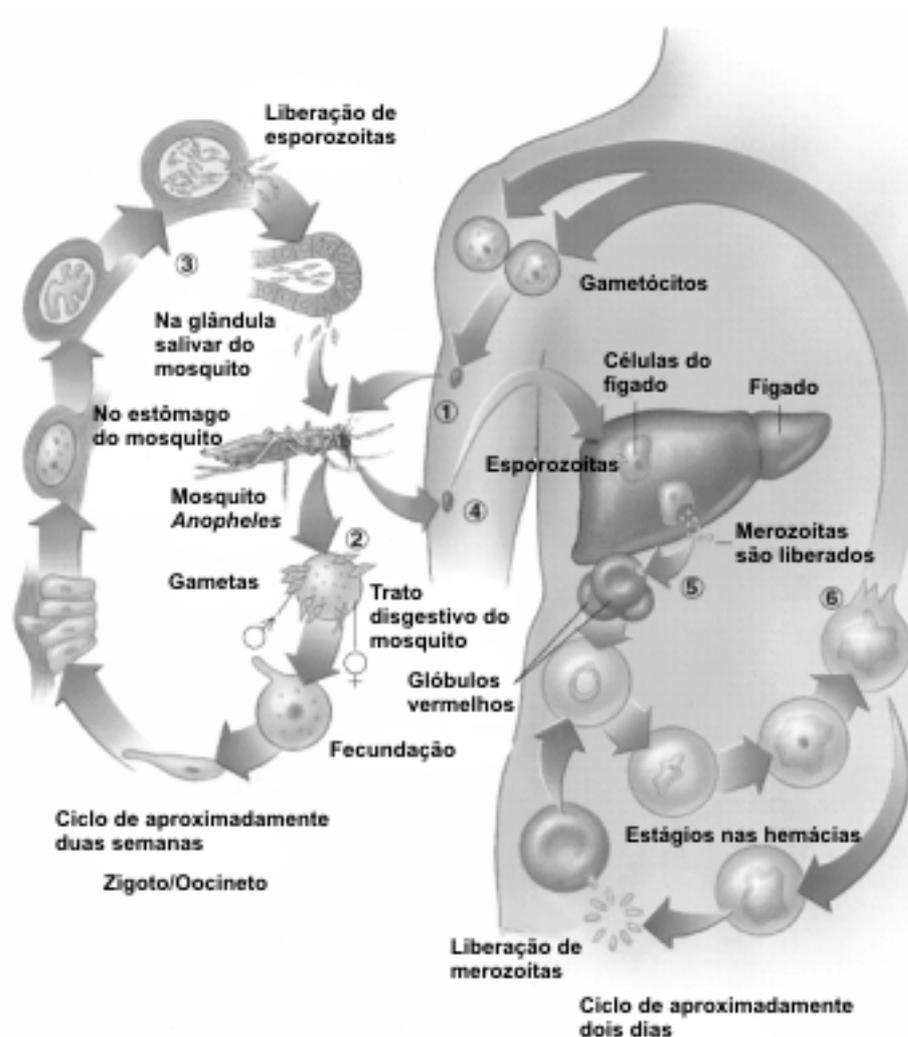
## 1.3. CICLO EVOLUTIVO

Os protozoários do gênero *Plasmodium* possuem um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, uma fase assexuada endógena ou esquizogônica que se multiplica no hospedeiro intermediário vertebrado, que pode ser ave, réptil, primata, roedor e

humano. A outra fase, sexuada exógena ou esporogônica, ocorre com multiplicação no hospedeiro definitivo invertebrado (Gilles, 1993; Souza *et al.*, 2000).

Em seres humanos, o ciclo esquizogônico possui duas fases, a primeira que é a pré-eritrocítica que ocorre nas células hepáticas e a segunda eritrocítica que ocorre nas hemácias (Hviid, 1998; Miller *et al.*, 2002).

A malária é transmitida ao hospedeiro vertebrado, quando o anofelino fêmea faz o repasto sanguíneo liberando junto com a saliva os esporozoítos que são formas infectantes para humanos. Eles são inoculados no tecido subcutâneo ou diretamente na corrente sanguínea, iniciando a etapa pré-eritrocítica (Miller *et al.*, 2002) (Figura 1). Os esporozoítas, após alguns minutos, são transportados pela circulação sanguínea até o fígado, onde penetram nos hepatócitos, local onde o parasita encontra boas condições para fazer a esquizogonia. No *P. ovale* e *P. vivax*, os esporozoítas podem permanecer latentes no interior do hepatócito por vários meses, em uma forma conhecida como hipnozoítos, produzindo recaídas quando saem tardiamente na circulação, enquanto isso os esporozoítas do *P. falciparum* e *P. malarie* iniciam imediatamente o processo de esquizogonia (Krotoski, 1985; Ashley, 2006).



**Figura 1:** Ciclo de vida do *Plasmodium* (Adaptado de Solomon, *et. al.*, 1999).

Após a penetração, ocorrerá à diferenciação dando origem aos esquizontes hepáticos. Esse processo é chamado de esquizogonia exoeritrocítica gerando os esquizontes teciduais primários, que ao amadurecer rompem os hepatócitos liberando os merozoítos nos capilares intra-hepáticos, assim alcançando a corrente circulatória e invadindo as hemácias (Krotoski, 1985; Farid *et al.*, 1993).

Dependendo do tipo de *Plasmodium*, o número de merozoítas originados nos hepatócitos varia, assim como o período para a ruptura e liberação dos merozoítas,

podendo ser de 6 a 15 dias de acordo com a espécie (Mota & Rodriguez, 2001; Moore *et al*, 2002).

Ao saírem dos hepatócitos, os merozoítas invadem os eritrócitos e se replicam produzindo formas aneladas chamadas trofozoítas, que utilizam a hemoglobina das hemácias para a sua nutrição. Posteriormente sofrerão divisão nuclear passando a esquizontes, que se diferenciarão em merozoítas eritrocíticos, onde após a ruptura dos eritrócitos serão liberados e irão parasitar outros eritrócitos, repetindo o ciclo (Botero & Restrepo, 1998; Hviid, 1998).

Para que o ciclo esquizogônico eritrocítico se mantenha, é necessário que cada trofozoíto dê origem de 20 a 30 merozoítos, que continuarão invadindo as hemácias, isso faz com que a carga parasitária aumente no sangue do indivíduo, ocorrendo a manifestação dos sintomas da doença (Rosemberg *et al.*, 1990).

Apenas uma pequena parte da população dos merozoítos irão se diferenciar em gametócitos femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos), que são as formas infectantes para o vetor. A partir daí começa a fase sexuada do ciclo do parasita, nos mosquitos do gênero *Anopheles*. (Bruce *et al.*, 1990; Krettli, 1994; Souza & Riler, 2002).

As hemácias que contém os gametócitos são rompidas após terem sido ingeridas pelo mosquito, o gametócito masculino irá originar os microgametas através do processo denominado de exflagelação. Os microgametas fecundarão os gametócitos femininos, formando o zigoto ou oocineto, que migrará através das células epiteliais do estômago do vetor se transformando em oocisto, que irá se fixar na membrana basal do intestino médio e sofrerá mudanças na sua estrutura se transformando em esporozoítas. Quando ocorre a ruptura do oocisto maduro, os esporozoítos são liberados através da

hemolinfa para as glândulas salivares do vetor. A duração desse ciclo dentro do vetor varia de 7 a 14 dias após a infecção, dependendo do tipo de *Plasmodium*. Após essa série de eventos o vetor está apto para infectar os hospedeiros dando continuidade ao ciclo (Bruce *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 2002).

#### 1.4. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

##### 1.4.1. No Mundo

Esta parasitose representa uma das principais endemias mundiais, e é responsável por aproximadamente 1.5 a 2.7 milhões de óbitos por ano. No momento, encontra-se limitada à África, Ásia e Américas, apresentando assim um caráter endêmico em 91 países, sendo um dos principais determinantes de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento de áreas tropicais e subtropicais. O continente africano é o responsável por 90 % dos casos mundiais, ocorrendo cerca de 15 a 25% em crianças com menos de cinco anos de idade (WHO, 1998; 2002). Em 2003 dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que 350–500 milhões de pessoas no mundo ficaram doentes por causa da malária (Korenromp *et al.*, 2005).

Apesar dos inúmeros esforços para controlar a doença, o aparecimento de resistência dos plasmódios as drogas, migração e turismo para países endêmicos, têm aumentado o número de casos em alguns países. Aproximadamente 25.000 turistas adquirem malária a cada ano, e talvez desses nem 100 sobrevivam a infecção (Wellems & Miller, 2003).

#### **1.4.2. Nas Américas**

No ano de 1998 as Américas possuíam cerca de 803 milhões de habitantes, dos quais 38,4% viviam em áreas onde as condições ambientais eram propícias à transmissão da malária. Dos 37 países e territórios membros da Organização Panamericana de Saúde (OPAS), 21 desses países se encontram em regiões com transmissão ativa de malária, do total de habitantes 47,6% vivem nas zonas expostas a algum risco de transmissão.

A detecção dos casos aumentou entre 1997 a 1998 de 135,5 a 160,51/100.000 de habitantes da população da América e de 350,8 a 418,31/100.000 da população residente em áreas ambientais favoráveis a transmissão.

Em 2000, foram notificados nas Américas 1,14 milhão de casos de malária, com 82,5% oriundos de apenas cinco países: Brasil com 53,6%; Colômbia 9,45%; Equador 8,65%; Peru 6,12% e Guatemala com 4,68% (WHO, 2002)

No ano 2002, o número de pessoas que habitavam zonas de condições ecológicas ideais à transmissão de malária era 262 milhões, cerca de 31% da população. Essas condições contribuíram para o aumento no número de casos da doença, sendo então registrados 885.000 casos de malária neste mesmo ano na região das Américas, dos quais 39,6% ocorreram no Brasil, onde as condições sócio-culturais da população e a presença de florestas tropicais são fatores que contribuem para a manutenção da endemia (OPAS, 2003).

No ano de 2003, o número de pessoas que habitavam essas zonas ecológicas subiu para 302 milhões, tendo uma decaída no seu número em 2004 para 264 milhões (WHO, 2005).

### 1.4.3. No Brasil

No Brasil a malária está concentrada na Amazônia Legal (99% das notificações) (SVS/MS, 2003). Por compreenderem regiões tropicais com baixa densidade populacional, há dificuldades de acesso a algumas localidades, comprometendo a detecção e acompanhamento clínico de todos os casos da doença nestas regiões (Marques & Gutierrez, 1994; Passos & Fialho, 1998).

Durante a década de 40 e 50, a malária encontrava-se sob controle no território brasileiro, tendo até sido erradicada em algumas regiões anteriormente consideradas endêmicas, mas no final da década de 60 e início da década de 70 a situação epidemiológica da malária voltou a se agravar, devido principalmente às alterações sócio-econômicas e aquelas ocorridas no ecossistema (FUNASA, 2003). Esse aumento no número de casos foi determinado principalmente pela implantação de projetos de integração da Amazônia com o resto do país, como a construção de novas rodovias, abertura de projetos de colonização e expansão de áreas de garimpos, o que levou ao estabelecimento de um fluxo migratório imenso e intenso de pessoas na grande maioria vindas das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sul do país, todos suscetíveis (Machado *et al.*, 2003; Loiola *et al.*, 2002; Tauil, 1986).

A Amazônia brasileira possui características climáticas e ecológicas favoráveis à transmissão da doença. Nessa região, a malária não se apresenta com uma distribuição homogênea, ocorrendo situações epidemiológicas diferentes, devido às características da ocupação da região (Marques, 1986).

Em 2000, o Ministério da Saúde/FUNASA diante da grave situação em que o Brasil se encontrava, com a presença de altos níveis de casos de malária, criou o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM), formado pelos

Estados da região amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Roraima, Rondônia e Tocantins). As medidas adotadas revelaram uma inversão do crescimento da doença em 2001 e 2002, registrando cerca de 388 e 358 mil casos respectivamente, enquanto em 1999 foram registrados cerca de 630 mil casos nos nove estados incluídos no programa (Loiola *et al.*, 2002; SVS/MS, 2003).

Em 2003, ocorreu um aumento no número de casos de malária, com o registro de 404 mil casos da doença. No estado do Pará, 123 mil casos foram registrados. Nos últimos anos o Estado registrou uma média de 45% do total de casos de malária, entretanto em 2004 obteve o seu percentual reduzido para 27,9% (SVS/MS, 2003). No período de 2000 a 2003 foram registrados 10.627 casos de malária (SESPA, 2004), com destaque para as áreas alvos desse estudo: Altamira, Castanhal, Marabá, Santarém e Tucuruí, locais periurbanos do município de Belém, que possuem transmissão ativa de malária, durante uma grande parte do ano.

### 1.5. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DA MALÁRIA

Nos últimos anos o Ministério da Saúde em parceria com estados e municípios, tem intensificado as ações de controle da malária na Amazônia, com o objetivo de reduzir a incidência, evitar o surgimento de epidemias localizadas, reduzir a sua gravidade e, conseqüentemente o número de internações e óbitos.

Os municípios foram priorizados a partir de alguns critérios epidemiológicos: Incidência Parasitária Anual (IPA) maior de 49.9 casos por mil habitantes, compor o conjunto dos municípios responsáveis por 80% dos casos de malária do estado, apresentar proporção de malária *falciparum* superior a 20% do total de casos ou ser capital do estado com transmissão urbana de malária(OPAS, 2000).

### 1.5.1 Métodos Laboratoriais

Para atingir as principais metas de controle da malária são utilizados alguns instrumentos importantes como os métodos laboratoriais para diagnóstico. Essas metas abrangem o diagnóstico precoce e preciso, tratamento imediato e eficaz, o que é importante tanto na prática clínica como em inquéritos epidemiológicos. (WHO, 1999; 2000).

O teste diagnóstico padrão ouro é a gota espessa (GE), que apresenta sensibilidade e especificidades satisfatórias, permitindo a identificação das espécies do gênero *Plasmodium* e de suas diferentes fases de desenvolvimento, além de quantificar as formas parasitárias observadas (Ross, 1903). Essa técnica, entretanto possui alguns fatores limitantes, como a conservação da morfologia do parasito, o que dificulta a interpretação, necessitando de um corpo técnico altamente treinado e especializado (Ávila & Ferreira, 2000).

Outros métodos alternativos como os métodos imunocromatográficos, ensaios imunoenzimáticos e até algumas ferramentas da Biologia Molecular, através da utilização da Reação da Cadeia da Polimerase (PCR), vêm sendo produzidos e testados para o diagnóstico da malária, visando suprimir os limites apresentados pela técnica da GE (Philips, 2001).

Os testes rápidos para diagnósticos através da imunocaptura (RDTs) têm como base a detecção do antígeno da malária, e foram desenvolvidos para diminuir o tempo de execução, melhorando assim a sensibilidade e a objetividade do diagnóstico (Playford & Walker, 2002).

