



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

**ANÁLISE E SUGESTÕES PARA A LEITURA DO EXAME DA GOTA
ESPESSA NO DIAGNÓSTICO POR MICROSCOPIA DA MALÁRIA
CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX***

JAMILE CASSEB RODRIGUES

Belém - Pará

2020

JAMILE CASSEB RODRIGUES

**ANÁLISE E SUGESTÕES PARA A LEITURA DO EXAME DA GOTA
ESPessa NO DIAGNÓSTICO POR MICROSCOPIA DA MALÁRIA
CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.
Orientadora: Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha

Belém – Pará
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696a Rodrigues, Jamile Casseb.

ANÁLISE E SUGESTÕES PARA A LEITURA DO EXAME DA GOTA ESPESSA NO DIAGNÓSTICO POR MICROSCOPIA DA MALÁRIA CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX* / Jamile Casseb Rodrigues. — 2020.

41 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^ª. Dra. Maristela Gomes da Cunha
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,

Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Belém, 2020.

1. Malária. 2. *Plasmodium vivax* . 3. Diagnóstico .

4. Gota espessa . I. Título.

CDD 616.96

JAMILE CASSEB RODRIGUES

**ANÁLISE E SUGESTÕES PARA A LEITURA DO EXAME DA GOTA
ESPESSA NO DIAGNÓSTICO POR MICROSCOPIA DA MALÁRIA
CAUSADA POR *PLASMODIUM VIVAX***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Análises Clínicas Profissional, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Banca Examinadora: Dra. Marinete Marins Póvoa
Instituto Evandro Chagas

Profa. Dra. Andréa Luciana da Silva
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Profa. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA

Prof. Dr. Francisco Acácio Alves
Instituto de Ciências Biológicas/UFPA (Suplente)

Belém, Pará

2020

Dedico a minha Dissertação de Mestrado para meus pais, Adma Rodrigues e Gerson Rodrigues, e o meu irmão caçula, Antônio Rodrigues, se não fosse por vocês, eu não iria conseguir chegar aqui. Esse título é graça a vocês. Amo vocês. Obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo o apoio incondicional, por acreditarem em mim e me incentivarem constantemente a sempre melhorar, vocês são o meu melhor exemplo de vida e de profissionais, se eu conseguir ser a metade do que vocês são, sei que irei longe. Não consigo mensurar em palavras o quanto eu sou grata por todas as oportunidades. Amo vocês. Ao meu irmão, que apesar da distância sempre se faz presente todos os dias da minha vida, você é meu maior incentivo e meu maior apoiador, tudo que eu faço hoje é pra ser um bom exemplo pra ti, te amo incondicionalmente.

À minha namorada Carla Farias, por estar sempre comigo independentemente da situação, obrigada por todo o apoio, sem você eu não conseguiria chegar aqui, seu incentivo, força e sinceridade são essenciais na minha vida, obrigada por querer dividir mais essa conquista (e outras que ainda estão por vir). Amo você.

À minha vó Iolanda Rodrigues e a minha vó Nina Casseb, que apesar de não fazerem mais parte desse plano, vocês sempre vão estar presentes na minha vida, obrigada as duas, impossível não desejar vocês aqui. Vocês nunca serão esquecidas pois foram essenciais na minha vida.

Ao meu tio Ruinaldo Nascimento que foi um segundo pai para mim, um homem que foi um exemplo de vida e de profissional, que marcou a minha vida e de muitas pessoas na qual ele ajudou. Seus feitos serão lembrados eternamente. Obrigada por tudo. Eu amo você.

À toda a minha família, que se fez presente na decorrência desses anos me ajudando e sempre me incentivando a melhorar e a crescer profissionalmente.

À minha orientadora Dra. Maristela Gomes da Cunha, por todo o apoio e incentivo que foram essenciais para chegar até aqui, por acreditar em mim e nesse trabalho, seus ensinamentos nunca serão esquecidos, irei usar não só na minha vida profissional como pessoal. Serei eternamente grata.

Aos meus amigos que apesar da distância sempre me mandaram energia positiva e nunca me deixaram na mão quando eu precisei, obrigada pelo apoio.

A todos os professores que tivemos a oportunidade de conviver e de nos terem deixado compartilhar um pouco do seu conhecimento.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC), principalmente à seção de Parasitologia por disponibilizar grandes profissionais, que me auxiliaram e me ensinaram nessa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas por todo o apoio e por ter esse corpo docente e discente que está sempre disposto a repassar seus ensinamentos e permitir que profissionais tenham acesso a conteúdo de qualidade.

A Universidade Federal do Pará por permitir o acesso ao ensino de qualidade e democrático para todos.

MUITO OBRIGADA A TODOS.

“Vamos pegar nossos livros e canetas. Eles são nossas armas mais poderosas. Uma criança, um professor, uma caneta e um livro podem mudar o mundo. A educação é a única solução.”

(Malala Yousafzai)

RESUMO

Em humanos, a malária é causada por cinco espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Entre essas cinco espécies que infectam o homem, o *P. vivax* é a mais prevalentes no Brasil. Nas últimas duas décadas, houve expressivo avanço no controle da malária, mas ainda há necessidade de realizar estudos que visem contribuir com a principal estratégia aplicada para o controle da malária, o diagnóstico dos indivíduos infectados. Neste estudo, comparamos os resultados dos exames realizados por microscopia, utilizando a técnica da gota espessa (GE), conforme as instruções técnicas apresentadas, na forma de texto e tabelas, no manual de diagnóstico laboratorial da malária, publicado pelo Ministério da Saúde, em 2009. Esse manual apresenta uma tabela de conversão, para quantificar a densidade parasitária a partir da leitura semi-quantitativa da GE. No caso de infecções por *P. vivax*, realizamos leituras de 20 GE pelos métodos semi-quantitativo (cruzes) e quantitativo (parasitos/mm³). Também analisamos os resultados com a quantificação a partir da leitura em cruzes, utilizando a tabela de conversão de leitura. Observamos que as faixas de valores utilizadas no manual apresentam limites muito amplos, permitindo discordância entre a leitura quantitativa, realizada diretamente na lâmina da GE e os valores obtidos com a conversão da leitura semi-quantitativa. As nossas análises, indicam a necessidade de revisão na apresentação dos resultados expressos em cruzes, bem como a elaboração de uma nova tabela de conversão, com a redistribuição das faixas densidade parasitária abaixo de 5.000 parasitos/mm³. As modificações propostas visam aumentar a acurácia do diagnóstico da malária, no âmbito da normatização apresentada no manual do Ministério da Saúde.