O *ParaSight-F* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J) e o ICT *Pf* (Amrad-ICT, Sydney, Australia) são ensaios que detectam a proteína 2 rica em histitina

(HRP2), expressado por trofozoítas de *P.falciparum* e também por gametócitos imaturos. Em geral, os estudos mostram uma detecção de 40 a 60 parasitas/ $\mu$ l e sensibilidade variando de 84 a 100% para infecções de *P.falciparum* (Playford & Walker, 2002). Quando comparados com a gota espessa, o resultado é bom com parasitemias superiores a 60 parasitos/ $\mu$ L, diminuindo drasticamente quando a parasitemia desses testes é igual ou inferior a 10 parasitos/ $\mu$ L.

O RDT foi desenvolvido para detectar *P.vivax* além do *P.falciparum*. O ensaio ICT P.f/P.v (Amrad-ICT) detecta o mesmo antígeno de *P.falciparum* específico o HRP2 presente no ensaio de ICT P.f, além de detectar um antígeno pan-específico expressado por *P.falciparum*, por *P.vivax* e possivelmente também por *P.ovale* e por *P.malariae*. (Mason *et al.*,2001).

Pela sua praticidade e facilidade de realização, tanto o *ParaSight-F* como o ICT Malária *Pf* foram considerados testes úteis para a triagem e mesmo para a confirmação diagnóstica, principalmente em situações onde é complicado processar o exame da gota espessa, como em áreas de difícil acesso (Aslan *et al.*,2001).

Estes RDTs têm várias limitações importantes, como a sensibilidade com baixas parasitemias, inabilidade para identificar as espécies parasitárias e quantificar a densidade de parasitas, e custo elevado quando comparado com a GE. Resultados falso-positivos acontecem nos testes como HRP2 devido à persistência do antígeno na circulação por até 28 dias, mesmo na ausência de parasitemia, o que o torna inútil para o acompanhamento da terapêutica (Bartoloni *et al.*,1998 ; Grobush *et al.*, 1999).

Existem também as técnicas de detecção do parasita no interior das hemácias, como o QBC<sup>®</sup> (*Quantitative Buffy Coat*). Técnica adaptada do modelo desenvolvido para a contagem de células sanguíneas que combina a concentração dos

parasitos pela centrifugação do sangue em tubos de micro-hematócrito e a coloração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) do parasito pelo fluorocromo laranja de acridina (Wardlaw & Levine, 1983). É um teste considerado sensível e específico, não necessitando de profissional altamente qualificado para a sua interpretação, útil para bancos de sangue para a triagem de doadores, principalmente os das áreas endêmicas, já que nessas circunstâncias, o volume de trabalho e a maior probabilidade de baixas parasitemias tornam impraticável o uso da GE. Entretanto, é de alto custo, uma vez que envolve microscopia epifluorescente e tubos previamente preparados com anticoagulante e corantes especiais. Embora vários estudos tenham mostrado a eficiência do QBC<sup>®</sup> para o diagnóstico da malária, análises mais recentes demonstraram que, embora seja mais rápido e mais objetivo, o QBC<sup>®</sup> não é superior à gota espessa no diagnóstico parasitológico da malária (Spielman *et al.*, 1988; Pornsilapatip *et al.*, 1990; Wongsrichanalai *et al.*, 1991; Baird *et al.*, 1992; Ávila *et al.*, 1994; Benito *et al.*, 1994; Craig & Sharp, 1997; FUNASA, 2001).

Mais recentemente, um outro método de diagnóstico rápido foi desenvolvido, com a vantagem de poder capturar antígenos de *P. falciparum* e *P. vivax* simultaneamente. Trata-se do OpitMAL, um teste também baseado em fitas de detecção por imunocromatografia, que utiliza anticorpos policlonais e monoclonais marcados com ouro e dirigidos contra a enzima lactato desidrogenase específica do parasito (pLHD), enzima glicolítica expressa em altos níveis no estágio eritrocítico do parasita. Como só é produzido por parasitos vivos, os níveis de pLDH acompanham a parasitemia periférica, sendo um bom marcador para o seguimento de infecção ativa. Os kits para a detecção do pLDH permitem a diferenciação de *P. falciparum* de outras espécies de *Plasmodium*, mas não distinguem entre *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale*, já que

essa diferenciação é baseada nas diferenças antigênicas entre as isoformas da pLDH (Makler *et al.*, 1998; Fryauff, 2000).

A detecção dessa enzima também pode ser efetuada pelo método imunológico como o ELISA-Malária *Antigen Test* (DiaMed-Switzerland), que é o alvo desse estudo. Esse teste é considerado um método rápido e de alta sensibilidade para a imunocaptura de antígeno através de teste ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). O antígeno detectado é uma enzima específica do metabolismo intracelular do *Plasmodium*, a Lactato Desidrogenase plasmodial (pLDH), encontrado no estágio eritrocitário do parasita (Makler *et. al.*, 1998), possuindo a capacidade de detectar as quatro espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie*).

A técnica do ELISA-Malaria *Antigen Test* é uma variação enzimática do método de ELISA “sanduíche”, utilizando anticorpos monoclonais para captura do antígeno dos parasitas da malária. Para esse ensaio é utilizado sangue total, no qual detecta-se a enzima metabólica específica intracelular, a *Plasmodium* Lactato Dehidrogenase (pLDH) presente no estágio eritrócítico do parasita (Piper *et al.*, 1999).

Outra ferramenta importante e eficiente que pode ser utilizada para a triagem em banco de sangue, é a técnica da Biologia Molecular através do desenvolvimento de sondas dos genes que codificam antígenos de superfícies, como o gene da subunidade 18S do rRNA presente nas quatro espécies de plasmódios infectantes para o homem (*P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malarie* e *P.ovale*). Estas sondas tem grande aplicabilidade na detecção de baixas parasitemias e de infecções mistas, pelo fato do rRNA ser a macromolécula celular mais abundante do plasmódio, representando de 0.2 a 1.0 pg do parasita, muito mais do que o do DNA total, que

representa 0.02 pg (Lal *et al.*, 1989; Sethabutr *et al.*, 1992; Ciceron *et al.*, 1999). A amplificação desse gene é capaz de detectar as quatro espécies de parasitas pela técnica PCR (Reação da Cadeia da Polimerase), todavia, tem custo elevado, podendo ser inviável na rotina laboratorial (Farnert *et al.*, 1999).

Condições diferenciadas de coleta e preparação do sangue têm sido estudadas, assim como métodos variados da PCR, como por exemplo: *Nested-PCR*, *PCR Multiplex*, *Real Time PCR*, etc. A técnica da PCR geralmente apresenta sensibilidade superior à da gota espessa, e é capaz de detectar parasitemias com 0,04-0,004 parasitas/ $\mu$ L. A complexibilidade da técnica ainda dificulta a sua aplicação para o diagnóstico precoce em alguns setores primários da saúde. A sua utilização tem sido importante na detecção de assintomáticos em áreas endêmicas, em estudos epidemiológicos, monitoramento da resposta imune de pacientes tratados com drogas antimaláricas, caracterização genotípica dos plasmódios (Warhurst *et al.*, 1991; Wooden *et al.*, 1992; Zallis *et al.*, 1996; Farnert *et al.*, 1999), triagem de doadores de sangue em áreas de endemicidade e como teste de referência para a avaliação do desempenho de novos testes diagnósticos (Pieroni *et al.*, 1998).

#### 1.6. LACTATO DESIDROGENASE PLASMODIAL (pLHD)

A lactato desidrogenase é uma enzima essencial para a sobrevivência do parasita, trata-se de uma enzima terminal da via de Embden-Meyerhof (via glicolítica anaeróbica) do parasita da malária (Makler & Hinrichs, 1993). Devido a falta de um ciclo de Krebs funcional durante seus estágios eritrocítico, o *Plasmodium* tende a organizar-se, a fim de gerar toda a sua energia através da glicólise, acoplada com a fermentação (Chaikuad., *et al* 2005).

Sua produção e acúmulo podem ser usadas *in vivo* e *in vitro* como índices da viabilidade do parasita. A pLDH foi uma das primeiras enzimas demonstrada eletroforeticamente, imunologicamente e cineticamente distinta daquela presente no hospedeiro (Sherman, 1961). Ela foi usada primeiramente como um indicador da presença de parasitas da malária, uma vez que os níveis de pLDH correspondem à densidade do parasita (Noedl *et al.*, 2003).

O pLDH possui importante papel no metabolismo anaeróbico dos carboidratos dos parasitas da malária humana, pois os parasitas da malária dependem principalmente da glicólise anaeróbica, de onde requerem principalmente a regeneração do NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) para o contínuo fluxo da glicose através dessa via. Baseado no conhecimento de que a atividade da pLDH é distinguível da atividade LDH do hospedeiro, usando um análogo do NAD (APAD), Makler *et al* desenvolveram um ensaio de sensibilidade à droga que determina perfis de inibição pela medida da atividade enzimática da pLDH (Knobloch, 1995).

### 1.7. INFECÇÕES ASSINTOMÁTICAS POR *Plasmodium*

As principais causas de relatos de transmissão de malária por transfusão é a presença de baixa parasitemias em pacientes assintomáticos, ocupando o papel de reservatório do parasita contribuindo assim para a manutenção da sua transmissão (Contreras *et al.*, 1999; Camargo *et al.*, 1999). Essa situação ocorre principalmente nas áreas de transmissão intensa, como em alguns países da África, cuja prevalência de parasitemias assintomáticas por *P.falciparum* é alta (Vinetz & Gilman, 2002; Nsohya *et al.*, 2004). Estudos também têm demonstrado a ocorrência de casos de portadores

assintomáticos por *P.vivax*, em regiões da Ásia, Américas Central e Sul e na Amazônia Brasileira (Bruce *et al.*, 2000; Roshanravan *et al.*, 2003)

No fim da década de 80, casos de portadores assintomáticos foram identificados pelo método da gota espessa. Estudos ocorridos em 1988 e 1995 no Estado de Rondônia observaram casos de indivíduos infectados por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, com parasitemias confirmadas no exame da gota espessa, porém, não demonstravam qualquer sintoma da doença (Prata *et al.*, 1988; Andrade *et al.*, 1995).

No ano de 1996, infecções assintomáticas não foram encontradas em Rondônia pelo método da gota espessa, mas quando foi utilizado o diagnóstico molecular detectou-se 13,7% assintomáticos (Camargo *et al.*, 1996; 1999).

Estudos feitos em Rondônia a partir de 1999, utilizando a PCR, confirmaram a ocorrência de infecções sub-clínicas em indivíduos residentes em duas comunidades ribeirinhas da Amazônia (Alves *et al.*, 2002)

A principal importância de se detectar a presença de portadores assintomáticos na Amazônia é o melhoramento dos programas de controle e tratamento dos pacientes, uma vez que esses portadores contribuem para a manutenção da transmissão além de participar como reservatório do parasita, pois as estratégias de controle adotadas hoje em dia baseiam-se na detecção e tratamento de indivíduos sintomáticos (Alves *et al.*, 2002).

## 1.8. MALÁRIA TRANSFUSIONAL

Em 1911 foi relatado pela primeira vez a transmissão de malária por via transfusional. A transmissão da malária em transfusões ocorre normalmente através de qualquer componente do sangue que contenha eritrócitos que possam abrigar parasitas

viáveis. Embora sangue total e concentrado de hemácias represente a fonte mais comum de malária transfusional, casos envolvendo plaquetas, leucócitos, plasma congelado e sangue total congelado têm sido reportados (Dover & Guinee, 1971; Garfileld *et al.*, 1978;). Algumas espécies de *Plasmodium* podem sobreviver pelo menos 3 semanas em sangue refrigerado. Dependendo no número de parasitas no inóculo, os sintomas de malária podem-se desenvolver semanas depois da transfusão (Seed *et al.*, 2005). O período de incubação após hemotransfusão varia de 7 a 50 dias (média de 20 dias) (Contreras *et al.*, 1999). Alguns estudos reportam, transmissão através de transfusão, após anos da última exposição, *P.malariae* 53 anos, *P.vivax* 27 anos, e *P.falciparum* 13 anos (Seed *et al.*, 2005).

A demora no diagnóstico pode conduzir à morte do paciente, particularmente se a espécie envolvida for *P. falciparum*. Dados da incidência de TTM (Malária Transmitida por Transfusão) são confusos por falhas nas notificações, pois a diferenciação dos casos de TTM de infecções naturais se torna difícil em áreas endêmicas de malária. Além disso, nas áreas endêmicas, muitos dos doadores e pacientes já estão infectados ou estão submetidos a altos riscos de contrair malária (Kitchen & Chiodini, 2006).

Em regiões não endêmicas, a incidência informada varia de 0 a 2 casos por milhões de doações (Mungai *et al.*, 2001). Em recente revisão sobre TTM nos Estados Unidos, a incidência para o período de 1993 a 1998 foi de 0 a 0,18 casos por um milhão de unidades transfundidas, ao contrário da incidência, em países endêmicos, onde é provável exceder para 50 casos por um milhão de unidades doadas (Kitchen & Chiodini, 2006).

Apesar dos avanços significativos no desenvolvimento de teste para infecções viróticas transmitidas por transfusão nas últimas três décadas, os testes para triagem de sangue segura para malária permanece evasivo. Os doadores implicados em TTM são semi-ímmunes com densidades de parasita abaixo do limite detectável pelos ensaios disponíveis (Chiodini *et al.*, 1997; Silvie *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 1999).

Os ensaios sorológicos são sem dúvida os mais comumente utilizados em triagens, pois possuem sensibilidade para baixos títulos de anticorpos. Os anticorpos de contra as quatro espécies de *Plasmodium* são produzidos pelos indivíduos de 1 a 14 dias após a infecção inicial sendo detectável por meses e até anos depois da exposição (Contreras *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000).

Em áreas endêmicas as proporções de anticorpos de indivíduos positivos geralmente estão entre 20% e 90% (Akinboye & Ogunrinade, 1987) e nas populações de áreas não endêmicas, a taxa de doadores com anticorpos positivos identificados varia de 1% a 2% (Chiodini *et al.*, 1997; Davidson *et al.*, 1999).

A incidência de malária transfusional no Brasil é desconhecida, mas a presença de portadores assintomáticos pode estar contribuindo para a disseminação da doença em áreas endêmicas, onde a triagem clínico-epidemiológica esteja sendo realizada de maneira inadequada (Sáez-Alquezar, *et al.*, 1998).

Assim, a RDC nº 153/04 do Ministério da Saúde recomenda rejeitar na triagem clínico-epidemiológica os doadores que incluem questões específicas sobre a malária, onde a inabilitação para o ato de doar sangue deve ocorrer segundo os critérios estabelecidos a partir da incidência da doença no local, usando-se como critério de referência o índice parasitário anual (IPA) (RDC, 2004).

O IPA refere-se ao número de exames positivos de malária, por mil habitantes. A positividade pode resultar da demonstração do parasita em amostra de sangue examinada ao microscópio (gota espessa), método capilar para exame hematológico (QBC), e imunodiagnóstico. O indicador expressa o número de exames positivos e não o de casos de malária, o que pode resultar em duplicidade de registro, quando o mesmo paciente é submetido a mais de um exame (para verificações de cura, de recrudescências ou de recaídas) (Ministério da Saúde, 2003).

Em áreas endêmicas, recomenda-se rejeitar o candidato que tenha tido malária nos 12 meses que antecedem a doação e o candidato com febre ou suspeita de malária nos últimos 30 dias. Para os indivíduos com residência em área de malária, recomenda-se rejeitar o candidato habitante em área de alto risco segundo o IPA. Devem ser aceitos os candidatos que residem em área de médio e baixo risco, submetendo-os ao teste parasitológico (Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue/MS ANVISA, 2004; Kitchen & Chiodini, 2006).

Nas regiões endêmicas com transmissão ativa, deve ser realizado o exame parasitológico/hematoscópico. Em regiões endêmicas sem transmissão ativa, recomenda-se o exame sorológico (Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue/MS/ANVISA, 2004; Davidson *et al.*, 1999).

Em áreas não endêmicas, deve-se excluir os candidatos que nos últimos seis meses estiveram em área endêmica com transmissão ativa e aqueles que, nos últimos três anos tiveram malária ou que residiram em áreas endêmicas (Kitchen & Chiodini, 2006).

A malária causada por *Plasmodium malariae* exclui definitivamente o candidato da doação de sangue, tanto em áreas endêmicas quanto em não endêmicas,

pois há relatos que indicam a transmissão deste *Plasmodium* após décadas da última exposição (Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue/MS/ANVISA, 2004; Seed *et al.*, 2005).

O conhecimento das características das doenças infecciosas é fundamental para estabelecer medidas e ações eficientes de controles necessários para proceder a investigação dos processos infecciosos e parasitários transfusionais (Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue/MS/ANVISA, 2004).

## 1.9. OBJETIVOS

### 1.9.1. Geral

Avaliar o teste de ELISA Lactato Desidrogenase Plasmodial (pLDH) como método de triagem de malária em doadores de sangue.

### 1.9.2. Específicos

- a) Validar o método ELISA-Malaria *Antigen Test*, como ferramenta diagnóstica para triagem de malária em doadores de sangue na Fundação HEMOPA e nas demais Unidades de Coleta e Transfusão (UCT) localizadas em algumas zonas endêmicas.
- b) Avaliar o desempenho do método em relação a técnica da PCR.
- c) Verificar a sazonalidade dos casos positivos no ELISA-Malaria *Antigen Test* em relação ao IPA das cidades estudadas.
- d) Avaliar a eficiência do inquérito epidemiológico adotado na Fundação HEMOPA para a seleção de doadores.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. DESENHO DO ESTUDO**

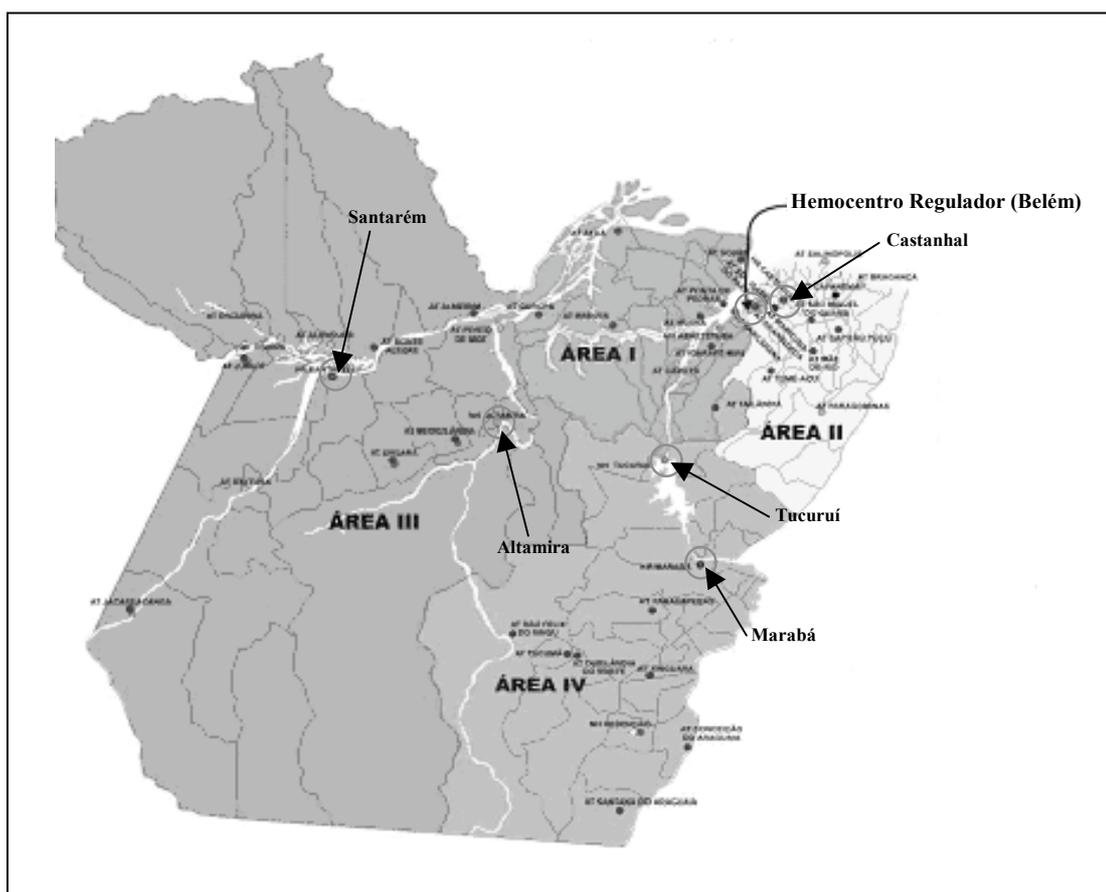
O estado do Pará possui 143 municípios, de onde seis deles tiveram amostras coletadas para o nosso estudo. Os municípios escolhidos, para a obtenção das amostras deste estudo, foram os do interior do Estado: Altamira, Castanhal, Marabá, Tucuruí e Santarém, possuindo em suas áreas alguns locais considerados como endêmicos para malária e onde a Fundação HEMOPA possui Unidades de Coleta e Transfusão (UCT), facilitando a obtenção de amostras para análise do estudo (Figura 2). Além das amostras do interior do Estado, foram utilizadas amostras oriundas da sede do HEMOPA na capital Belém, cuja população amostral foi dividida em duas categorias: candidatos à doação da própria capital e candidatos à doação recusados na triagem epidemiológica, em função de terem estado em áreas consideradas endêmicas dentro ou fora do Estado e que procuraram a Fundação em um período de até 30 dias após a estada nas zonas endêmicas.

O estudo foi dividido em dois períodos: chuvoso (fevereiro a junho) e seco (setembro a dezembro). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical em 31/03/2005, protocolo CEP/NMT Nº 010/2005 (Anexo).

### **2.2. ÁREAS DE ESTUDO**

A cidade de Belém é a capital do estado do Pará e também a maior cidade do estado e do norte do Brasil. Possui cerca de 1.070 km<sup>2</sup> e 1.405.871 habitantes, com densidade demográfica de 5,58 habitantes/km<sup>2</sup> (IBGE, 2004). No ano de 2004 foram registrados nessa cidade 1554 casos de malária, que resultou em IPA de 1,1%

(SESPA, 2004). No ano seguinte o número de notificações de casos positivos reduziu para 1288 e o IPA passou para 0,9% (SESPA, 2005). No ano de 2006 os números de casos notificados de janeiro até julho foi de 766 casos positivos com IPA de 0,5% (SESPA, 2006).



**Figura 1** - Unidades de Coleta e Transfusão do Interior do Estado (Fundação HEMOPA)

A cidade de Altamira está localizada a 512 km da capital do Estado limitada ao Norte com o município de Vitória do Xingu e ao Sul com o estado do Mato Grosso, possui cerca de 85.901 habitantes, com densidade demográfica de 0,5 habitantes/km<sup>2</sup> (IBGE, 2004). No ano de 2004 apresentou 5305 casos positivos para malária, e IPA de 64,7 % (SESPA, 2005) e no ano de 2005 o número de casos

registrados foi de 5263, com IPA de 64,2 % ( SESP, 2005). Em 2006, de janeiro até julho, foram notificados 1746 casos de malária com IPA de 20,7% (Tabela 1 e 2).

O município de Castanhal, encontra-se situado a 58 Km de Belém, possuindo uma área total de 1.029,4 km<sup>2</sup> e uma população de 127.634 habitantes, com densidade demográfica de 123,99 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2004), Em 2004 o município apresentou 117 casos positivos e IPA de 0,8% (SESPA, 2005). Em 2005 o número de casos diminuiu para 96 e o IPA passou a 0,7 % (SESPA, 2006). Nos seis primeiros meses de 2006 o número de casos registrados de malária foi de 61, e IPA de 0,4% (Tabela 1 e 2).

Marabá encontra-se situado a 438 Km da capital, possuindo uma área total de 15.157,9 km<sup>2</sup> e uma população de 167.795 habitantes, com densidade demográfica de 11,07 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2004). Os casos de malária registrados no ano de 2004 foram de 2891, e IPA de 15,5% (SESPA, 2005). No ano seguinte o número de positivos aumentou para 3405 e o IPA chegou a 18,3 % (SESPA, 2005). Em 2006 até agora já estão registrados 1800 casos e IPA de 9,2% (SESPA, 2006) (Tabela 1 e 2).

Tucuruí localizado a 280Km de distância da capital, tem sua área geográfica com 2.095,5 km<sup>2</sup> e uma população de 60.847 habitantes, com densidade demográfica de 29,06 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2004). Em 2004 nessa cidade foram registrados 4916 casos de malária e IPA de 60,4 % (SESPA, 2005). Em 2005 o número de casos subiu mais que o dobro, sendo registrados 8545 casos positivos, registrando um IPA maior de 105% (SESPA, 2005). Nos seis primeiros meses do ano de 2006, o número de casos positivos foi de 4627, correspondendo a um IPA de 54,1% (SESPA, 2006) (Tabelas 1 e 2).

Santarém, localiza-se a 710 Km da capital e sua área geográfica abrange 24.422,5 km<sup>2</sup>, possui uma população de 241.771 habitantes com densidade demográfica de 9,90 hab/km<sup>2</sup> (IBGE, 2004). No ano de 2004 foram registrados 1031 casos de malária, representando um IPA de 3,8% (SESPA, 2005). Em 2005 o número de casos reduziu para 905 e o IPA para 3,4 % (SESPA, 2006). Até agora nesse município foram registrados 216 casos de malária com IPA de 0,8% (SESPA, 2006) (Tabela 1 e 2).

**Tabela 1** – Distribuição anual do número de casos de malária por municípios, no período de 2004 a julho de 2006

<b>Número de casos notificados de malária</b>						
<b>Ano</b>	<b>Belém</b>	<b>Altamira</b>	<b>Castanhal</b>	<b>Marabá</b>	<b>Santarém</b>	<b>Tucuruí</b>
2004	1554	5305	117	2891	1031	4916
2005	1288	5263	96	3405	905	8545
2006	766	1746	61	1800	216	4627

Fonte: Secretária Executiva de Saúde Pública do Pará (SESPA)

**Tabela 2** – Distribuição do índice parasitário anual (IPA) no período de 2004 a julho de 2006, nos municípios estudados.

<b>Índice Parasitário Anual (IPA)</b>						
<b>Ano</b>	<b>Belém</b>	<b>Altamira</b>	<b>Castanhal</b>	<b>Marabá</b>	<b>Santarém</b>	<b>Tucuruí</b>
2004	1,1	64,7	0,8	15,5	3,8	60,4
2005	0,9	64,2	0,7	18,3	3,4	105
2006	0,5	20,7	0,4	9,2	0,8	54,1

Fonte: Secretária Executiva de Saúde Pública do Pará (SESPA)

### 2.3. AMOSTRAS

Para a realização deste trabalho foram coletadas amostras de sangue de 1670 candidatos à doação, de ambos os sexos, com idades entre 18 a 45 anos. As 1670 amostras foram coletadas durante todo o ano de 2004, sendo 890 de fevereiro a julho e 780 de agosto a dezembro. As amostras disponibilizadas pelas UCTs foram de 718 e da sede (HEMOPA) 882, além dessas, outras 70 amostras também foram coletadas de pacientes que procuraram a Fundação HEMOPA, mas que foram excluídos no inquérito epidemiológico, por terem estado em áreas endêmicas no período mínimo de trinta dias antes da coleta (Tabela 3). Neste estudo não foi feita a realização da gota espessa das amostras testadas, somente as amostras controles foram testadas por esse método.

As amostras foram coletadas por técnicos especializados, utilizando materiais individual e descartável. O material foi obtido através de punção venosa, coletando-se 5 mL de sangue total. As amostras dos candidatos recusados na triagem epidemiológica tiveram o seu sangue coletado exclusivamente para o estudo, após assinarem o termo de livre consentimento concordando em participar da pesquisa.

**Tabela 3** – Número de amostras analisadas no estudo organizadas por cidades e períodos.

Localidade	Nº de amostras	Períodos	
		Chuva (fev-jul)	Seca (ago-dez)
<b>Altamira</b>	78	78	-
<b>Castanhal</b>	185	95	90
<b>Marabá</b>	190	90	100
<b>Tucuruí</b>	188	91	97
<b>Santarém</b>	77	-	77
<b>HEMOPA (Belém)</b>	882	482	400
<b>Doadores Excluídos</b>	70	54	16

Para a execução do teste foram utilizadas amostras com 5 mL de sangue contendo EDTA (etil-enediaminetetra-ácido-acético), selecionados da rotina da seção de Imunohematologia da Fundação HEMOPA e das UCTs, onde do total deste volume foram retirados 50 µL para a execução do teste ELISA.

### 2.3.1. Controles

#### a) Positivo

Para controle positivo foram utilizadas 14 amostras de sangue total com parasitemias detectáveis e indetectáveis pela GE, impregnadas em membrana de fibra de vidro de 2.5 cm de diâmetro (Whatman), todas com resultados de PCR positivo, previamente testados pela equipe da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas (IEC). (Tabela 4)

## b) Negativo

Como controle negativo foram coletados 5 mL de sangue total de 5 pacientes sem histórico de precedentes de malária e que não estiveram em área endêmica nos últimos 30 dias que antecederam a coleta. Deste volume foram retirados 50 µl para o teste ELISA. (Tabela 4)

**Tabela 4** – Números de amostras dos controles positivos e negativos.

	Controles			
	Gota Espessa		PCRs	
	GE Pos	GE Neg	PCR Pos	PCR Neg
Controle Positivo	10	4	14	-
Controle Negativo	-	5	-	5

PCR Pos: Reação da cadeia da polimerase positiva  
 PCR Neg: Reação da cadeia da polimerase negativa

#### 2.4. ELISA-Malaria *Antigen Test*

Esse teste é considerado como método rápido e de alta sensibilidade 0,001 a 0,002 % para a imunocaptura de antígeno através de teste ELISA. O antígeno detectado é uma enzima específica do metabolismo intracelular do *Plasmodium*, que é a Lactato Desidrogenase Plasmodial (pLDH), encontrado no sangue total, no estágio eritrocitário do parasita (Makler *et. al.*, 1998).