Palavras Chave: Malária, *Plasmodium vivax*, Diagnóstico, Gota espessa

ABSTRACT

In humans, malaria is caused by five species of protozoa of the genus *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. knowlesi*. Among these five species, *P. vivax* is the most prevalent in Brazil. In the last two decades, there has been a significant progress in malaria control, but there is still a need to carry out studies that aim to contribute with the main strategy for malaria control, which includes the diagnosis of infected individuals. In this study, we compared the results of examinations performed by microscopy, using the thick blood smear (TBS), according to the technical instructions presented in the form of text and tables, in manual of malaria laboratory diagnosis, published by the Ministry of Health, in 2009. This manual presents a table for conversion of results that is applied to quantify the density of parasites using data collected by method semi-quantitative. In case of *P. vivax* infections, we analysed 20 TBS using semi-quantitative estimation (crosses) and quantitative (parasites/mm³) methods. We also analysed the results in crosses, which was changed using the conversion table. We observed that the ranges of values used in manual shows very wide limits, allowing disagreement between the quantitative data direct observation of the slide in comparison with values obtained by conversion of the semi-quantitative results. Our analyses indicate the need for revision in the presentation of the results expressed in crosses, as well as the elaboration of a new conversion table with redistribution of the density of parasites lower than 5,000 parasites/mm³. We are proposing some changes with objective to increase the accuracy in the malaria diagnosis, as well as improve of the standardization used in manual of the Ministry of Health.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, Diagnostic, Thick blood smear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.2 CICLO DE VIDA DO <i>PLASMODIUM</i>	13
1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS FORMAS DO CICLO DE VIDA DO AGENTE ETIOLÓGICO DA MALÁRIA	16
1.4 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	19
1.5 TRANSMISSÃO E CONTROLE DA MALÁRIA NO ESTADO DO PARÁ	22
1.6 APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ÓPTICA NA ESTRATÉGIA DE CONTROLE DA MALÁRIA	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 DIAGNÓSTICO PARASITOSCÓPICO POR GOTA ESPESSA	27
3.2 ANÁLISE DOS DADOS DA LEITURA DO EXAME DA GOTA ESPESSA.....	28
3.3 ASPECTOS ÉTICOS.....	28
4. RESULTADOS.....	29
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
8. ANEXO.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é causada por um protozoário pertencente ao gênero *Plasmodium*, que é transmitido ao hospedeiro vertebrado pelo mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, quando esse inocula a forma infectante, os esporozítos. Em humanos, a malária é causada por cinco espécies de protozoários do Filo Apicomplexa, gênero *Plasmodium*: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Entre essas cinco espécies que infectam o homem, o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies mais prevalentes no mundo (GREENWOOD *et al.*, 2008).

O ciclo de vida do parasito é complexo, com crescimento assexuado intracelular dentro dos hepatócitos do hospedeiro vertebrado (estágio pré-eritrocítico) e dos eritrócitos (estágio eritrocítico). A diferenciação sexual inicia-se no hospedeiro vertebrado, enquanto a fusão dos gametas ocorre no mosquito vetor (GREENWOOD *et al.*, 2008, HAFALLA *et al.*, 2011).

A malária é uma doença com altas taxas de morbidade e mortalidade, afetando populações pobres com difícil acesso ao diagnóstico e tratamento. Todos os grupos etários estão sob risco de adquirir a doença, que se apresenta com manifestações episódicas de caráter febril agudo (GREENWOOD *et al.*, 2008). Apesar dos avanços no conhecimento sobre a doença ainda há necessidade de desenvolver novas ferramentas que contribuam para o controle da transmissão da malária (GUERIN *et al.*, 2002).

A principal estratégia aplicada para o controle da malária é o tratamento das pessoas infectadas, eliminando, assim, a fonte de infecção para o mosquito vetor. Para essa estratégia ser efetiva é necessário o diagnóstico rápido e seguro, sendo essa a primeira etapa das medidas propostas nos programas de controle da malária (WHO, 1992, 2019; BRASIL, 2013).

Com base nas características morfológicas das diferentes formas do ciclo de vida do parasito é possível identificar a espécie, utilizando técnicas de microscopia. A proposta deste estudo é contribuir com a melhoria na aplicação do diagnóstico microscópico na malária humana, incluindo uma análise acerca da leitura do exame da gota espessa pelos métodos, semi-quantitativo e quantitativo, que são utilizados para determinar os níveis das densidades parasitárias no diagnóstico da malária causada por *P. vivax*.

1.2 CICLO DE VIDA DO *PLASMODIUM*

Os *Plasmodium spp* possuem formas extracelulares móveis, que podem invadir ativamente as células hospedeiras onde elas se multiplicam. Esses parasitos codificam pelo menos 5.600 genes e possuem ciclos de vida complexos que incluem crescimento intracelular obrigatório, que ocorre dentro dos hepatócitos (ciclo pré-eritrocítico) e dos eritrócitos (ciclo eritrocítico). O *Plasmodium* em hospedeiros mamíferos é transmitido pela fêmea do mosquito vetor (Figura1).

As espécies de parasitos que causam malária humana apresentam no seu ciclo uma fase assexual (denominada esquizogônica) que ocorre no hospedeiro vertebrado e uma fase sexual (denominada esporogônica), que ocorre em mosquitos do gênero *Anopheles* (COWMAN; CRABB, 2006; GREENWOOD *et al.*, 2008; ANTINORI *et al.*, 2012). No Brasil, a espécie mais importante é o *Anopheles darlingi*, cujos criadouros preferenciais são coleções de água limpa, quente, sombreada e de baixo fluxo. Tal condição é muito frequente na Amazônia brasileira.

No estágio hepático, cada esporozoíto invasor diferencia-se e divide-se por mitose em milhares de merozoítos, que ao serem liberados invadem e desenvolvem-se dentro dos eritrócitos, iniciando assim o estágio sanguíneo.

As formas esporozoítos que ficam nas glândulas salivares dos insetos são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Esses esporozoítos são formas móveis do parasito, as quais podem ser geneticamente distintas (ANTINORI *et al.*, 2012). Estima-se que cerca de 10 a 100 esporozoítos são transmitidos a cada picada de mosquito infectado. O período de incubação geralmente é de 12 a 14 dias a partir da infecção.

Na infecção por *P. vivax* ou *P. ovale*, uma parte das formas intra-hepáticas não se divide imediatamente, permanecendo inerte por um período que varia de três semanas a mais de um ano. Essas formas latentes são conhecidas como hipnozoítos, que ficam em estado de latência no hepatócito e são responsáveis pelas recaídas tardias da doença (WHITE, 2011).

Os esporozoítos são expostos aos anticorpos do hospedeiro por um tempo que pode variar de minutos a algumas horas, enquanto que os estágios sanguíneos permanecem na circulação por um tempo mais curto, alguns minutos. Nesta fase do

ciclo, onde predomina a forma de esporozoítos, a infecção é assintomática (HAFALLA *et al.*, 2011; SINNIS; ZAVALA, 2012; DRAPER *et al.*, 2018).

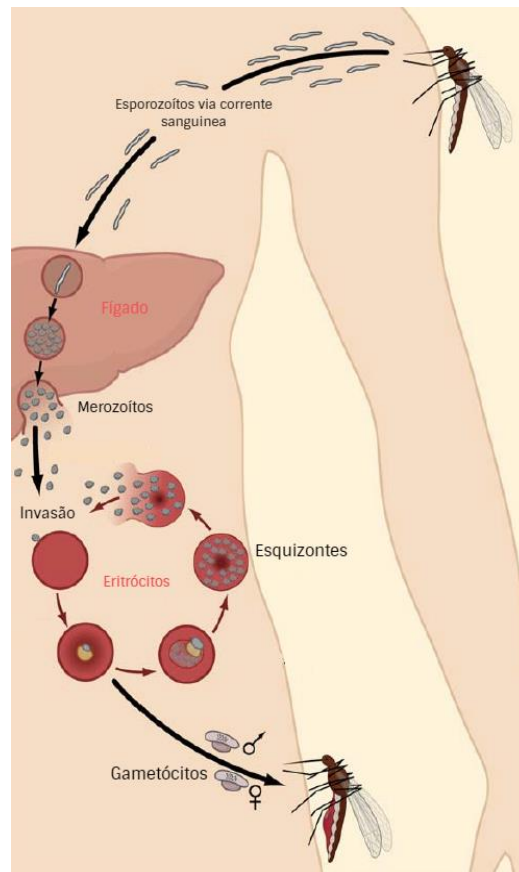


Figura 1: Ciclo de vida do *Plasmodium ssp.*

Fonte: Cowman; Crabb, 2006 (Modificada).