Este teste de ELISA possui a capacidade de detectar as quatro espécies de *Plasmodium* que infectam seres humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malarie*) (Piper *et al.*, 1999).

Neste teste, os poços da placa estão sensibilizados com anticorpos monoclonais (mAb) específicos para as quatro espécies e a técnica foi executada de acordo com as orientações do protocolo do fabricante, no qual foram dispensados 100  $\mu\text{L}$  de Tampão de Lise em cada poço, com conseqüente adição de 50  $\mu\text{L}$  do controle positivo (soro humano com a pLDH recombinante) e 50  $\mu\text{L}$  do controle negativo em duplicata nos poços específicos, seguido da adição de 50  $\mu\text{L}$  de sangue total ou 2 gotas inteiras de sangue total impregnadas em papel de filtro eluídas. Para esse procedimento as gotas foram mergulhadas em tampão de lise do próprio kit e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A placa posteriormente foi coberta e colocada na estufa para incubar durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, a placa foi lavada com tampão de lavagem em uma lavadora semi-automatizada, deixando o tampão agir por 1 minuto na primeira lavagem, sendo seguidas de outras quatro lavagens consecutivas. Ao fim da última lavagem, após o esvaziamento dos poços foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  conjugado 1 (mAb do pLDH associado à biotina) em cada poço. A placa foi levada para a estufa a 37°C durante 30 minutos, e nova lavagem foi realizada para a retirada do excesso do conjugado 1. Posteriormente foi dispensado nos poços da placa 100  $\mu\text{L}$  do conjugado 2 (streptavidina conjugada para a peroxidase), colocada na estufa para incubar por 15 minutos a 37°C. Após esse procedimento a placa foi novamente lavada e em seguida adicionados 100  $\mu\text{L}$ /poço da solução do substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio). Novamente a placa foi levada para a estufa para incubar por mais 15 minutos, quando a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  do tampão de parada (solução de ácido sulfúrico 0.5 M) ( Figura 2).

A densidade óptica (DO) da leitura foi determinada em leitor de placa de ELISA usando um comprimento de onda de 450 nm. Para obtenção da validação da placa o fabricante recomenda que:

$$\text{DO Controle Positivo} > 0.500$$

$$\text{DO Controle Negativo} < 0.200$$

Válida a placa, os valores obtidos pela leitura óptica dos poços dos controles negativos foram multiplicados por 1.5, para assim se obter o ponto de corte válido (*cutoff*) para toda a placa.

Para obtenção de resultados do teste foram seguidas as instruções do fabricante de acordo com o cálculo abaixo:

$Cutoff\ válido \times 0.9 < \text{DO amostra} < Cutoff\ válido \times 1.1 =$  resultado duvidoso

$$\text{DO amostra} > cutoff\ válido \times 1.1 = \text{resultado positivo}$$

$$\text{DO amostra} < cutoff \times 0.9 = \text{resultado negativo}$$

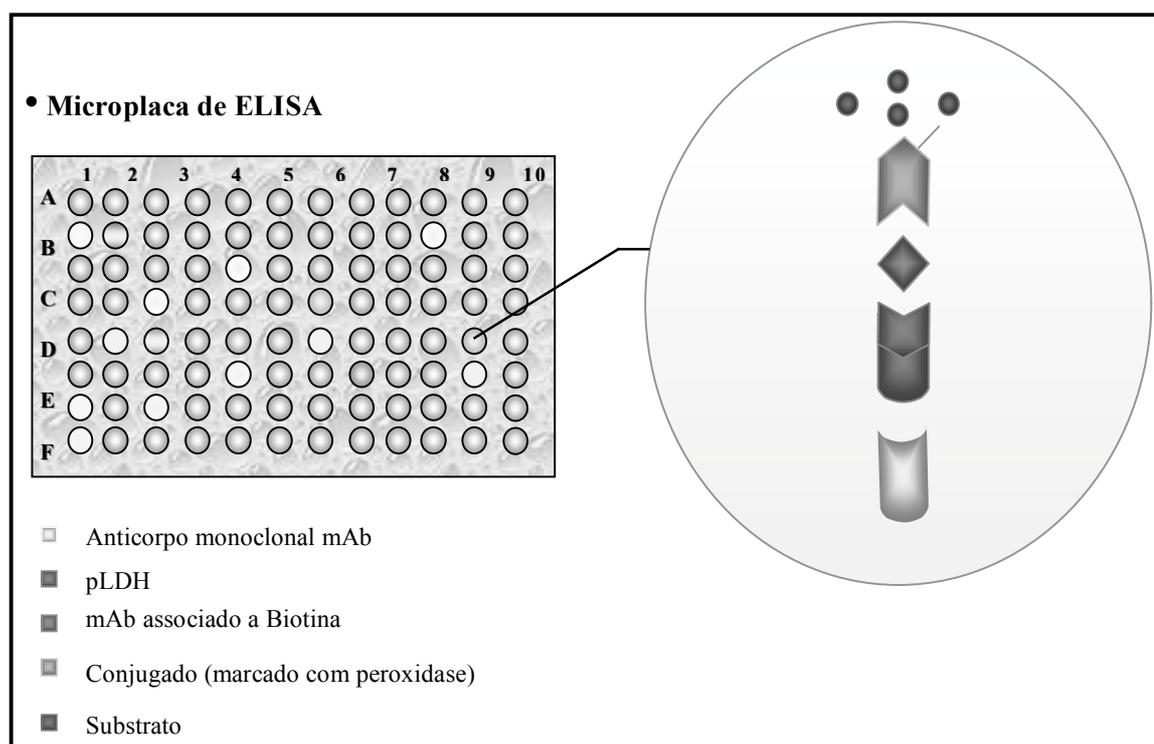
No estudo foi criado um cálculo para efeito estatístico, e para que os valores dos resultados positivos e negativos pudessem obedecer uma normalização e serem, portanto, melhor analisados.

Para a realização do cálculo, foi considerada a leitura de DO de uma amostra considerada positiva, de acordo com o cálculo citado, e dividiu o valor de DO pelo *cutoff* positivo da placa de ELISA encontrando um valor de  $DO/cutoff$  positivo. Para o cálculo de  $DO/cutoff$  negativo foi também feita uma divisão da DO de uma amostra considerada negativa pelo valor do *cutoff* negativo da placa de ELISA

A partir do estabelecimento desses  $DO/cutoff$  positivos e negativos, foi feito um novo cálculo, onde se diminuiu os valores de  $DO/cutoff$  negativo pelos valores

de  $DO/cutoff$  positivo, chegando a um valor constante a que chamaremos de  $\Delta DO/cutoff$ .

Após a criação do  $\Delta DO/cutoff$ , verificou-se que a amostra positiva apresentou um  $\Delta DO/cutoff \geq 0,23$  e que a amostra negativa apresentou um  $\Delta DO/cutoff \leq 0,17$ . A partir desse resultado se instituiu no estudo esses valores para a classificação de amostras positivas e negativas de acordo com o protocolo do fabricante, e que as amostras consideradas como indeterminadas (zona cinza) estariam no intervalo entre 0,17 e 0,22.



**Figura 2** – Apresentação esquemática da reação do antígeno pLDH no ELISA-Malaria *Antigen Test*.

## 2.5. EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de controle foram oriundas de sangue total adicionados em membranas de fibra de vidro (Titertek, ICN Biomedicals-England), onde cada membrana continha cinco gotas com 20  $\mu$ L cada, devidamente identificadas e armazenadas em embalagens plásticas a uma temperatura de  $-20^{\circ}$  até serem submetidas a etapa de extração

A extração do DNA foi feita pelo método de Saponina/Chelex-100 (Wooden *et al.*, 1993), cada gota contendo 20  $\mu$ L de sangue total foi cortada de 1/4 a 1/6, em seguida colocada em tubos de 1,5 mL previamente identificados, posteriormente se fez a adição de 500 $\mu$ L da solução de Saponina 0,5%, sendo levada para a etapa de incubação por 40 minutos em gelo. Após esse período, o material foi separado por centrifugação, desprezando-se o sobrenadante.

Os resíduos do papel de filtro que ficaram nos tubos foram lavados uma vez com 1 mL de PBS (pH 7.2), posteriormente adicionados 150  $\mu$ L de água destilada estéril e 50  $\mu$ L de solução de Chelex-100 a 20%, em seguida incubados em banho seco a uma temperatura de  $95^{\circ}$ - $100^{\circ}$ C durante 20 minutos, sendo agitados em vórtex nos primeiros 10 minutos e no final da incubação, para que auxilie na liberação do DNA.

Após a incubação, foram levados à centrifugação para a separação da solução de Chelex-100, dessa solução foram retirados 120  $\mu$ L do sobrenadante e transferidos para tubos de 0,5 mL previamente identificados, do DNA obtido foi armazenado a  $-20^{\circ}$ C até o momento do uso.

## 2.6. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

O diagnóstico molecular foi realizado através da técnica de *nested* PCR, utilizando seqüências específicas de amplificação para a subunidade pequena do gene 18S do RNA ribossômico (ssurRNA) de *Plasmodium spp*. Para a amplificação da seqüência específica do RNA ribossomal foram utilizados oligonucleotídeos específicos, conforme descrito pelo protocolo de Kimura *et al.*, 1997.

A reação de amplificação foi somente realizada para gênero e como seqüências foram utilizados o *primer forward* (5' - ACG ATC AGA TAC CGT CGT AAT CTT -3') e o *primer reverse* (5' - GAA CCC AAA GAC TTT GAT TTC TCA T -3'), a reação obteve como um volume final 20 µL, que continha 5 µL de DNA, 0.8 µL de cada *primer* a 0.4 mM, 0.25 µL de dNTPs, 2 µL de tampão (20 mM de Tris-HCl pH 8.4 e 50 mM KCl), 0.6 µL de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 0.1 µL de *Taq* DNA Polimerase e água destilada estéril q.s.p (quantidade suficiente para) volume de 20 µL.

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorff) nas seguintes condições: 92°C/2 min. (desnaturação inicial), seguidos de 35 ciclos de 92°C/30 seg. e 60°C/90 seg. (amplificação) finalizando com 60°C/5 min (extensão final).

Para a execução do PCR foram utilizadas como controle positivo 10 amostras de DNA extraídas de sangue de indivíduos com malária diagnosticados pela gota espessa, como negativos 5 amostras de DNA de indivíduos residentes em Belém e sem histórico clínico de malária, além dessas amostras foram também analisadas 4 amostras de DNA extraídas de pacientes que residem em zona endêmica de malária, diagnosticados como negativos pelo método da gota espessa.

Após a amplificação do DNA, os produtos obtidos na reação de PCR possuíam um tamanho de 130pb, e foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Dois microlitros de cada produto da PCR foram adicionados a quatro microlitros de solução corante (azul de bromofenol), e foram fracionados eletroforeticamente em um gel de agarose a 1.5%, a 100 volts por 1 hora. Em seguida, as amostras e o marcador de 100 pb foram corados com brometo de etídio, durante 20 minutos, visualizados sob luz ultravioleta e registrados em um sistema de captação de imagem.

## 2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando recursos do programa BIOSTAT 4.0 (Ayres *et al.*, 2005).

No estudo foram utilizados valores de  $\Delta DO/cutoff$  (valor de  $DO/Cutoff$  Negativo menos o valor de  $DO/Cutoff$  Positivo) de amostras com resultados positivos pela técnica do PCR e negativas pela GE, para assim estabelecer a faixa de positivos e negativos.

Amostras que obtinham valores de  $\Delta DO/cutoff$  no ELISA acima ou igual a 0,11 foram consideradas positivas e abaixo desse valor consideradas negativas, o número de positivos e negativos foram submetidos ao teste do Qui-quadrado, para observar a ocorrência de diferenças significativas entre as cidades estudadas, diante do valor de positividade e negatividade pré-estabelecidos.

A comparação entre os valores de  $\Delta DO/cutoff$  das cidades estudadas foi utilizada usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com o objetivo de verificar a ocorrência de diferenças das leituras de  $DO/Cutoff$  entre as cidades estudadas, o teste de Fisher, que também é um teste não paramétrico, foi utilizado para avaliar se há

diferença entre positivos e negativos nos períodos de seca e chuva das cidades analisadas.

Para todos os testes ficou estabelecido como nível de significância 5% ( $p < 0,05$ ) (Ayres *et al.*, 2005).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. AVALIAÇÃO DO TESTE ELISA

Neste trabalho, foram analisadas, através do ELISA Malaria *Antigen Test* um total de 1670 amostras oriundas de diferentes localidades do interior do Estado do Pará e da própria capital Belém. As leituras de  $\Delta DO/cutoff$  obtidas no teste foram classificadas seguindo orientações do fabricante (Tabela 5).

Após a classificação das 1670 amostras de acordo com a faixa de ponto de corte estabelecida pelo fabricante, observamos que apenas sete amostras apresentaram resultado positivo (7/1670), sendo três dessas amostras provenientes de doadores do HEMOPA da capital Belém (3/7), uma de Castanhal (1/7), uma de Altamira (1/7) e uma da Zona Endêmica (1/7) (Tabela2). Duas foram classificadas na faixa da zona cinza (2/1670) e o restante foi classificada como negativas (1661/1670). Entretanto, a fim de se obter uma validação mais precisa da faixa de  $\Delta DO/cutoff$ , que deverá ser utilizada futuramente no teste de ELISA, objetivando uma triagem mais fidedigna, foram feitas comparações das faixas de resultado sugeridas pelo fabricante, com as faixas de  $\Delta DO/cutoff$  dos resultados obtidos das amostras estabelecidas como controle em nosso estudo.

**Tabela 5** - Distribuição do número de amostras por cidades dos resultados obtidos de acordo com a faixa de ponto de corte estabelecida pelo fabricante.