Durante o repasto sanguíneo, os esporozoítos se movem dentro da pele, e migram rapidamente para o fígado pela corrente sanguínea, passando por diversas células do hospedeiro, incluindo as células de Kupffer, antes de invadir, ativamente, os hepatócitos. No fígado, eles se multiplicam em milhares de merozoítos que são liberados na corrente sanguínea para invadir os eritrócitos e iniciar o estágio sanguíneo da infecção (COWMAN; CRABB, 2006; HOPP; SINNIS, 2014; DUNDAS *et al.*, 2018).

A invasão no eritrócito pelos merozoítos extracelulares é uma etapa que favorece a entrada rápida e eficiente na célula hospedeira. Esse mecanismo tem sido

importante no sucesso evolutivo desses patógenos (AMINO *et al.*, 2006; COWMAN; CRABB, 2006; GREENWOOD *et al.*, 2008; BRASIL, 2010). Os parasitos se ligam e entram nos eritrócitos através de receptores específicos da superfície eritrocitária. No caso da infecção por *P. vivax*, o receptor predominante pertence ao grupo sanguíneo Duffy (WHITE, 2014).

Decorridos 6 a 8 dias da liberação dos merozoítos hepáticos, se as densidades parasitárias atingirem aproximadamente 50 parasitos/ μ L de sangue, estima-se que a parasitemia na circulação sanguínea de um indivíduo adulto será da ordem de 100 milhões de parasitos no sangue, sendo possível a detecção dessas formas por microscopia e/ou por testes rápidos (WHITE, 2014; TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Na fase inicial do desenvolvimento intraeritrocítico, as formas em anel, os trofozoítas das diferentes espécies são semelhantes, quando observadas na microscopia óptica. Nesta fase, também há grande quantidade de trofozoítos maduro, com características particulares de cada espécie, as quais se tornam evidentes, possibilitando visualizar o pigmento e a forma do parasito (WHITE; BREMAN, 2016).

Os merozoítos são as formas do estágio sanguíneo responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. O período entre a picada do mosquito e a invasão dos eritrócitos pelos merozoítos é chamado de período pré-patente. Esse período pode variar, dependendo da espécie do parasito. Dentro de cada eritrócito, os trofozoítos amadurecem entre 48-72 horas, dependendo também da espécie, com as sucessivas divisões assexuadas (GREENWOOD *et al.*, 2008). Um ciclo assexual no sangue tem duração de aproximadamente 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 72 horas para o *P. malariae* e 24 horas apenas para o *P. knowlesi* (WHITE *et al.*, 2014).

Os estágios sanguíneos da infecção incluem formas assexuadas, que se multiplicam por repetição dos ciclos, e as formas sexuais os gametócitos, masculino e feminino, que serão ingeridos pelos mosquitos. No estágio assexuado serão produzidos entre 8-20 merozoítos a cada ciclo no eritrócito, assim, o número de parasitos alcança níveis muito elevados.

A diferenciação sexual é iniciada no hospedeiro invertebrado quando ocorre a fusão dos gametócitos e seguido da propagação do parasito via esporogonia que acontece no intestino do vetor. Quando os gametócitos são ingeridos pelo mosquito

vetor, podem se recombinar e gerar esporozoítos geneticamente distintos (GREENWOOD *et al.*, 2008).

Na biologia do *P. vivax*, devido a sua capacidade de recaídas a partir de uma única inoculação, observa-se uma alta taxa de sobrevivência desse parasito nos hospedeiros. O aparecimento de formas assexuadas de *P. vivax* no sangue pode derivar de recaída a partir de formas hepáticas ou por reinfeção após nova inoculação de esporozoítos por mosquitos (BAIRD, 2004, HOWES *et al.*, 2016).

A parasitemia na infecção por *P. vivax* tende a ser muito menor, devido a capacidade do parasito em invadir apenas células sanguíneas jovens (reticulócitos). Em áreas endêmicas, essas infecções podem passar como assintomáticas, devido as baixas densidades parasitárias. Nessa situação, os diagnósticos por microscopia ou testes de diagnósticos rápidos (TDRs) podem apresentar resultados falso-negativo (BAIRD, 2013; HOWES *et al.*, 2016).

1.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS FORMAS DO CICLO DE VIDA DO AGENTE ETIOLÓGICO DA MALÁRIA

Na fase pré-eritrocítica do ciclo do parasito, a forma esporozoíto é alongada e mede cerca de 10 a 12 µm por 1 a 2 µm. Essas formas se desenvolvem nos oocistos, na parede do intestino médio do mosquito fêmea e são distribuídas por todo o sistema circulatório do mosquito, aproximadamente ~20% alcançam as glândulas salivares, onde o oocisto e os esporozoítos se diferenciam. Mas somente a forma em esporozoíto infecta os hospedeiros mamíferos, pois apresentam alterações no citoesqueleto que favorecem a motilidade. Além disso, expressa proteínas na superfície que atuam na adesão entre o esporozoíto e os hepatócitos (DUNDAS *et al.*, 2018).

A superfície do esporozoíto é densamente coberta pela proteína circum-esporozoíto (CSP), que é essencial para a invasão. Essa proteína está associada à membrana plasmática por meio de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Outro ligante é proteína relacionada à trombospondina (TRAP), um componente microssomal secretado na superfície do esporozoíto, que também desempenha um papel importante na sua motilidade (DUNDAS *et al.*, 2018).

A análise proteômica dos componentes da superfície de esporozoítos maduros identificou além da CSP e TRAP outras proteínas de superfície, tais como a CeTOS,

P36 e P52, que também podem interagir com fatores do hospedeiro (DUNDAS *et al.*, 2018).

Os trofozoítos são formas de anéis pequenos, às vezes abertos, mostrando apenas uma massa de cromatina (raramente duas), quando jovens podem ser semelhantes nas espécies *P. vivax* e *P. falciparum*. Observa-se a ausência de pigmento malárico quando ainda são formas jovens, porém à medida que amadurecem, os anéis podem ser maiores e, neste caso, apresentam vacúolo claramente definido. No *P. vivax*, formam-se as granulações de Schüffner. O trofozoíto maduro é maior, amebóide e com vacúolo presente. Essas formas podem apresentar grânulos finos de pigmento malárico escuro no citoplasma, geralmente são identificados como formas irregulares (BRASIL, 2009).

A natureza das granulações de Schüffner ainda não está totalmente conhecida, mas são da cor rósea e aparecem nas hemácias parasitadas pelo *P. vivax* e pelo *P. ovale*, quando as preparações da gota espessas são coradas pelo método Walker/Giemsa. Essas granulações são parecidas com as dos neutrófilos. A sua visualização, distribuição, quantidade, tamanho e forma variam de acordo com a qualidade do material analisado, o estágio em que se o parasito, as condições dos reagentes utilizados para a coloração, como o pH do diluente (pH alcalino 7,2) e a qualidade dos corantes (BRASIL, 2009).

Os merozoítos são menores que os esporozoítos, apresentam-se como formas arredondas com 1 a 5 μm de comprimento por 2 μm de largura. Essas células são capazes de invadir somente os eritrócitos. Estruturalmente são semelhantes aos esporozoítos, por apresentarem características comuns que incluem uma morfologia polarizada e as organelas apicais que secretam conteúdo durante a invasão de células hospedeiras (Figura 2).

A invasão no eritrócito pelo merozoítos extracelulares é uma etapa essencial para o estabelecimento do ciclo sanguíneo. A entrada rápida e eficiente na célula hospedeira pode impedir a ação dos mecanismos efetores da resposta imune. Após a invasão ocorre a reprodução assexuada, com a diferenciação dos trofozoítos jovens até a formação dos esquizontes (Figura 3a, b e c). Nesta etapa, ocorre o rompimento do vacúolo parasitóforo e da membrana da célula hospedeira, com alterações bioquímicas que desestabilizam o citoesqueleto celular, promovendo o evento que, efetivamente, dispersa os merozoítos, os quais são liberados no meio extracelular (COWMAN; CRABB, 2006).