Faixa de $\Delta DO/Cutoff$	Cidades						Zona End.	Total
	Belém	Altamira	Castanhal	Marabá	Santarém	Tucuruí		
$\leq 0,17$ (Negativo)	876	78	184	190	76	188	69	1661
0,17 a 0,22 (Zona Cinza)	2	-	-	-	-	-	-	2
$\geq 0,23$ (Positivo)	4	-	1	-	1	-	1	7

### 3.2. ANÁLISE DOS CONTROLES

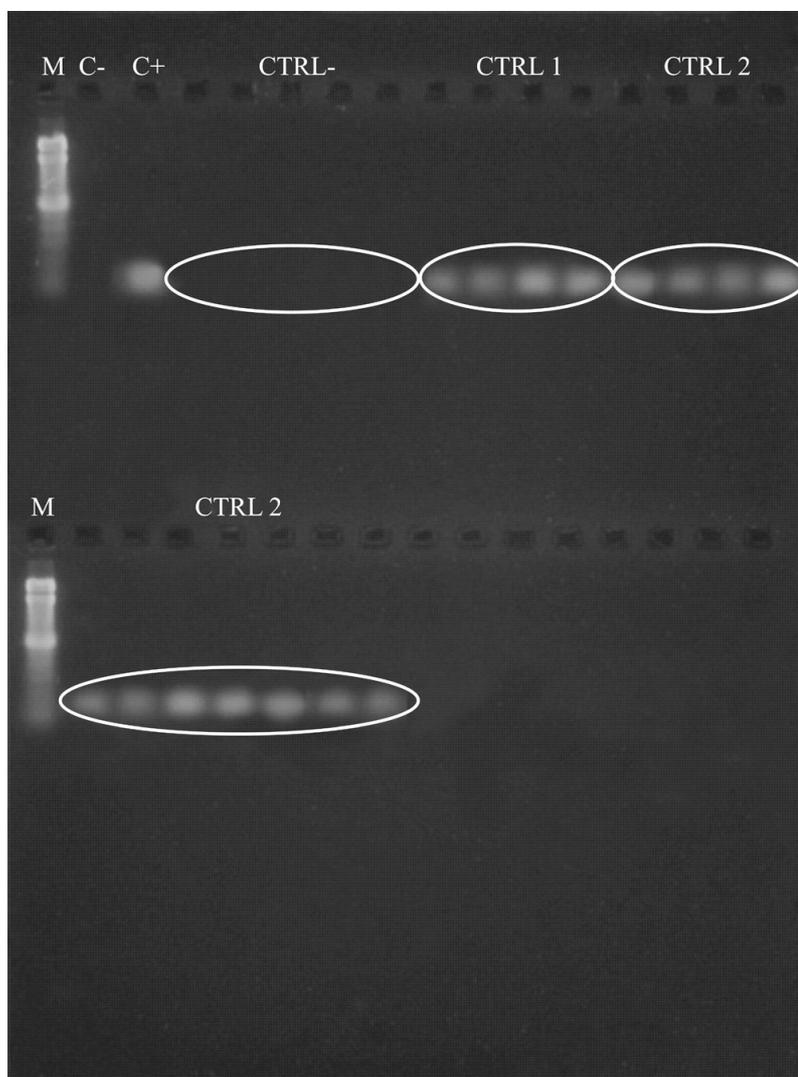
Para avaliar a eficácia e sensibilidade do teste ELISA foram analisadas 19 amostras controles de sangue periférico (10/19) com resultados positivos com parasitemias variando de 0,06-0,3% e negativos (9/19), diagnosticadas de acordo com o método da gota espessa padronizadas pelo Ministério da Saúde, que tiveram confirmação da presença ou ausência do parasita pela técnica do PCR. (Tabela 6)

De acordo com os resultados do teste ELISA, as 10 amostras positivas pela gota espessa tiveram seus resultados confirmados pela técnica de ELISA, porém, das 9 amostras negativas pela gota espessa uma foi positiva pelo ELISA. (Tabela 6)

**Tabela 6** – Descrição e comparação das parasitemias dos controles com as técnicas de PCR e ELISA.

Análise dos controles				
Amostras (Controles)	Parasitemia		Diag. Molecular	Sorologia
	GE Pos (%)	GE Neg	PCR	ELISA
1	0,1 %	-	Pos	Pos
2	0,23 %	-	Pos	Pos
3	0,12 %	-	Pos	Pos
4	0,06 %	-	Pos	Pos
5	0,064 %	-	Pos	Pos
6	0,3 %	-	Pos	Pos
7	0,2 %	-	Pos	Pos
8	0,15 %	-	Pos	Pos
9	0,3 %	-	Pos	Pos
10	0,3 %	-	Pos	Pos
11	-	Neg	Pos	Pos
12	-	Neg	Pos	Neg
13	-	Neg	Pos	Neg
14	-	Neg	Pos	Neg
15	-	Neg	Neg	Neg
16	-	Neg	Neg	Neg
17	-	Neg	Neg	Neg
18	-	Neg	Neg	Neg
19	-	Neg	Neg	Neg

A utilização do diagnóstico molecular revelou positividade para as 10 amostras positivas pela gota espessa. Das 9 amostras negativas no método da gota espessa, quatro (4/9) apresentaram resultado positivo quando analisadas pela técnica de PCR, amplificando seqüências de DNA específicas de *Plasmodium spp.* Na Figura 3, podemos observar o produto da amplificação do DNA pela PCR para a pesquisa de *Plasmodium spp.*

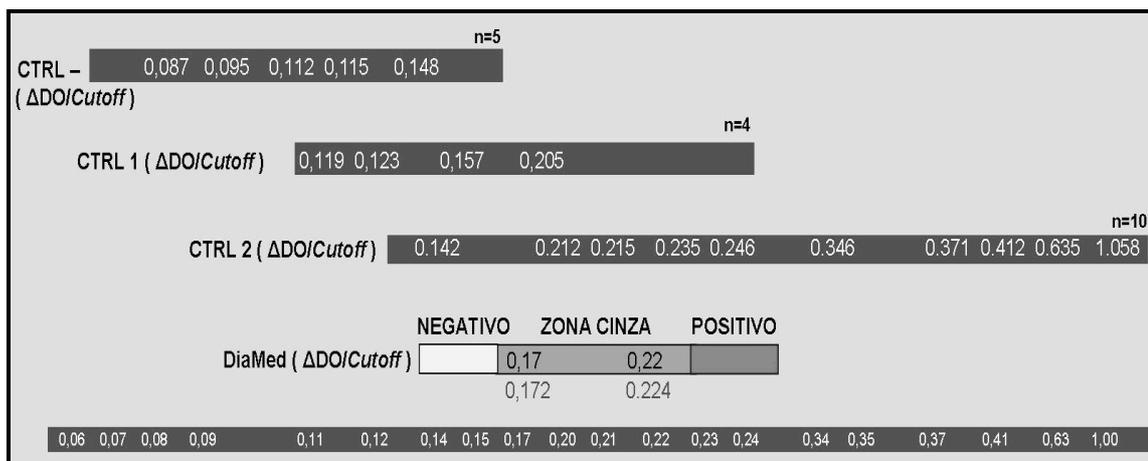


**Figura 3** – Detecção de *Plasmodium spp* pela técnica de *nested* PCR. A realização eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,5%. As amostras estão distribuídas nos

poços de 3-22: amostras CTRL- amostras negativas na gota espessa e negativas na PCR (poços 3-7); CTRL 1 amostras negativas na gota espessa e positiva na PCR (poços de 8-11) e CTRL 2 amostras positivas na gota espessa e positivas na PCR (12-22). M: peso molecular de 100 pb. O controles negativo (poço 1) e positivo (poço 2).

O resultado de  $\Delta DO/cutoff$  do teste ELISA das 19 amostras foram comparados com o resultado de detecção de *Plasmodium* através da PCR, e tiveram suas amostras posteriormente divididas em 3 grupos controles: controle negativo (PCR negativo com resultado negativo na gota espessa), controle positivo 1 (PCR positivo com resultado negativo na gota espessa) e controle positivo 2 (PCR positivo com resultado positivo na gota espessa), para facilitar a observação dos resultados de  $\Delta DO/Cutoff$ , foi construída uma régua, conforme a Figura 4. A faixa de resultado de  $\Delta DO/cutoff$  encontrada nos controles foi comparada com a faixa de  $\Delta DO/cutoff$  estabelecida como resultado pelo fabricante.

Na Figura 4 também podemos observar as faixas de  $\Delta DO/cutoff$  obtidos em cada controle. A escolha do grupo controle positivo foi baseada na confirmação da presença de *Plasmodium* pela técnica de PCR, tomando este como teste padrão para a detecção do parasito da malária, por ser considerada uma técnica de maior sensibilidade quando comparada com a técnica da gota espessa. O grupo controle de escolha foi o grupo controle 1. As amostras deste grupo obtiveram uma faixa de  $\Delta DO/cutoff$  variando de 0,11 a 0,21; após o estabelecimento da faixa de  $\Delta DO/cutoff$  do grupo controle, foi sugerido que as amostras positivas teriam que apresentar resultados de  $\Delta DO/cutoff \geq 0,11$  discordando da faixa de  $\Delta DO/cutoff \geq 0,23$  estabelecida pelo fabricante.



**Figura 4** – Régua com valores de  $\Delta DO/cutoff$  dos controlos obtidos pela técnica de ELISA. CTRL – : Amostras com resultados negativos na PCR e na gota espessa; CTRL 1: Amostras com resultado de PCR positivo e negativo na gota espessa; CTRL 2: Amostras com resultado de PCR positivo e positivo na gota espessa; DIAMED: Valores de  $\Delta DO/cutoff$  do fabricante

### 3.3. TESTE ELISA X IPA

Para observar se há ocorrência sazonal de casos de malária, nas amostras testadas, foi aplicado o teste de Fisher nos resultados positivos e negativos obtidos pelo  $\Delta DO/cutoff$  do teste ELISA de diferentes localidades e nos diferentes períodos (seca e chuva) de acordo com a nova faixa estabelecida pelo critério do controle 1.

Na Tabela 7, podemos observar o número de casos positivos e negativos relatados nos dois períodos estudados. As cidades de Altamira e Santarém foram excluídas da análise por apresentarem amostras somente em um dos dois períodos. A análise executada nas demais cidades não apresentou diferença significativa no número de casos positivos e negativos quando comparados aos períodos de chuva e seca ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 7** - Número de amostras positivas e negativas pelo ELISA por cidades e períodos.

Resultados	Cidades e Períodos													
	Belém		Altamira		Castanhal		Marabá		Santarém		Tucuruí		Zona End.	
	Chu	Sec	Chu	Sec	Chu	Sec	Chu	Sec	Chu	Sec	Chu	Sec	Chu	Sec
Positivo	15	19	8	-	4	-	3	3	-	7	4	-	9	1
Negativo	467	381	70	-	91	90	87	97	-	70	87	97	45	15

$P > 0,05$

Chu: Chuvoso

Sec: Seco

### 3.4. ANÁLISE DE $\Delta DO/Cutoff$ ENTRE CIDADES

Objetivando ampliar o estudo, que tem como finalidade principal a análise da eficácia e validação da técnica de ELISA para malária, foi feita uma análise através do teste de Kruskal-Wallis com os valores de  $\Delta DO/cutoff$  de todas as 1670 amostras, sem a separação por grupos de positivos ou negativos, para observar se ocorrem diferenças de leitura de  $\Delta DO/cutoff$  do teste de ELISA, ou seja, se todas as amostras estudadas obedecem ao mesmo padrão de leitura de  $\Delta DO/cutoff$  nas diferentes cidades.

Para selecionar as localidades que seriam utilizadas como parâmetro na utilização da comparação entre cidades, foi estabelecido como critério a probabilidade de se encontrar mais ou menos casos de malária. Assim, foram escolhidas as leituras de  $\Delta DO/cutoff$  das amostras de Belém e da Zona Endêmica.

Para realizar essa análise foi feita uma comparação de todos os valores de  $\Delta DO/cutoff$  entre cidades (Tabela 8). Com base nos resultados apresentados na Tabela 4, verifica-se também que ao comparar os  $\Delta DO/cutoff$  das amostras da cidade de

Belém com as demais cidades estudadas os resultados apresentaram-se significativos  $p < 0,05$  quando foram comparados com os  $\Delta DO/cutoff$  das cidades de Altamira, Santarém e com os da Zona endêmica, mostrando que essas cidades apresentam diferenças nas leituras de  $\Delta DO/Cutoff$ . Quando a análise foi realizada utilizando a Zona Endêmica como padrão de comparação com as demais cidades, foi observado que as leituras de  $\Delta DO/cutoff$  de Santarém e Altamira não obtiveram diferença significativa  $p > 0,05$ , demonstrando que as faixas de leituras de  $\Delta DO/cutoff$  dessas cidades são semelhantes.

**Tabela 8** – Comparação dos valores de  $P$  dos  $\Delta DO/cutoff$  entre cidades

Valores de $P$ para comparação de $\Delta DO/cutoff$ entre cidades						
Cidades	Belém	Altamira	Castanhal	Marabá	Santarém	Tucuruí
Altamira	<0,05	-	-	-	-	-
Castanhal	NS	<0,05	-	-	-	-
Marabá	NS	<0,05	NS	-	-	-
Santarém	<0,05	NS	<0,05	NS	-	-
Tucuruí	NS	<0,05	NS	<0,05	<0,05	-
Z.Endêmica	<0,05	NS	<0,05	<0,05	NS	<0,05

N.S: Não Significativo

### 3.5. ANÁLISE DO NÚMERO DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS POR CIDADE

Com a finalidade de observar o desempenho do teste ELISA em relação aos resultados positivos e negativos por cidade, foi utilizado o Teste do Qui-quadrado. As amostras seguem o padrão de positivos e negativos de acordo com o critério estabelecido pela faixa de  $\Delta DO/cutoff$  do controle 1.

As comparações foram realizadas entre os números de amostras positivas e negativas por cidade, tomando os resultados da cidade de Belém como parâmetro para a comparação com as demais cidades, devido a sua menor probabilidade de ocorrência de casos positivos para malária. Na Tabela 9 podemos observar a comparação das proporções dos resultados positivos e negativos de amostras da cidade de Belém, com os resultados das amostras das demais cidades.

Nossos resultados demonstram que há uma significância ( $p < 0,05$ ) na comparação das frequências de positivos e negativos da cidade de Belém quando comparadas com os resultados de Altamira, Santarém e da Zona Endêmica.

**Tabela 9** - Número de positivos e negativos selecionados através do critério do controle 1 de acordo com as cidades.

<b>Localidades Estudadas</b>								
<b>Resultado (<math>\Delta DO/cutoff</math>)</b>	<b>Belém</b>	<b>Altamira</b>	<b>Castanhal</b>	<b>Marabá</b>	<b>Santarém</b>	<b>Tucuruí</b>	<b>Zona End.</b>	<b>Total</b>
Pos ( $\geq 0.11$ )	34	8	4	6	7	4	10	73
Neg ( $< 0.11$ )	848	70	181	184	70	184	60	1597
P	-	0.0046	0.2092	0.6699	0.0298	0.3212	0.000	-

P: 0,000

#### 4. DISCUSSÃO

Em muitos países, inclusive no Brasil, o primeiro passo da triagem de doadores para a prevenção de TTM é feito através de questionário. Entretanto deve-se ressaltar que a prevenção completa de TTM por esse método não pode ser possível, pois o doador pode não entender algumas perguntas do questionário, ou simplesmente omitir respostas importantes para a triagem, como a estada em áreas endêmicas nos últimos 6 meses ou febre nos últimos 30 dias (Slinger *et al.*, 2001). Na Fundação HEMOPA o questionário é aplicado a todos os pacientes que a procuram para a doação, e os que estiveram em zonas endêmicas ou tiveram febre, perto do período antecedente à coleta são recusados. Entretanto, só foram coletadas amostras de pacientes oriundos das zonas endêmicas que procuraram a Fundação HEMOPA da capital, não tendo sido coletadas das demais UCTs. O questionário é feito pelo médico de uma maneira simples e informal, através de perguntas orais, objetivas e de fácil entendimento. Qualquer estratégia desenvolvida que busque minimizar o risco de introduzir parasitas de malária no sangue tem que ser eficaz, mas sem excluir desnecessariamente qualquer doador potencial, pois o fato de adiar a volta do doador por um período muito longo, pode levá-lo a não retornar ao banco de sangue.