Os esquizontes são formas grandes, redondas e com menos de 12 núcleos (cromatinas), quando são jovens. Apresentam grânulos de pigmento fino, escuro e difuso pelo citoplasma. As formas maduras, apresentam 12 a 24 merozoítos (cromatinas maiores), irregularmente arranjados. Os grânulos de pigmento podem ser visualizados como pequena massa escura no citoplasma (Figura 3c).

Os gametócitos são formas redondas ou ovais, com cromatina triangular ou redonda e de tamanho variável. O pigmento malárico é fino, difuso e escuro sobre o citoplasma (Figura 3d). Existem diferenças morfológicas que caracterizam o gametócito masculino e o feminino.

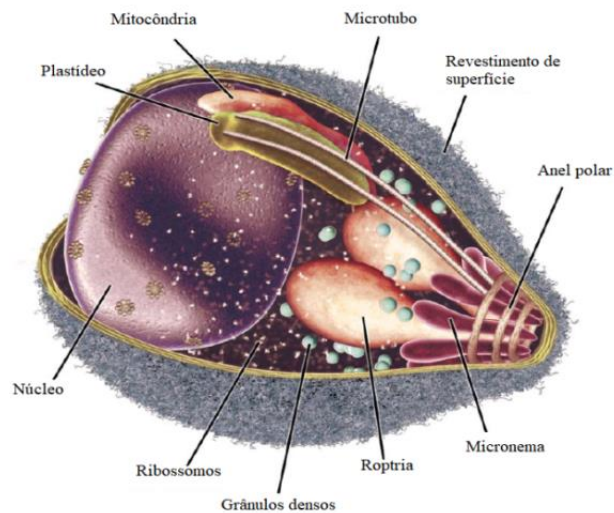


Figura 2: Ilustração do merozoíto, destacando as principais organelas e estruturas.

Fonte: Cowman; Crabb, 2006 (Modificado).

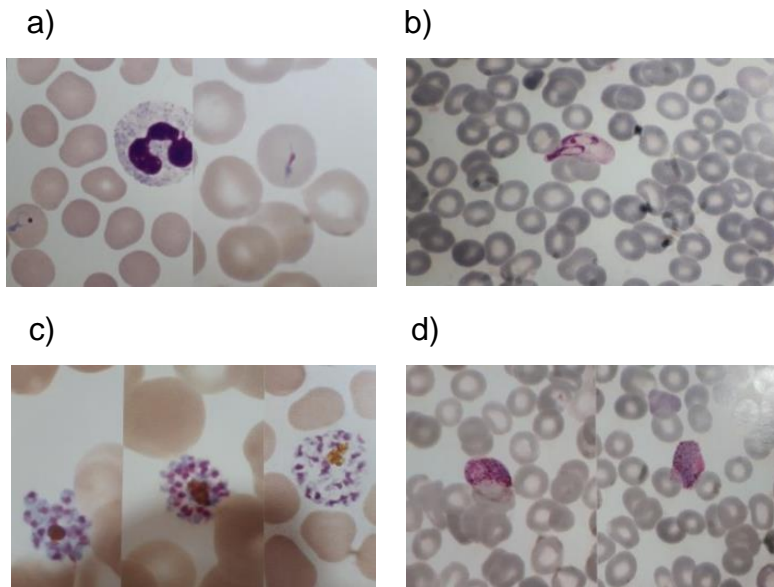


Figura 3. Formas do ciclo do *P. vivax*: trofozoíto jovem (a), trofozoíto maduro, eritrócito infectado por dois trofozoítos (b), esquizonte (c), e gametócitos (d).

Fonte: Swierczynski; Gobbo, 2007.

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

A malária ainda representa um grave problema de saúde pública mundial apesar dos avanços na prevenção e no controle. Com base nos dados da Organização Mundial de Saúde/OMS, estima-se que no ano de 2016 foram registrados 216 milhões de casos de malária. Nesse ano, houve aumento no número de casos notificados em comparação com 2015, quando foram registrados 211 milhões de casos da doença. No ano de 2017, em todo o mundo, foram registrados cerca de 219 milhões de casos de malária (WHO, 2016, 2017, 2018).

No Brasil, desde os anos 2000, diante da grave situação epidemiológica da malária com o aumento expressivo na transmissão, quando alcançou cerca de 600 mil casos da doença, o Ministério da Saúde implementou planos de ações integradas. A primeira estratégia foi denominada de Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM). A meta estabelecida foi a redução em 50% da mortalidade por malária até o final do ano de 2001. Além de evitar o surgimento de epidemias localizadas e reduzir a sua gravidade, esses planos,

consequentemente, tinham como objetivo reduzir o número de internações e óbitos (LOIOLA *et al.*, 2002; BRASIL, 2004; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Posteriormente, o governo brasileiro criou, em 2003, o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM), com o objetivo de fornecer diretrizes aos governos federal, estadual e municipal para as atividades de controle da doença. A malária provoca consequências à saúde humana e impactos econômicos de curto e longo prazo nos serviços de saúde, incluindo os custos associados ao diagnóstico e tratamento, como a aquisição de material de laboratório e da medicação específica para malária (BRASIL, 2004).

A efetividade das ações contribuiu para o controle, e como resultado registrou-se uma redução das formas graves de malária causadas por *P. falciparum*, levando ao declínio da mortalidade e estabilizando o número de casos de malária em menos de 325 mil casos, após uma década de ações contínuas para o controle da transmissão da malária (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; TAUIL, 2011; WHO, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Durante esse período, com base nas recomendações da OMS, foram intensificadas as ações para alcançar os objetivos propostos para o controle da doença, como o diagnóstico rápido dos casos de malária e tratamento com medicamentos eficazes. Após esse período também foram implementadas outras ações, tais como a distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticida de longa duração para atingir cobertura total sobre toda a população em risco e a borrifação residual intradomiciliar com inseticidas para reduzir ou eliminar a transmissão de malária. Com base no que ocorreu no período de 2000 a 2010 e nas recomendações da OMS, tais medidas foram efetivas e, nas décadas seguintes, houve uma acentuada diminuição da transmissão da malária no Brasil (SIQUEIRA *et al.*, 2016; BRASIL, 2017; WHO, 2019,).

Após essas medidas houve variação na intensidade da transmissão, mas observou-se uma redução estimada em cerca de 45% no número de casos. Essa diminuição foi mantida até o ano de 2016. Portanto, tais medidas foram efetivas no controle da endemia. No entanto, observa-se que essa situação representa um esforço concentrado, e que para ser mantida depende de uma permanente vigilância, com a finalidade de prevenir a instalação de focos de transmissão da doença (BRASIL, 2016; BRASIL 2017).

O Brasil registrou uma redução de 76,8% na incidência de malária entre 2000 e 2014. Mas o país ainda contribui com 42% de todos os casos de malária registrados nas Américas. A transmissão continua entre as fronteiras da Bacia Amazônica, onde ocorrem mais de 90% dos casos de malária. Nesta região, as condições ambientais e climáticas são propícias para o desenvolvimento do vetor e as condições socioeconômicas favorecem a transmissão da doença (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2016).

Além desses fatores, também devem ser consideradas as condições dos serviços de saúde, incluindo a necessidade de manter o treinamento de técnicos para realizar o diagnóstico por microscopia e o tratamento imediato, fortalecendo, assim, o serviço de vigilância epidemiológica. Pois a presença de indivíduos infectados pode manter a cadeia de transmissão (LOIOLA *et al.*, 2002; BRASIL, 2017).