Durante muitos anos, bancos de sangue de alguns países como Estados Unidos, França, Canadá, Inglaterra e outros utilizaram testes baseados na presença de anticorpos específicos para triagem de malária em doadores, principalmente em imigrantes que vinham de áreas endêmicas de malária. O teste considerado padrão ouro era o IFAT (Teste de Fluorescência Indireta de Anticorpo), porém, esse ensaio não indica necessariamente que a pessoa está com parasitas da malária, assim como um teste de anticorpo de malária negativo também não é garantia de que o doador não está

infectado com parasitas de malária, já que os anticorpos não conseguem ser detectados nos primeiros dias da infecção pelo parasito (Davidson *et al.*, 1999).

Estudos recentes sobre o EIAs (Ensaio Imunoenzimático de Antígenos), que utiliza antígenos recombinantes, mostram que o método é uma alternativa mais sensível e prática que o IFAT (Chiodini *et al.*, 1997; Kitchen *et al.*, 2004), mostrando-se um teste com alta sensibilidade e especificidade para a triagem de doadores.

Em nosso estudo, sugerimos a adoção de uma triagem de malária em doadores através de um método que busca a captura de um antígeno plasmodial, a pLDH, presente no estágio eritrocitário do parasita. Porém, estudos feitos por Kitchen & Chiodini (2006), não aconselham a adoção de uma triagem que utilize antígenos como alvo, pois os ensaios atuais que buscam a descoberta de antígeno da malária não são suficientemente sensíveis para a total exclusão da presença de parasitas de malária em uma unidade de sangue destinada para transfusão.

Técnicas que utilizam o antígeno de malária foram originariamente planejadas como uma alternativa mais rápida e objetiva para o diagnóstico, quando comparadas à microscopia. Tais técnicas, entretanto, são testes imunocromatográficos que utilizam sangue total como material de escolha, portanto, embora rápida e razoavelmente objetivas, não possuem sensibilidade suficiente para uso em um contexto de triagem. Os ensaios geralmente estão baseados na descoberta das principais proteínas específicas, como a proteína 2 rica em histidina (HRP-2), lactato desidrogenase plasmodial (pLDH) ou aldolase, a análise das sensibilidades variam de 100 para 1000 parasitas/ $\mu$ l, dependendo das espécies e do método, comparados com a técnica da gota espessa (Huong *et al.*, 2002). A maioria destes ensaios estão dispostos em formato de tiras (dipstick), que pode ser usado com mínimo treinamento e prevê um resultado

dentro de 10–20 min. Contudo, a sensibilidade relativa desses testes restringiram a aplicação em triagem de doadores.

Nosso estudo sugere a triagem de doadores através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), que utiliza a captura do antígeno pLDH, e não através de ensaios imunocromatográficos, como os que estão atualmente em uso. O teste ELISA sugere a detecção de parasitemias de 0,001 a 0,002%, porém ainda não encontra-se validado para a prática da triagem em doadores, sendo este o principal objetivo deste estudo.

Neste trabalho, inicialmente analisamos aspectos relacionados à especificidade e sensibilidade do ELISA Malaria *Antigen Test*, através da análise das leituras das 1670 amostras coletadas de diferentes cidades, com a finalidade de observar se o ponto de corte sugerido pelo fabricante realmente classifica o teste como apto como método de triagem de malária no sangue.

Os nossos resultados apontam que das 1670 amostras coletadas, quando analisadas seguindo o protocolo de ponto de corte do fabricante, somente 0,42% (7/1670) tiveram a detecção do antígeno pLDH, dos quais 0,45% (4/882) eram de doadores de Belém, 0,54% (1/185) de Castanhal, 1,3% (1/77) de Santarém e 1,42% (1/70) da Zona Endêmica, ou seja, somente essas amostras apresentaram resultados de  $\Delta DO/cutoff \geq 0,23$  sendo então classificadas como positivas. Somente 0,12% (2/1670) tiveram seus resultados enquadrados na zona cinza e as demais 99,4% (1661/1670) foram consideradas negativas. Entretanto esses resultados não podem ser considerados como definitivos, pois a técnica de ELISA ainda não está validada e precisa de ajustes no seu ponto de corte.

Os resultados obtidos no estudo, conforme o protocolo do fabricante, podem estar de acordo com a realidade da população de doadores, uma vez que os pacientes que procuram o serviço de doação são previamente selecionados, e submetidos à avaliações clínicas e epidemiológicas. Entretanto, não podemos esquecer da existência dos portadores assintomáticos de *Plasmodium*, capazes de manter parasitemias baixas e não apresentarem qualquer sintoma ou sinal de malária, passando despercebido pelo inquérito epidemiológico, podendo haver possível liberação de unidades infecciosas e subsequente transmissão pela via transfusional.

A preocupação com o grupo de pacientes assintomáticos é principalmente nas UCTs do interior do Estado, porque as mesmas aceitam doadores de localidades vizinhas que podem ser áreas de transmissão estável ou possuir focos epidêmicos, porém a imunidade natural leva anos para se desenvolver e só é mantida por exposição contínua. Conseqüentemente, a maioria dos indivíduos de regiões endêmicas está em um estado de semi-imunidade, caracterizado pela baixa na parasitemia circulante e sem manifestações clínicas da doença. A eliminação de parasitas circulantes de indivíduos semi-imune sem reinfecção contínua varia; *P.falciparum* geralmente é eliminado dentro de 2 anos, *P.vivax* de *P.ovale* dentro de 3 anos, mas *P.malariae* podem persistir por décadas (Seed *et al.*, 2005). Este longo período de duração da parasitemia assintomática é uma fonte potencial de TTM.

A ocorrência de portadores assintomáticos tem sido descrita nos países da África, onde a transmissão de malária é bastante intensa (Nsoby *et al.*, 2004; Njama-Meya *et al.*, 2004). Estudos feitos por Camargo *et al.*, 1999, observaram que durante o período de baixa transmissão, as baixas parasitemias são mantidas por esses portadores assintomáticos, podendo estar atuando como um reservatório do parasita,

participando da cadeia de transmissão, porém no Brasil ainda são recentes os estudos que buscam determinar a ocorrência desses portadores.

Em nosso estudo, como só foi possível a detecção de 0,42% de amostras positivas de acordo com o protocolo da DiaMed, uma nova faixa de ponto de corte foi estabelecida, utilizando amostras controles, ou seja, amostras com resultados confirmatórios da presença ou ausência de *Plasmodium* através da PCR, com a finalidade de testar a faixa de ponto de corte estabelecida pelo fabricante e tornar a técnica mais precisa e de maior sensibilidade, uma vez que em nosso estudo o teste padrão utilizado para a detecção de *Plasmodium* foi a PCR.

Para essa padronização foram selecionadas 4 amostras negativas pelo método da gota espessa, mas que possuíam resultados positivos de PCR, talvez por terem parasitemias tão baixas que não permitiram o diagnóstico pela microscopia óptica. As amostras foram submetidas ao teste ELISA e tiveram as suas faixas de  $\Delta DO/cutoff$  comparadas com as do fabricante, com a finalidade de observar se o comportamento da leitura de  $\Delta DO/cutoff$  positivos e negativos dessas amostras controle, encontrava-se equiparado com as faixas de resultados estabelecidas pelo fabricante.

Os nossos resultados demonstraram através da análise do controle 2 (amostras com gota espessa e PCR positivos para *Plasmodium*) que o ELISA Malaria *Antigen Test*, apresenta boa sensibilidade, além de ser bastante prático e de rápida execução, aspectos fundamentais para uma triagem de doadores de sangue, pois todas as 10 amostras desse grupo, tiveram a detecção da enzima pLDH pelo ELISA. Entretanto, quando essas amostras tiveram as suas faixas de resultados de  $\Delta DO/cutoff$  comparadas com as faixas de  $\Delta DO/cutoff$  estabelecidas pelo fabricante, três delas tiveram

discordância de resultados, onde uma amostra se classificava como negativa e as outras duas como zona cinza.

No estudo também foi observado que o teste ainda apresenta algumas falhas que não o torna apto para ser utilizado em uma triagem segura de banco de sangue, pois ao analisar as quatro amostras do controle 1 que foram confirmadas pela PCR, somente em uma delas foi possível obter a detecção de pLDH do parasito pelo teste ELISA, e essa amostra ao ter o seu valor de  $\Delta DO/cutoff$  comparado com a faixa de  $\Delta DO/cutoff$  estabelecida pela DIAMED, foi classificada como amostra da zona cinza (indeterminada) e as outras três como negativas, podendo levar essas amostras a resultados falso-negativos, resultados esses não aceitáveis em testes utilizados na triagem de bancos de sangue. Esses resultados sugerem a revisão das faixas de ponto de corte estabelecidas pelo fabricante, a fim de melhorar a eficiência da triagem.

A faixa de  $\Delta DO/cutoff$  do grupo controle 2 não foi selecionada para ser utilizada como parâmetro de exclusão ou inclusão de resultados positivos e negativos, pelo fato de que todas as suas amostras apresentaram detecção de parasito no sangue periférico através da microscopia, não se encaixando no perfil de seleção de amostras que o estudo pretende identificar, que é o de observar a capacidade de identificação de portadores possivelmente assintomáticos. Entretanto a presença desse grupo no estudo teve um papel muito importante, pois ele foi capaz de avaliar a eficiência da técnica, demonstrando que este possui uma ótima sensibilidade, além de determinar uma faixa de  $\Delta DO/Cutoff$  importante no resultado do estudo.

Todas as amostras do estudo tiveram uma re-classificação baseada na leitura de  $\Delta DO/cutoff$  do controle 1, estabelecendo um critério de que todas as amostras com  $\Delta DO/cutoff \geq 0,11$  teriam os seus resultados agrupados como positivos e abaixo

desse valor como negativos, e todas as demais análises feitas no estudo foram baseadas nesse novo critério de positividade.

Os nossos resultados demonstraram que, de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante, uma porcentagem de 0,42% de amostras eram positivas e que quando ajustada sua faixa de  $\Delta DO/cutoff$  de acordo com o critério do controle 1, passou para 4,37%, discordando do estudo feito por Sáez-Alquézar *et al* (1998). Este, busca a verificação de ocorrência de malária em doadores de três bancos de sangue do Brasil, dos quais, 1200 doadores eram de localidades sem transmissão ativa de malária, 238 com baixa transmissão e 31 de áreas com alta transmissão ativa. Foram usados outros métodos para detecção de parasitas da malária, como o QBC Test ® (Quantitative Buffy Coat) para pesquisa de *Plasmodium* e a Imunofluorescência para a detecção de antígenos. Não foram encontrados casos positivos nas áreas sem transmissão e com baixa transmissão. Na área de alta transmissão um caso de *P. vivax* foi detectado pelo QBC Test ® em candidato a doação de plaquetas, para um paciente submetido a transplante de medula óssea, não sendo relatado nenhum caso positivo pela imunofluorescência em nenhuma das áreas. Este fato mostra a necessidade da padronização de procedimentos adequados, para evitar a transmissão de malária pela via transfusional, por parte de indivíduos provenientes de áreas com transmissão ativa.

Apesar dos resultados da nova faixa elevarem o número de casos positivos de (7/1670) 0,42% para (73/1670) 4,37%, mostrando-se totalmente discrepante com o número de casos positivos detectados pelo protocolo da DiaMed, não podemos afirmar que todas essas 73 amostras selecionadas, conforme o critério do controle 1 são realmente positivas. Entretanto podemos inferir que algumas delas

possam ter seus resultados positivos, pois o teste ainda não possui um ponto de corte validado para seleção eficiente de positivos e negativos.

Estes resultados podem ser considerado como número alto de amostras positivas em relação ao resultado encontrado pelo ponto de corte do fabricante. Para triagem de banco de sangue os resultados falso-positivos são importantes, pois há o descarte das bolsas e os resultados falso-negativos favorecem a transmissão de agentes infecciosos pela via transfusional. O ELISA Malaria *Antigen Test* mostrou-se sensível, mas ainda são necessários estudos posteriores, que deverão incluir a comparação de um número maior de amostras controles isentas de parasitemia em lâmina, com confirmação pela técnica do PCR, a fim de poder associar e esclarecer a presença do antígeno pLDH detectado pelo ELISA com a presença de parasitas viáveis para a detecção pelo PCR. Além disso, acreditamos que associar essa técnica com outras técnicas que detectem anticorpos para malária com confirmação pela PCR, diminuirá os riscos possíveis de transmissão de malária pela via transfusional.

Neste trabalho, também foram analisados aspectos relacionados à sazonalidade da doença nas cidades incluídas no estudo, com a finalidade de verificar diferenças no número dos resultados positivos e negativos no Teste ELISA para malária, nos diferentes períodos, principalmente no final do período chuvoso.

A incidência de malária na Amazônia, assim como em outras regiões tropicais, sofre variações com as estações do ano. Nessas regiões a temperatura é praticamente estável, mas os índices de umidade variam conforme a época do ano, assim o ritmo de propagação da malária se dá de acordo com as chuvas e a estiagem diminui a proliferação de mosquitos contribuindo para o decréscimo do número de casos da doença (Tadei *et al.*, 1998; Kiszewski *et al.*, 2004).

O vetor da malária tem como criadouro grandes coleções de água como represas, lagos, lagoas e remansos de rio. A sua sazonalidade está relacionada ao nível das águas dos rios e aos períodos de chuvas e secas. O aumento das chuvas resulta em uma elevação de mosquitos viáveis, ocasionando ondas epidêmicas. Por outro lado, as fortes chuvas podem arrastar as formas imaturas dos mosquitos para locais inadequados, destruindo os criadouros e resultando em um declínio da incidência de malária. Assim, o período de maior densidade de mosquitos coincide com a estabilização dos seus criadouros, após as fortes chuvas (Tadei *et al.*, 1998).

Os municípios de escolha para esse estudo foram: Altamira, Marabá, Tucuruí, Santarém e Castanhal, essas localidades podem não ser apresentadas como endêmicas, mas pode ser que possuam dentro de suas áreas locais rurais ou de periferia, transmissão estável ou focos epidêmicos. A seleção das cidades foi dada pela facilidade de obtenção de amostras, uma vez que a Fundação HEMOPA possui unidades de coleta e transfusão naquelas localidades. Além dessas áreas, um grupo de doadores estiveram em zonas endêmicas nos últimos 30 dias que antecederam a procura do banco de sangue para doação, também foi incluído na análise.

O estado do Pará possui aproximadamente 143 municípios, e é o estado que apresenta a maior incidência da doença no Brasil nos anos de 2000 a 2002 (Nobre, 2003). No ano de 2005 foram registrados 120.338 casos de malária, correspondendo a 21% do total de casos da Amazônia Legal. Em comparação a 2004, apresentou aumento de 8,3%.

Em 2005, 19 dos 143 municípios existentes no Estado contribuíram com 80% dos casos de malária na Amazônia Legal. Comparando com o ano anterior, dez

desses municípios apresentaram aumento no número de casos, enquanto nove registraram redução.

Dos dez municípios que tiveram aumento, destacaram-se os municípios de Marabá e Tucuruí registrando um aumento de 53,3 % e 60,7 % respectivamente em 2005, já o município de Altamira registrou uma redução de 14,2 % no ano de 2005.

Com base nas notificações dos casos de malária das cidades estudadas, de acordo com a SESPA, foi observado que o pico sazonal ocorre no final do período de chuvas e o IPA de algumas cidades tiveram algum aumento durante os anos de 2004-2005, mas o que mais se destacou foi o da cidade de Tucuruí, que no ano de 2004 apresentava um IPA de 60,4 e no ano de 2005 passou para 105. Entretanto, esses casos nem sempre correspondem aos dados reais do município, pois essas notificações apesar de serem feitas na cidade, podem ser de municípios próximos a Tucuruí, talvez isso explique o aumento do IPA.

Apesar de saber que existe uma sazonalidade da doença e que existe transmissão de malária no município de Belém, inclusive na área urbana, (Povoa *et al*; 2003) ocorrendo transmissão principalmente no final do período chuvoso, em nosso estudo não foi observada diferença significativa no número de casos positivos e negativos executados pelo teste ELISA nos períodos de chuva e seca.

Nas zonas urbanas das cidades não foi encontrada diferença significativa no número de casos positivos e negativos, porém não há informações a cerca da sazonalidade dos casos de malária em doadores que moram nas áreas endêmicas em volta desses centros urbanos. Entretanto, não se sabe de que maneira é feito o inquérito epidemiológico nas UCTs das cidades do interior, uma vez que não foram selecionadas amostras das zonas endêmicas perto dessas UCTs, não se tendo o conhecimento a

respeito da sazonalidade dos casos que ocorrem em áreas endêmicas pertos desses centros urbanos. O inquérito epidemiológico feito na Fundação HEMOPA da capital mostrou bastante eficiência, pois das 70 amostras de pacientes que relataram ter estado em zonas endêmicas, 10 apresentaram resultados positivos de acordo com o critério do controle 1, onde se encontrou (9 no período chuvoso e 1 no período de seca), demonstrando que o inquérito está funcionando em pacientes que procuraram a Fundação da capital e que estiveram nessas áreas.

As notificações de casos de malária demonstram que algumas cidades nos anos de 2003 e 2004 apresentaram um IPA alto, como nos municípios de Altamira em Tucuruí. Dados da SESPA também mostram que o maior índice de aumento ocorreu principalmente no período de junho a setembro, final do período chuvoso. O menor IPA registrado nesses anos foi dado pelas cidades de Belém e Castanhal.

Apesar das notificações mostrarem uma maior incidência de casos positivos no final do período chuvoso, essa diferença não foi observada, não foi relatado diferença no número de amostras positivas e negativas quando analisados pelo teste ELISA.

Porém, em nosso estudo, apesar de não terem sido observados diferenças significativas de amostras positivas e negativas no período posterior as chuvas, foram encontradas diferenças na leitura de  $\Delta DO/cutoff$  do teste ELISA, nas cidades de Altamira e Santarém quando comparadas com os  $\Delta DO/cutoff$  de Belém e da Zona Endêmica, áreas selecionadas devido a maiores chances de se encontrar menos e mais casos de malária respectivamente.

A comparação quando foi feita tomando a cidade de Belém como parâmetro, os resultados de  $\Delta DO/cutoff$  mostraram-se significativos, em relação as

amostras de Altamira, Santarém e Zona Endêmica. Talvez essa diferença de leituras possa inferir que nessas localidades as chances são maiores de ocorrer mais casos de malária do que a cidade de Belém. Outra análise realizada no trabalho também confirmou diferenças significativas em Altamira, Santarém e Zona Endêmica de amostras consideradas positivas e negativas, de acordo com a nova faixa de  $\Delta DO/Cutoff$  tomando a cidade de Belém como parâmetro de comparação.

Ambas as análises confirmam o esperado, menor chance de se encontrar casos de malária na capital que no interior, porém não podemos afirmar com certeza se realmente todas as amostras selecionadas como positivas e negativas pelo teste de ELISA são verdadeiramente positivas ou negativas, pois o ponto de corte do fabricante ainda não está definido nem validado, e essa divisão foi feita baseada em critérios estabelecidos no estudo através de amostras controles.

Quando o parâmetro de comparação utilizado foram as amostras da Zona Endêmica, as leituras de  $\Delta DO/cutoff$  das cidades de Altamira e Santarém não foram significativas, ou seja, nessas áreas o perfil de leituras de  $\Delta DO/cutoff$  foi semelhante, sugerindo que essas cidades possuem a mesma possibilidade de apresentarem casos de malária que as amostras da Zona Endêmica (Tabela 8), porém as notificações da SESPA mostram que no ano de 2003 a cidade de Altamira apresentou um IPA de 72,5 e Santarém 2,44, e em 2004 o IPA dessas cidades foram de 64,7 e 3,8 respectivamente, sugerindo que o maior número de amostras positivas detectados pelo teste ELISA poderia ser encontrado na cidade de Altamira, mas em Santarém a possibilidade seria menor, devido aos baixos valores de IPA durante os dois anos do estudo.

Os nossos resultados sugerem, de acordo com a análise de seleção das amostras positivas feitas através do teste ELISA, que a maior chance de encontrar

pacientes positivos para malária é em Altamira, Santarém e nas Zonas Endêmicas, porém as notificações da SESPA mostram que, nos anos de 2003 e 2004 os maiores números de casos registrados provêm de Tucuruí, Marabá e Altamira. Entretanto, em nosso estudo, Tucuruí e Marabá se mostraram estatisticamente iguais à cidade de Belém em chances de se encontrar casos positivos para malária. Dessa forma, devemos considerar também a possibilidade de expandir este estudo para outras áreas de transmissão, a fim de observar se o comportamento do resultado de positividade do teste encontra-se semelhante com as demais áreas já estudadas.

Muitas estratégias de controle da malária são feitas em todo o Estado, a fim de minimizar a transmissão da doença, através de diagnósticos e tratamentos dos indivíduos, embora os casos de TTM não sejam comuns dentro de áreas não endêmicas o número de doadores que possuem o risco de adquirir malária pode aumentar o número de casos dessas áreas, uma vez que, os doadores implicados em TTM invariavelmente são assintomáticos, com densidades de parasita abaixo do limite de descoberta dos atuais ensaios disponíveis. Assim, para uma boa triagem de doadores, estratégias efetivas devem ser criadas, incluindo triagens clínico-epidemiológicas, associadas com ferramentas sorológicas eficazes o suficiente para assegurar a qualidade do sangue para a doação, reduzindo ao máximo o risco de transmissão pela via transfusional.

## 5. CONCLUSÕES

- O *ELISA-Malaria Antigen Test* é sensível, prático e de rápida execução, podendo ser utilizada em triagens de doadores de sangue.
- Há recomendações de ajustes no ponto de corte do *ELISA-Malaria Antigen Test*
- Não há diferença significativa entre positividade e sazonalidade nas cidades estudadas.
- A cidade de Belém apresenta menor chance de encontrar casos de malária do que as cidades de Altamira, Santarém e nas da Zona Endêmica.
- O inquérito epidemiológico feito na Fundação HEMOPA foi feito de uma maneira correta, sendo capaz de detectar uma percentagem de 4,37% de resultados positivos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AKINBOYE, D.O., OGUNRINADE, A.F., Malaria and loiasis among blood donors at Thadan, Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. **81**: 398-399, 1987.
- ALVES, F.P., DURLACHER, R.R., MENEZES, M.J. KRIEGER, H., SILVA, L.H.P., CAMARGO, E.P., High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **66 (6)**: 641-648, 2002.
- ANDRADE, A.L.S.S., MARTELLI, C.M.T., OLIVEIRA, R.M., ARIAS, J.R., ZICKER, F., PANG, L. High prevalence of asymptomatic malaria in golg ninig areas in Brazil. **Clinical Infections Diseases**, **20**: 475, 1995.
- ASHLEY, E., MCGREADY, R., PROUX, S., NOSTEN, F. Malaria. **Travel Medicine and Infections Disease**, **4**: 159-173, 2006.
- ASLAN, G., ULUKANLIGIL, M., SEYREK, A., EREL, O. Diagnostic performance characteristics of rapid dipstick test for *Plasmodium vivax* malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **96**: 683-686, 2001.
- ÁVILA, S.L.M., LEANDRO, M.C., ARRUK, V.G., CARVALHO, N.B., OLIVEIRA, M.S., SANCHEZ, M.C.A., BOULOS, M., FERREIRA, A.W. Evaluation of different methods for *Plasmodia* detection in well defined population groups in an endemic area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **36**: 157-162, 1994.

- ÁVILA, S. L. M., FERREIRA, A. W. An appraisal of laboratory methods addressing roll back malaria. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, **52**: 220-229, 2000.
- AYRES, M., JR. AYRES, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. S. **BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém, Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq, 2005.
- BAIRD, K.J., JONES, P., PONTES, T.R., Diagnosis of malaria in the field by fluorescence microscopy of QBC capillary tubes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **86**: 3-5, 1992.
- BARTOLONI, A., SABATINELLI, G., BENUCCI, M. Performance of two rapid tests for *Plasmodium falciparum* malaria in patients with rheumatoid factors. **The New England Journal of Medicine**, **338**: 1075, 1998.
- BENITO, A., ROCHE, J., MOLINA, R., AMELA, C., ALVAR, J. Application and evaluation of QBC malaria diagnosis in a holoendemic area. **Applied Parasitology**, **35(4)**: 266-72, 1994.
- BOTERO, D., RESTREPO, M. **Parasitosis Humanas 3<sup>ra</sup> ed.** Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas, 1998. p. 149-189.
- BRUCE, M. C., ALANO, P., DUTHIE, S., CARTER, R. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, **100**: 191-200, 1990.
- BRUCE, M.C., DONNELLY, C.A., PACKER, M., LAGOG, M., GIBSON, N., NARARA, A., WALLIKER, D., ALPERS, M.P., DAY, K.P. Age-and species-specific duration of infection in asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. **Parasitology**, **121**: 247-256, 2000.

- BRUCE-CHAWATT, L. J. Historical outline. In: **Essential Malariology**. London: William Heinemann, 1980. p.1-9.
- BRUCE-CHWATT, L. J. In: **Essential Malariology**. 2<sup>nd</sup> Ed. London: William Heinemann Medical Books, 1985. p. 452.
- BRUCE-CHWATT, L. J. History of malaria from prehistory to eradication. In: **Malaria: Principles and Practice of Malariology**. McGregor, I.A. (ed). Churchill Livingstone, Edingburg, London, Melbourne and New York, 1988. p.1-60.
- CAMARGO, L. M.A., COLLETO, G. M. D. D., FERREIRA, M. U, GURGEL, S. M, ESCOBAR, A. L., MARQUES, A., KRIEGER, H., CAMARGO, E. P., SILVA, L. H. P. Hypoendemic malaria in Rondonia (Brazil, western Amazon region): seasonal variation and risk groups in an urban locality. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **55 (1)**: 32–38, 1996.
- CAMARGO, E. P., ALVES, F., SILVA, L. H. P. Symptomless *Plasmodium vivax* infection in natives Amazonians. **The Lancet**, **353 (24)**: 1415-1416, 1999.
- CHAIKUAD, A., FAIRWEATHER, V., CONNERS, R., JOSEPH-HORNE, T., TURGUT-BALIK, D., BRADY, R.L. Structure of Lactate Dehydrogenase from *Plasmodium vivax*: complexes with NADH and APADH. **Biochemistry**, **44**: 16221-16228, 2005.
- CHIODINI, P.L., HARTLEY, S., HEWITT, P.E, BARBARA, J.A., LALLOO, K., BLIGH, J. Evaluation of a malaria antibody ELISA and its value in reducing potential wastage of red cell donations from blood donors exposed to malaria, with a note on a case of transfusion-transmitted malaria. **Vox Sanguinis**, **73**: 143-148, 1997.

- CICERON, L., JAUREGUIBERRY, G., GAY, F., DANIS, M. Development of a *Plasmodium* PCR for a monitoring efficacy of antimalarial treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**: 35-38, 1999.
- CONTRERAS, C. E., PANCE, A., MARCANO, N., GONZÁLEZ, N., BIANCO, N. Detection of Specific Antibodies to *Plasmodium falciparum* in Blood Bank Donors from Malaria-Endemic and non-Endemic Areas of Venezuela. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **60 (6)**: 948-953, 1999.
- CRAIG, M., SHARP, B.L., Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **91**: 279-282, 1997.
- DAVIDSON, N., WOODFIELD, G., HENRY, S. Malarial antibodies in Auckland blood donors. **The New Zealand Medical Journal**, **112**: 181-183, 1999.
- DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81** (Supl II): 5-14, 1986.
- DOVER, A.S., GUINEE, V.F. Malaria transmission by leukocyte component therapy. **The Journal of the American Medical Association**, **217**: 1701-1702, 1971.
- FARID, Z., KILPATRICK, M. E., CHIODINI, P. L. Parasites diseases of the liver. **In: Diseases of the Liver**. Schiff, L. & Schiff, E. R. (eds). Philadelphia, Lipincott Company, 1993. p. 1338-1355.
- FARNERT, A., AREZ, A. P., CORREIA, A. T, BJORKMAN, A., SNOUNOU, G., ROSARIO, V. Sampling and storage of blood and detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **93**: 50-53, 1999.

- FREITAS, M.G.R. *Anopheles (Nissorhyncus) deneorum*: a new species in the *albitarsis* complex (Diptera: culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **84**: 535-43, 1989.
- FRYAUFF, D. J., MOCHAMMAD, A. S., ELYASAR, I. R. S., SUSANTI, I., SUBIANTO, B., MARWOTO, H. Performance of the OptiMAL® assay for detection and identification of malaria infections in asymptomatic residents of Irian Jaya, Indonesia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **63**: 139-145, 2000.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). Malária. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em 10 de novembro de 2004.
- GARFIELD, M.D., ERSHLER, W.B., MAKI, D.G. Malaria transmission by platelet concentrate transfusion. **The Journal of the American Medical Association**, **240**: 2285-2286, 1978.
- GILLES, H. M. The malaria parasite. **In: Essential Malariology**. Gilles, H. M., Warrell, D. A. (eds). London, Edward Arnold, 1993. p.12-34.
- GROBUSH, M.P., ALPERMANN, U., SCHWENKE, S., JELINEK, T., WARHURST, D.C. False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. **The Lancet**, **353**: 297, 1999.
- HUONG, N.M., DAVIS, T.M., HEWITT, S., HUONG, N.V., UYEN, T.T., NHAN, D.H., CONG LE, D. Comparison of the er antigen detection methods for diagnoses and therapeutic monitoring of malaria: A field study from southern Vietnam. **Tropical Medicine and International Health**, **7**: 304-308, 2002.