A transmissão da malária está quase que totalmente restrita a Região Amazônica, nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Nessa área são registrados 99,9% dos casos de malária, sendo que 80% desses casos são causados por *P. vivax* (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2016; BRASIL, 2018; CARLOS *et al.*, 2019).

No ano de 2016, no Brasil, foram registrados 129.195 casos de malária, sendo que 14.495 ocorreram no estado do Pará. Em 2017 ainda ocorreram aproximadamente 200 mil casos na Amazônia brasileira (CARLOS *et al.*, 2019). Mas, neste ano, o estado do Pará apresentou a maior taxa de redução entre os demais estados da Amazônia (BRASIL, 2018).

Com base nos dados do Ministério da Saúde, a malária está classificada de acordo com a ocorrência geográfica em malária amazônica e malária extra-amazônica. A maioria dos casos ocorre em áreas rurais (85%) (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; BRASIL, 2017).

As áreas de risco para adquirir malária são classificadas com base no Índice Parasitário Anual (IPA), que corresponde ao número de testes positivos por mil habitantes, em determinado espaço geográfico, em geral, utiliza-se a área do município. Assim, as áreas podem ser classificadas da seguinte forma: alto risco, quando o IPA apresenta-se maior ou igual a 50 casos de malária a cada mil habitantes; médio risco, o IPA está entre 10 e 49,9 e, baixo risco, quando o IPA está abaixo de 9,9 casos de malária para cada mil habitantes (Figura 4). Em 2017, na distribuição por

municípios da região Amazônica, 18 foram classificados como de alto risco, 48 de médio risco e 280 de baixo risco para a malária (BRASIL, 2017).

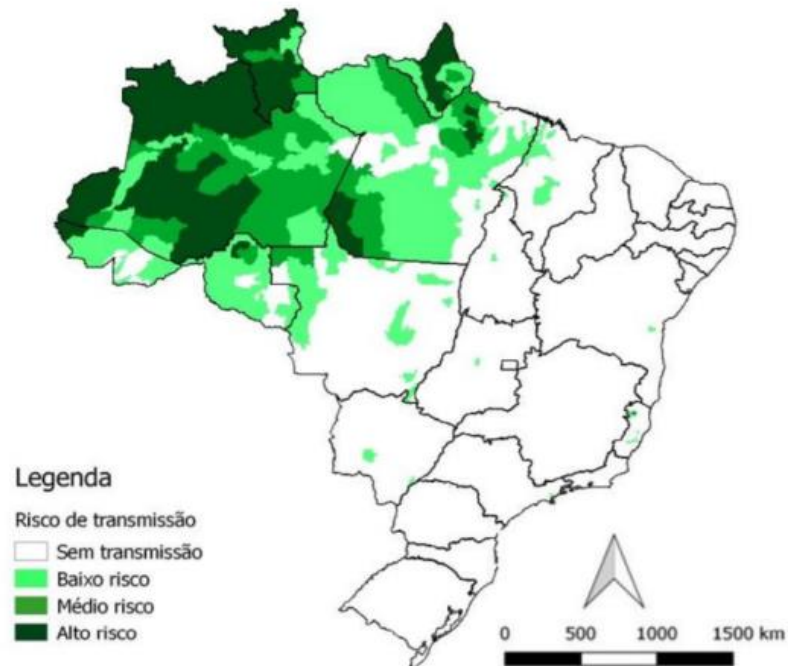


Figura 4: Áreas de transmissão de malária no Brasil, 2018.

Fonte: Brasil, Ministério da Sivep-malária, 2018.

1.5 TRANSMISSÃO E CONTROLE DA MALÁRIA NO ESTADO DO PARÁ

A malária ainda é um problema de saúde pública no estado do Pará, onde fatores biológicos, ecológicos e econômicos favorecem a transmissão. Em 2018, o estado do Pará ocupava o segundo lugar no número de registros de novos casos, quando foram 46.371 casos de malária. Desse total, 43.685 casos de malária foram causados por *P. vivax*, representando 25% de todos os casos na região Amazônica. (SIVEP/Malária, 2020). Esses dados foram coletados e analisados para este estudo.

Neste mesmo ano, 6 municípios do estado do Pará apresentaram o índice parasitário anual (IPA) classificado como alto risco (IPA ≥ 50); Oeiras do Pará, Bagre, Anajás, Jacareacanga, Cametá e Curralinho. Em 4 desses municípios, o IPA foi acima

de 100. Os valores do IPA em Oeiras do Pará, Bagre, Anajás, e Jacareacanga foram 347,2, 192,2, 167,4 e 101,8, respectivamente (SIVEP, 2020).

Com base no IPA, outros 10 municípios do estado foram classificados como de médio risco, para a transmissão de malária. Nesse caso, o IPA variou de 10 a 49,9, nos municípios de Afuá, Almeirim, Breves, Chaves, Itaituba, Limoeiro do Ajuru, Mocajuba, Novo Progresso, Portel e São Sebastião da Boa Vista (SIVEP, 2020).

Recentemente, descrevemos a situação da malária, no período de 2015 a 2018, em 12 regiões de integração, definidas por aspectos geográficos e econômicos do Pará. Para tanto foram coletados os dados registrados no período de 4 anos, nos 143 municípios do estado, e foram distribuídos nas 12 regiões de integração, propostas pela Secretaria Estadual de Administração. Essa divisão se baseia na concentração populacional, acessibilidade, complementariedade e interdependência econômica, para regionalizar a grande área geográfica do estado (dados coletados e analisados por Jamile C. Rodrigues, em 2020)

Os dados sobre a ocorrência de malária; número de casos e a distribuição por agente etiológico, *Plasmodium vivax* (Pv) ou *P. falciparum* (Pf) foram coletados na base de dados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (Sivep/Malária/MS).

No total foram registrados 102.680 casos de malária, ocorridos no período de 2015 a 2018. Desses 97.482 (95%) foram causados por *P. vivax* e 5.198 (5%) por *P. Falciparum*, não foram registrados casos de infecções mistas. Observou-se que há grande variação quanto à distribuição dos registros de casos de malária, sendo que a maioria ocorreu em três áreas do estado, a região do Marajó (16 municípios), Tocantins (11 municípios) e Tapajós (6 municípios), que registraram 52.075 (50,7% dos registros do estado), 27.166 (26,4%) e 12.719 (12,4%), respectivamente, totalizando 91.960 casos, que correspondem a 89,5% dos casos de malária ocorridos em 33 municípios do estado do Pará.

Nas demais regiões, foram registradas ocorrências de surtos e transmissão instável, que foi controlada no período de 4 anos, como o surto de malária ocorrido na região do Araguaia, quando o total de casos foi 2.557, a maioria ocorreu nos municípios de Ourilândia do Norte (1.447 casos), São Félix do Xingu (457) e Tucumã (470). Nas demais regiões, o número de casos variou de 81 (Região Guajará, que inclui Belém) a 2.890 (Baixo Amazonas), o que indica a necessidade de manter as

medidas de vigilância epidemiológica em todo o estado do Pará (RODRIGUES *et al*, resumo submetido para apresentação no congresso de Medicina Tropical, 2021).

Com base nesta análise, observa-se que houve um grande esforço para diminuir a transmissão da malária no estado do Pará, mas em determinadas áreas do estado há uma tendência de aumento no número de casos. Em parte, essa situação é influenciada pela dinâmica populacional nessas regiões e por fatores ambientais que proporcionam a proliferação do mosquito vetor, contribuindo para a manutenção da cadeia de transmissão.

Também as atividades de trabalho favorecem a exposição à malária, uma vez que entre as principais atividades econômicas no estado, podemos destacar a agropecuária, a extração de madeira, os assentamentos da reforma agrária e extração mineral em garimpos (LAPOUBLE, *et al.*, 2015).

Considerando a importância do diagnóstico para o controle da malária, devemos ressaltar que, no Brasil, dois laboratórios de referências para o diagnóstico da malária encontram-se certificados pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), um no Instituto Evandro Chagas (IEC), em Belém, e outro na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro. Portanto, um localiza-se na área endêmica (Amazônia) e o outro na Extra-Amazônia. Assim, observa-se que a vigilância epidemiológica da malária atua de forma efetiva em todo o território brasileiro, incluindo o estado do Pará.

1.6 APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ÓPTICA NA ESTRATÉGIA DE CONTROLE DA MALÁRIA

O controle da malária é realizado por meio da detecção e tratamento dos indivíduos infectados e do controle vetorial. Atualmente, tais estratégias foram intensificadas, principalmente, devido ao aparecimento de novos métodos diagnósticos, incluindo os métodos rápidos com maior disponibilidade de acesso. Na maioria das áreas de transmissão, o controle foi alcançado e deve ser mantido de forma intensiva. Assim, para impedir uma re-expansão, bem como eliminar a transmissão em algumas áreas ainda é necessário mais esforço para dar sustentabilidade às ações de controle definidas pela OMS, bem como a associação de estratégias complementares ou alternativas.

A principal estratégia aplicada para o controle da malária visa o tratamento. Para tanto, o diagnóstico rápido e seguro é base para o sucesso dessa estratégia (Brasil, 2013). A demora na confirmação do diagnóstico e, conseqüentemente, no início do tratamento são as principais causas de mortes (TANGPUKDEE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; SILVA-NUNES *et al.*, 2012). Deve ser ressaltada a importância dessas estratégias para monitorar riscos em áreas com potencial para instalar e/ou aumentar a intensidade da transmissão.

O método parasitológico para a pesquisa de *Plasmodium sp*, realizado pela técnica da gota espessa é o padrão ouro, definido pela OMS (BRASIL, 2009, SVS/MS/Manual de diagnóstico laboratorial da malária). A vantagem desse exame é a sua especificidade, na identificação das espécies que causam a malária humana. Este método requer experiência dos profissionais, pois quando a parasitemia é muito baixa, o resultado pode ser falso negativo. Também deve ser considerada a dificuldade para diagnosticar casos de infecções mistas (TANGPUKDEE *et al.*, 2009).

Considerando a importância do diagnóstico parasitológico para a melhoria da saúde da população que reside na Amazônia, vivendo sob risco de infecção por *Plasmodium spp*, foi proposto neste estudo realizar uma avaliação das condições apresentadas no manual de diagnóstico laboratorial da malária relacionadas com a leitura dos resultados da técnica da gota espessa para a pesquisa de *P. vivax*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as formas de leitura do exame da gota espessa e a sua aplicação no diagnóstico microscópico para a pesquisa de *Plasmodium vivax*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os dados obtidos no exame por microscopia óptica para pesquisa de *P. vivax*, realizados por meio da técnica da gota espessa com base nas normativas do manual laboratorial de diagnóstico da malária, publicado em 2009, pelo Ministério da Saúde.
- Comparar as leituras da gota espessa nos métodos semi-quantitativo (cruzes) e quantitativo (parasitos/milímetro cúbico de sangue).
- Avaliar a aplicação da tabela de conversão de leitura, do manual do Ministério da saúde, utilizada para estimar a densidade parasitária a partir do método semi-quantitativo.
- Elaborar como produto uma nota na forma de comunicação como proposta para melhorar o exame da gota, tais sugestões serão apresentadas para os gestores do laboratório de referência no diagnóstico da malária, localizado na área endêmica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DIAGNÓSTICO PARASITOSCÓPICO POR GOTA ESPESSA

O exame parasitológico, utilizando a técnica da gota espessa para a pesquisa de *Plasmodium ssp* foi realizada por técnicos especializados. Para tanto, coletou-se uma amostra de sangue, obtida diretamente pela punção da polpa digital, após assepsia, utilizando lanceta estéril. A primeira gota de sangue foi removida com algodão seco. Comprimindo o dedo suavemente foi obtida outra gota de sangue, a qual se depositou em uma área restrita e com aspecto esférico sobre a pele seca. A face limpa da lâmina foi colocada, então, em contato com a gota, mas sem tocar a pele do paciente. Com o auxílio de outra lâmina, o sangue foi espalhado, formando um retângulo.

A preparação da gota espessa foi corada pelo Método de Walker, utilizando-se o corante Giemsa. Tanto a preparação quanto a leitura foram realizadas como descrito nas instruções do manual laboratorial do diagnóstico da malária, publicado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2009).

A leitura da lâmina foi realizada em microscópio óptico, examinando a preparação sob óleo de imersão com aumento de 1000X, utilizando o método de avaliação semi-quantitativa ou quantitativa pela contagem de 100 campos microscópicos.

Foram examinadas 20 lâminas, sendo realizadas duas leituras de cada lâmina. Entre essas duas leituras, o intervalo máximo de tempo foi de uma semana. A primeira leitura foi realizada ainda no posto de saúde, por um técnico que registrava o resultado do exame em cruces (método semi-quantitativo). A segunda leitura foi realizada no laboratório do Instituto Evandro Chagas, por técnico com reconhecida experiência para quantificar a densidade parasitária (método quantitativo). Contou-se o número de parasitos por campo microscópico, registrando o resultado em número de formas sanguíneas de *P. vivax* por milímetro cúbico de sangue (parasitos/mm³). As leituras e conversões foram realizadas de acordo com a tabela do item 3, apresentada na página 60 do manual de diagnóstico (Brasil, 2009).

3.2 ANÁLISE DOS DADOS DA LEITURA DO EXAME DA GOTA ESPESSA

Os valores das densidades parasitárias, os quais foram analisados neste estudo são referentes aos resultados dos exames positivos, realizados durante as ações dos projetos de pesquisa, desenvolvidos na linha de pesquisa, Imunologia da Malária Humana, no período de 2001 a 2009, na Universidade Federal do Pará.

Nesta etapa, foram analisados apenas os resultados de 20 exames de gota espessa de paciente que foram atendidos por médicos e técnicos do laboratório de malária, no Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará. No momento do atendimento, foi preparada uma lâmina para a realização da pesquisa de *Plasmodium* spp. Nesta análise, foram incluídos apenas dados dos exames com resultado positivo para *P. vivax*.

Primeiro, realizou-se a leitura pelo método semi-quantitativo, cujo resultado é expresso em cruzes. Após um intervalo de tempo não superior a uma semana, realizou-se uma segunda leitura da mesma lâmina, utilizando o método que quantifica o número de parasitos por mm^3 de sangue. Para calcular o número de parasitos em volume correspondente a 1,0 mililitro cúbico ou microlitro, foi realizado o seguinte cálculo: o número encontrado na leitura de 100 campos foi multiplicado por 5, assim, foi calculado o valor correspondente ao número de parasitos/ mm^3 (Brasil, 2009).

Os dados foram organizados em tabelas. Para a análise descritiva, considerou-se o número de lâminas e as suas respectivas leituras. Também foi realizada a conversão das leituras, com base nas diferentes faixas da tabela de conversão apresentada no manual de diagnóstico. As análises comparativas entre os resultados das leituras da gota espessa, pelos métodos semi-quantitativo e quantitativo, incluíram o número de lâminas que apresentou leitura discordante, bem como a correspondência entre a contagem de parasitos e a estimativa com base na tabela.