- HVIID, L. Clinical disease, immunity and protection against *Plasmodium falciparum* malaria in population living in endemics areas. **Expert Reviews in Molecular Medicine, 1998:** 1-10, 1998.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Anuário estatístico do Brasil.** Rio de Janeiro, 2004.
- KIMURA, M., KANECO, O., LIU, Q., ZHOU, M., KAWAMOTO, F., WATAYA, Y., OTANI, S., YAMAGUSHI, Y., TANABE, K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variants sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International, 46:** 91-95, 1997.
- KISZEWSKI, A., MELLINGER, A., SPIELMAN, A., MALANEY, P., SACHS, S. E., SACHS, J. **A global index representing the stability of malaria transmission.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70 (5): **486-498, 2004.**
- KITCHEN, A.D., LOWE, P.H.J., LALLOO, K., CHIODINI, P.L. Evaluation of a malarial antibody assay for use in the screening of blood and tissue products for clinical use. **Vox Sanguinis, 84:** 150-155, 2004.
- KITCHEN, A.D., CHIODINI, P.L. Malaria and blood transfusion. **Vox Sanguinis, 90:** 77-94, 2006.
- KNOBLOCH, J., HENK, M. Screening for malaria by determination of parasite-specific lactate dehydrogenase. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 89:** 269-270, 1995.
- KORENROMP, E., MILLER, J., NAHLEN, B., WARDLAW, T., YOUNG, M. World malaria report. **Geneva: Roll Back Malaria Partnership, World Health Organisation and United Nations Children's Fund (UNICEF); 2005.**

- KRETTLI, A. U. The immune response to malaria sporozoite antigens in animal models and humans: A retrospective overview and present goals. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, **46**: 446-454, 1994.
- KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoites and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, **79**:1-11, 1985.
- LAL, A.A., CHANGKASIRI, S., HOLLINGDALE, M.R., McCUTCHAN, T.F. Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **36**: 67-72, 1989.
- LOIOLA, C. C. P., MANGABEIRA DA SILVA, C. J., TAUIL, P. L. Controle da malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health**, **11**: 235-244, 2002.
- MACHADO, R. L. D., D' ALMEIDA COUTO, A. A. R., CAVASINI, C. E., CALVOSA, V. S. P. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36** (5): 581-586, 2003.
- MAKLER, M. T., HINRICHS, D.J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **48**: 205-210, 1993.
- MAKLER, M. T., PIPER, R. C. MILHOUS, W. Lactate dehydrogenase and the diagnosis of Malaria. **Parasitology Today**, **14** (9): 376-377, 1998.
- MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA. Série A. Normas e Manuais Técnicos Brasília–DF 2005. p.14.

- MANUAL DE TERAPÊUTICA DA MALÁRIA/Colaboração de Agostinho Cruz Marques *et al.* Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2001. p.104.
- MARQUES, A. C. Migration and the dissemination of malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81** (Sup. II): 17-30, 1986.
- MARQUES, A. C., GUTIERREZ, H. C. Combate à malária no Brasil: evolução, situação atual e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27** (supl.III): 91-108, 1994.
- MASON, D.P., WONGSRICHANALAI, C., LIN, K., MILLER, R.S., F, KAWAMOTO. The panmalarial antigen detected by the ICT malaria P.f./P.v. immunochromatographic test is expressed by *Plasmodium malariae* **Journal of Clinical Microbiology**, **39**: 2035, 2001.
- MILLER, L. H., BARUCH, D. I., MARSH, K., DOUBO, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, **415**: 673-679, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue. **Série A. Normas e Manuais Técnicos Brasília-DF 2004**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 03 de janeiro de 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária – PNCM**. Brasília, Ministério da Saúde, 2003. p.7.
- MOORE, S. A., SURGEY, E. G. E., CARDWGAN, A. M. Malaria Vaccines: where are we and where are we going ?. **The Lancet Infections Diseases**, **2**: 737-743, 2002.

- MOTA, M. M., RODRIGUEZ, A. Migration through host cells by apicomplexan parasites. **Microbes and Infection**, **3**: 1123-1128, 2001.
- MUNGAI, M., TEGTMEIER, G., CHAMBERLAND, M., Parise, M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. **The New England Journal of Medicine**, **344**: 1973-1979, 2001.
- NJAMA-MEYA, D., KAMYA, M.R., DORSEY, G. Asymptomatic parasitemia as a risk factor for symptomatic malaria in cohort of Ugandan children. **Tropical Medicine and International Health**, **9 (8)**: 862-868, 2004.
- NOBRE, A.A. **A relação entre a malária e a chuva no Estado do Pará: uma análise espaço-temporal**. Dissertação (Mestrado em Estatística)-Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003. 3-6p.
- NOEDL, H., WONGSRICHANALAI, C., WERNSDORFER, W. Malaria drug-sensitivty testing: new assays, new perspectives. **Parasitology**, **19 (4)**: 175-181, 2003.
- NSOBYA, S.L., PARIKH, S., KIRONO, F., LUBEGA, G., KAMYA, M.R., ROSENTHAL, P.J., DORSEY, G. Molecular evaluation of the natural history of asymptomatic parasitemias in Uganda children. **Journal of Infection Diseases**, **189 (7)**: 1-9, 2004.
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Situação de los Programas de Malaria em las Américas, 1998. **Informe Revista Panamericana Salud Publico/ Panamericana American Journal Public Health**, **8(5)**: 363-367, 2000.
- ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). **Informe de la Situación de los Programas de Malaria em las Américas**, 2003. p. 49.

- PARK, C.G., CHWAE, Y.J., KIM, J., LEE, J.H., HUR, G.M., JEON, B.H., KOH, J.S., HAN, J.H., LEE, S.J., PARK, J.W., KASLOW, D.C., STRICKMAN, D., ROH, C.S. Serologic responses of Korean soldiers serving in malaria-endemic areas during a recent outbreak of *Plasmodium vivax*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **62**: 720-725, 2000.
- PASSOS, A. D. C., FIALHO, R. R. Malária aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31** (Supl. III): 93-105, 1998.
- PHILLIPS, R.S. Current status of malaria and potencial for control. **Clinical Microbiology Reviews**, **14** (1). 208-226, 2001.
- PIERONI, P., MILLS, C.D., OHRT, C., HARRINGTON, M.A., KAIN, K.C., Comparasion of the Parasigth-F test and the ICT Malaria Pf test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **92**: 166-169, 1998.
- PIPER, R., LEBRAS, J., WENTWORTH, L., COOKE, A. H., HOUZE, S., CHIODINI, P. MAKLER, M. Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **60**: 109-118, 1999.
- PLAYFORD, E.G., WALKER, J. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travelers. **Journal of Clinical Microbiology**, **40** (11): 4166-4171, 2002.

- PORNSILAPATIP, J., NAMSIRIPONGPUN, V., WILDE, H., HANVANICH, M., CHUTIVONGSE, S. Detection of plasmodia in Acridine Orange stained capillary tubes (The QBC system). **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, **21**: 534-540, 1990.
- PÓVOA, M. M., SILVA, A. N. M., SANTOS, C. C. B., SEGURA, M. N. O., MACHADO, R. L. D. Malária transmission. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, **52**: 208-212, 2000.
- PÓVOA, M.M., COMN, J.E., SCHILICHTING, C.D., AMARAL, C.O.F., SEGURA, M.N.O., SILVA, A.N.M., SANTOS, C. C. B., LACERDA, R.N.L., SOUZA, R.T.L., GALIZA, D., SANTA ROSA, E.P., WIRTZ, R.A. Malaria vectors, epidemiology and the re-emergence of *Anopheles darlingi* in Belém, Pará, Brazil. **Journal Medical Entomology**, **40**:379-86, 2003.
- PRATA, A., URDANETA, M., MCGREEVY, P. B, TADA, M. S. Infrequency of asymptomatic malaria in an endemic area in Amazonas, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **21(2)**: 51–54, 1988.
- RACHOU, R.G. Anofelinos no Brasil: comportamento das espécies vetoras da malária. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, **10**: 145-81,1958.
- Resolução RDC nº153 de 14 de junho de 2004.** Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea.

- ROSEMBERG, R., WIRTZ, R. A., SCHNEIDER, I., BURGE, R. An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **84**: 209-212, 1990.
- ROSHANRVAN, B., KARI, E., GILMAN, R.H., CABRERA, L., LEE, E., METCALFE, J., CALDERON, M., LESCANO, A.G., MONTENEGRO, S.H., CALAMPA, C., VINETZ, J.M. Endemic malaria in the Peruvian amazon region of Iquitos. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **69 (1)**: 45-52, 2003.
- ROSS, R. An improvement method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. *The Lancet*, 1: 86-87, 1903.
- SÁEZ-ALQUEZAR, A., RAMOS, A.M., DI SANTI, S.M., BRANQUINHO, M.S., KIRCHQATTER, K., CORDEIRO, I.A., MURTA, M., SARAIVA, J.C., OLIVEIRA, S.G., BOCHETTI, M.G., PIROLLA, J.A., GUERZONE, D., CHAMONE, D.A. Control of blood transfusion malaria in an endemic and in a non-endemic region in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31 (Supl. I)**: 27-34, 1998.
- SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. Malária- Estratégia para controle e prevenção e situação epidemiológica. **Boletim epidemiológico da malária nº 02 – Dezembro 2003**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs>. Acesso em 10 de novembro de 2004.
- SECRETARIA EXECUTIVA DE SAÚDE PÚBLICA DO PARÁ (SESPA). **Atualização em situação em saúde**, 2006. Disponível em <http://www.sespa.pa.gov.br>. Acesso em 24 de julho de 2006.

- SEED, C.R., KITCHEN, A. DAVIS, T.M.E. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. **Transfusion Medicine Reviews**, **19 (3)**: 229-240, 2005.
- 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 (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Belém, Universidade Federal do Pará, 1998.
- SETHABUTR, O., BROWN, A.E., PANYIN, S., KAIN, K.C., WEBSTER, K., ECHEVERRIA, P. Detection of *Plasmodium falciparum* by polymerase chain reaction in a field study. **The Journal of infectious diseases**, **166**: 145-148, 1992.
- SHERMAN, I. W. Heterogeneity of lactic dehydrogenase in avian malaria (*Plasmodium lophurae*). **Journal of Experimental Medicine**, **114**: 1049-1062, 1961.
- SILVA-VASCONCELOS, A., KATO, M.Y.N., MOURÃO, E.M., SOUZA, R.T.L., LACERDA, R.N.L., SIBAJEV, A., TSOURIS, P., PÓVOA, M.M., MOMEN, H., ROSA-FREITAS, M.G. Biting índices, host-seeking activity and natural infection rates of Anopheline species in Boa Vista, Roraima, Brazil, from 1996 to 1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**:151-61,2002.
- SILVIE, O., THELLIER, M., ROSENHEIM, M., DATRY, A., LAVIGNE, P., DANIS, M., MAZIER, D. Potential value of *Plasmodium falciparum*-associated antigen and antibody detection for screening of blood donors to prevent transfusion-transmitted malaria. **Trasnfusion**, **42**: 357-362, 2002.

- SLINGER, R., GIULIVI, A., BODIE-COLLINS, M., HINDIEH, F., ST. JOHN, R., SHER, G., GOLDMAN, M., RICKETTS, M., KAIN, K.C. Transfusion-transmitted malaria in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, **164**: 377-379, 2000.
- SOUZA, J. B., RILEY, E. M. Cerebral Malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, **4**: 291-300, 2002.
- SOUZA, J. M., CALVOSA, V. S. P., VENTURA, A. M. R., PINTO, A. Y. N. SILVA, R. S. U., LIBONATE, R. M. F. Malaria. **In: Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência**. Tonelli, E. & Freire, L. M. S. (eds). Ed. Medsi. Rio de Janeiro, 2000. v.2, p. 1271-1296.
- SPIELMAN, A., PERRONE, B., TEKLEHAIMANOT, A., BALCHA, F., WARDLAW, S.C., LEVINE, R.A., Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **39**: 337-342, 1988.
- TADEI, W.P., THATCHER, B.D., SANTOS, J.M.M., SCARPASSA, V.M., RODRIGUES, I.B., RAFAEL, M.S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **59 (2)**: 325-335, 1998.
- TAUIL, P. L. Comments on the epidemiology and control of Malaria in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **81 (Supl.II)**: 39-41, 1986.
- VINETZ, J.M., GILMAN, R.H. Asymptomatic *Plasmodium* parasitemias and the ecology of malaria transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **66 (6)**: 639-640, 2002.

- WARDLAW, S.C., LEVINE, R.A. Quantitative buffy coat analysis. A new laboratory toll functioning as a screening complete blood cell cont. **Journal of the American Medical Association**, **249**: 617, 1983.
- WARHUST, D.C., EL KARIEM, F.M.A., MILES, M.A. Simplified preparation of malaria blood samples for polymerase chain reaction. **The Lancet**, **337**: 303-304, 1991.
- WELLEMS, T.E., MILLER, L.H. Two worlds of malaria. **The New England journal of medicine**, **349 (16)**: 1496–1498, 2003.
- WILKERSON, R.C., GAFFIGAN, T.V., BENTO LIMA. J. Identification of species related to *Anopheles (Nyssorhyncus) albitarsis* by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **90**:721-32, 1995a.
- WILKERSON, R.C., PARSONS, T.J., KLEIN, T.A., GAFFIGAN, T.V., BERGO, E., CONSOLIM, J. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhyncus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. **Journal of Medical Entomology**, **32**: 697-704, 1995b.
- WONGSRICHANALAI, C., PORNILAPATIP, J., NAMSIRIPONGPUN, V., WEBSTER, H.K., LUCCINI, A., PANSAMDANG, P., WILDE, H., PRASITTISUK, M. Acridine Orange Fluorescent Microscopy and the detection of malaria in populations with low density parasitemia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **44**: 17-20, 1991.

- WOODEN, J., GOULD, E.E., PAULL, A.T., SIBLEY, C.H. *Plasmodium falciparum*: a simple polymerase chain reaction method for differentiating strains. **Experimental Parasitology**, **75**: 207-212, 1992.
- WOODEN, J., KYESS., SIBLEY, C.H. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Today**, **9 (8)**: 303-305, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). What is malaria? **Roll Back Malaria**. Disponível em: <http://www.who.int/dsa>. Acesso em 15 de novembro de 2004.
- XAVIER, M. M. S. P., REBELO, J. M. M. Espécies de *Anopheles* (Culicidae, Anophelidae) em áreas endêmicas de malária , Maranhão, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, **33 (6)**: 535-541, 1999.
- ZALLIS, M.G., FERREIRA DA CRUZ, M.F., BALTHAZAR-GUEDES, H.C., BANIC, D.M., ALECRIM, W., SOUZA, J.M., DRUILHE, P., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain-reaction for detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. **Parasitology Research**, **82**: 612-616, 1996.

## ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

**PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

1. **Protocolo:** Nº 010/2005-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** AVALIAÇÃO DE TESTE ELISA PARA MALÁRIA PARA SELEÇÃO DE DOADORES DE SANGUE.
3. **Pesquisador Responsável:** Jose Alexandre Rodrigues de Lemos.
4. **Instituição / Unidade:** HEMOPA
5. **Data de Entrada:** 09/03/2005
6. **Data do Parecer:** 31/03/2005

**PARECER**

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

Belém, 08 de junho de 2005.

**Profª Mª da Conceição Nascimento Pinheiro**  
Coordenadora do CEP-NMT/UFPA.