A elaboração de uma nova tabela, foi proposta com base nas descrições dos dados analisados, como descrito acima.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo é parte de um projeto de pesquisa submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, Parecer 0015/2007, conforme a legislação vigente do Ministério da Saúde.

4. RESULTADOS

Os dados referentes às leituras semi-quantitativa e quantitativa dos vinte exames da GE estão apresentados na Tabela 1. Na leitura semi-quantitativa em cruces, dezoito GE foram positivas com + ou ++ cruces e duas GE foram positivas com +++ cruces. Entre as lâminas analisadas, não houve registro de resultado com +/2 (meia cruz) e nem com ++++ (quatro cruces).

Quanto à leitura quantitativa, os valores variaram entre 500 e 15.000 parasitos/mm³, sendo que em dezoito das vinte GE a densidade parasitária variou entre 500 e 10.000 parasitos/mm³. O resultado quantitativo das outras duas GE foi 12.500 e 15.000 parasitos/mm³. Entre as lâminas analisadas, não houve registro de resultado abaixo de 500 e nem acima de 15.000 parasitos/mm³.

A comparação dos valores obtidos na leitura que quantificou o número de parasitos pela contagem na GE (método quantitativo) e o número estimado com base na tabela de conversão, mostrou que houve divergência quanto a faixa de valores correspondente a estimativa a partir do número de cruces.

Nas leituras das lâminas 3,4,5,6, e 7 a faixa de conversão permitida era até 500 parasitos/mm³, porém os valores obtidos pela contagem direta das GEs foram 3.000, 7.500, 5.000, 5.000 e 1.000 parasitos/mm³, respectivamente (Tabela 1). Essa análise mostra que 25% das leituras positivas para *P. vivax* não foram incluídas nas suas devidas faixas de densidade parasitária, conforme proposto pelo uso da tabela do manual que normatiza o exame da GE.

Com base nessas análises, verificamos a necessidade de revisar as tabelas de leitura e conversão, apresentadas no capítulo 7 do manual. E, assim, atender de forma mais realista a distribuição das densidades parasitárias nas faixas entre 1.000 e 5.000 parasitos/mm³. Para ilustrar a situação atual, utilizada tanto para leitura quanto para a conversão dos resultados, foram compiladas de forma conjugada as 2 tabelas que compõem manual (Tabela 2).

Com base nos nossos resultados, estamos propondo a substituição dessas duas tabelas por uma nova tabela, elaborada a partir deste primeiro estudo comparativo. Portanto, nesta nova tabela, foram incluídas alterações na forma de expressar a leitura semi-quantitativa e nas faixas para estimar o número de parasitos/mm³ de sangue a partir da leitura em cruces (Tabela 3).

Tabela 1. Comparação das leituras semi-quantitativa (em cruces) e quantitativa (parasitos/mm³) no exame da gota espessa para determinar e aplicação da tabela de conversão para estimar a densidade parasitária a partir da leitura semi-quantitativa, utilizando os faixas do manual de diagnóstico laboratorial da malária do Ministério da Saúde, 2009.

Identificação da lâmina no exame da gota espessa	Primeira leitura com resultado apresentado em cruces	Segunda leitura com resultado do exame quantitativo (parasitos/mm³)	Faixas utilizadas pelo Ministério da Saúde para conversão do resultado em cruces para parasitos /mm³
1	+	500	301-500
2	+	500	301-500
3	+	3.000	301-500
4	+	7.500	301-500
5	+	5.000	301-500
6	+	5.000	301-500
7	+	1.000	301-500
8	++	10.000	501-10.000
9	++	2.000	501-10.000
10	++	2.000	501-10.000
11	++	1.000	501-10.000
12	++	2.000	501-10.000
13	++	10.000	501-10.000
14	++	1.000	501-10.000
15	++	1.500	501-10.000
16	++	5.000	501-10.000
17	++	7.500	501-10.000
18	++	7.000	501-10.000
19	+++	12.500	10.001-100.000
20	+++	15.000	10.001-100.000

Tabela 2. Apresentação conjugada de duas tabelas do manual de diagnóstico laboratorial da malária, referentes aos itens 1 e 3, impressas nas páginas 59 e 60 do manual, publicado pela secretaria de vigilância em saúde, Ministério da Saúde, 2009.

Número de parasitos contados	Números de campos microscópicos	Resultado da leitura em cruces	Faixas para estimar o número de parasitos p/mm³
40 a 60	100	+/2	200 - 300
1	1	+	301 - 500
2 – 20	1	++	501 – 10.000
21 – 200	1	+++	10.001 – 100.000
+ 200	1	++++	100.000 ou mais

Tabela 3. Alterações nas faixas limite e valores utilizados para leitura e conversão de resultados apresentadas para revisão do manual em substituição das tabelas dos itens 1 e 3 do manual de diagnóstico laboratorial da malária, publicado pela secretaria de vigilância em saúde, Ministério da Saúde, 2009.

Número de parasitos contados por campo	Número de parasitos contados em 100 campos	Leitura da Gota espessa em cruces	Faixas limite para estimar o número de parasitos por mm³ (<i>P. vivax</i>/mm³)
-----	<60	Não se aplica	Número contado em 100 campos
-----	60 – 100	+/4	≥300 ≤504
1 – 2	101 – 200	+/2	≥505 ≤1.004
3 – 10	301 – 1.000	+	≥1.005 ≤5.004
11 – 20	1001 – 2.000	++	≥5.005 ≤10.000
21 – 200	2.001 – 20.000	+++	>10.000 <100.000
> 200	> 20.000	++++	>100.000

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos uma questão relacionada à leitura da gota GE, um exame bem estabelecido para o diagnóstico da malária. A base para propor uma reavaliação das tabelas, utilizadas no manual de diagnóstico da malária, foi originada no âmbito dos projetos de pesquisa, desenvolvidos na Universidade Federal do Pará, em colaboração com o Instituto Evandro Chagas, no período de 2001 a 2009. Assim, devemos destacar que esta é a primeira descrição de uma análise que propõe a revisão na leitura e conversão de resultados da GE.

Nas últimas décadas, foram realizados vários estudos comparativos acerca da aplicação da microscopia e dos métodos moleculares (KHAIRNAR et al., 2009; BRITTON et al., 2016). No entanto, outras questões acerca da leitura da GE foram, ao longo do tempo, mantidas em situação secundária. Em parte, essa situação ocorreu devido à valorização dos métodos moleculares no âmbito da pesquisa. Porém, no sistema único de saúde (SUS), a GE ainda é a técnica mais aplicada, tendo em vista a realidade da maioria dos municípios brasileiros, onde há registro de transmissão da malária.

O material didático de referência, utilizado nos serviços de saúde do Brasil, é o manual de diagnóstico laboratorial da malária, no qual a faixa utilizada para conversão de resultado é muito ampla, varia de 501 a 10.000 parasitos/mm³. Inicialmente, analisamos um grande número de resultados dos exames, realizados pela GE, e observamos que a tabela de conversão não atendia de forma fidedigna ao pressuposto de quantificação a partir da leitura em cruzes. Assim, realizamos uma revisão da forma de apresentação da leitura e da conversão de resultados dos exames da GE, visando apresentar uma proposta para a revisão do manual.

A preparação e a leitura do exame da GE estão muito bem estabelecidas, porém, nesta análise, observamos que a conversão de resultados pode apresentar discordância, quando realizada utilizando a tabela do manual. Deve ser enfatizado que, entre os diversos materiais gráficos elaborados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do MS (SVS/MS) no âmbito da saúde pública na Amazônia, este manual é de grande relevância, pois é a principal fonte de informações técnicas, procedimentos, ilustrações e apresentação do resultado do exame, necessárias para o treinamento dos microscopistas que atuam no campo, nos laboratórios de pesquisa e nos

laboratórios das secretarias municipais e estaduais de saúde, que pertencem aos serviços de endemias relacionados com a malária.

Neste estudo, analisamos se as faixas de conversão apresentam limites adequados para as devidas conversões das leituras semi-quantitativas para quantitativas. Para tanto, comparamos as duas formas de leitura, com o resultado semi-quantitativo em cruces e com os cálculos para determinar o número de parasitos/mm³. Embora os nossos resultados sejam referentes a análise de 20 lâminas, foi possível identificar a discordância entre a leitura quantitativa da GE e os valores estimados por meio da tabela de conversão de resultados a partir da leitura em cruces. No momento, estamos ampliando o número amostral, para melhor representar todo o espectro de dados, incluindo exames com leituras abaixo de 60 parasitos/mm³ e +/2 (meia cruz) ou acima de 100.000 parasitos/mm³ (++++ cruces). Essa complementação direciona-se para a validação desta nossa proposta de revisão no manual do MS.

O exame semi-quantitativo é suficiente para conduzir ao imediato tratamento do paciente, uma vez que o tratamento é espécie específica e independente da densidade parasitária. Porém, a complementação do exame com a quantificação da densidade parasitária é necessária, pois permite tanto monitorar a condução do tratamento quanto a realização de pesquisa científica, incluindo os estudos para avaliar a eficácia de novas drogas, analisar aspectos da aquisição da imunidade e dos níveis de parasitemia, descrever a fisiopatologia, testar preparações vacinais, além da importância nos estudos epidemiológicos.

Na leitura quantitativa, estima-se o número de parasitos/mm³, utilizando cálculos que, embora sejam simples, apresentam-se como uma limitação para a maior adesão por parte dos técnicos-microscopistas, os quais, em geral, manifestam algum grau de dificuldade para realizar o método quantitativo. Com esses cálculos, converte-se o volume da gota espessa (0,2 µL) para o volume final da apresentação do resultado (parasitos/mm³ de sangue). Conseqüentemente, na prática diária, observa-se que quase a totalidade do sistema de saúde realiza a leitura da GE na forma semi-quantitativa, cujos resultados são expressos em cruces. +++ e ++++ (8).

Considerando que este é o primeiro estudo que propõe a revisão deste manual, ainda será necessário ampliar a discussão dessa questão junto aos órgãos de saúde,

locais, municipais e nacionais, os quais devem analisar as nossas sugestões para adicionar melhorias na leitura e apresentação dos resultados da GE. Assim, no momento da revisão do manual de diagnóstico, poderão validar a inclusão de novas faixas de conversão das leituras em cruces (método semi-quantitativo) para parasitos/mm³ (método quantitativo).

No Brasil, a vigilância epidemiológica da malária atua de forma efetiva em todo o território brasileiro. O controle de qualidade e ações de treinamento estão sob a coordenação de dois laboratórios de referências para o diagnóstico da malária, um no Instituto Evandro Chagas (IEC), em Belém, e outro na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, portanto, localizados, na área endêmica (Amazônia) e na não endêmica (Extra-Amazônia).

Além desses dois laboratórios de referência, deve ser destacado que a técnica da GE é utilizada nos laboratórios das secretarias de saúde de todos os estados da região norte (GRIFFING et al., 2015; FERREIRA; CASTRO, 2016). Assim, as modificações sugeridas visam aumentar a acurácia na conversão da leitura da gota espessa, adicionando melhorias na leitura e apresentação dos resultados do exame por microscopia para o diagnóstico de infecção por *P. vivax*. Portanto, a nossa proposta deverá contribuir com todos os órgãos de saúde envolvidos no diagnóstico, tratamento e controle da transmissão da malária

6. CONCLUSÃO

O nosso estudo evidenciou a necessidade incluir no manual de diagnóstico laboratorial da malária uma tabela, com faixas de distribuição mais representativas, para quantificar a densidade parasitária a partir do método semi-quantitativo. Essa modificação deverá contribuir para a melhoria do diagnóstico, bem como aumentar a integração entre os serviços de saúde e os laboratórios de pesquisa, que realizam estudos em malária no Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, v. 12, n. 2, p. 220–224, 2006.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; MILAZZO, L.; CORBELLINO, M. Biology of Human Malaria Plasmodia Including *Plasmodium Knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012013, 2012.

BAIRD, J.K. Chloroquine Resistance in *Plasmodium vivax*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4075-4083, 2004.

BAIRD, J.K. Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute *Plasmodium vivax* Malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 36-57, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico 44:1**, Brasília, DF, 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico 46: 43**, Brasília, DF, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Tratamento da malária no Brasil**. Brasília, DF, 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica**. Brasília: MS, 52p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) período julho de 2000 a dezembro de 2002: relatório**. Brasília: MS, 76p. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Malária- PCNM**. Brasília: MS, 128p. 2004.

BRITTON, S.; CHENG, Q.; MCCARTHY J.S. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. **Malaria Journal**, 15: 88, 2016.

CARLOS, B.C.; RONA, L.D.P.; CHRISTOPHIDES, G.K.; SOUZA-NETO, J. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. **Pathogens and Global Health**, 113: 1-13, 2019.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. **Cell Press**, v. 124, n. 4, p. 755–766, 2006.

DOUGLAS, N. M.; SIMPSON, J. A.; PHYO, A. P.; SISWANTORO, H.; HASUGIAN, A.R.; KENANGALEM, E.; POESPOPRODJO, J.R.; SINGHASIVANON, P.; ANSTEY, N.M.; WHITE, N.J.; TJITRA, E.; NOSTEN, F.; PRICE, R.N. Gametocyte Dynamics and the Role of Drugs in Reducing the Transmission Potential of *Plasmodium vivax*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 5, p. 801–812, 2013.

DRAPER, S. J.; SACK, B. K.; KING, C. R.; NIELSEN, C.M.; RAYNER, J.C.; HIGGINS, M.K.; LONG, C.A.; SEDER, R.A. Malaria Vaccines: Recent Advances and New Horizons. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 1, p. 43–56, 2018.

DUNDAS, K.; SHEARS, M. J.; SINNIS, P.; WRIGHT, G. J. Important Extracellular Interactions between Plasmodium Sporozoites and Host Cells Required for Infection. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 2, p. 129–139, 2019.

FERREIRA, M.U.; CASTRO M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. **Malaria Journal** 15: 284, 2016

GREENWOOD, B. M.; FIDOCK, D. A.; KYLE, D. E.; KAPPE, S.H.I.; ALONSO, P.L.; COLLINS, F.H.; DUFFY, P.E. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1266–1276, 2008.

GRIFFING, S.M.; TAUIL, P.L.; UDHAYAKUMAR, V.; SILVA-FLANNERY, L. A historical perspective on malaria control in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** 110 (6): 701–18, 2015

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; NOSTEN, F.; DRUILHE, P.; LAXMINARAYAN, R.; BINKA, F.; KILAMA, W.L.; FORD, N.; WHITE, N.J. Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 564–573, 2002.

HAFALLA, J. C.; SILVIE, O.; MATUSCHEWSKI, K. Cell biology and immunology of malaria. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 297–316, 2011.

HOPP, C.; SINNIS, P. The ins and outs of sporozoite biology in the dermis. **Malaria Journal**, v. 13, n. S1, 2014.

HOWES, R.E.; BATTLE, K.E.; MENDIS, K.N.; SMITH, D.L.; CIBULSKIS, R.E.; BAIRD, J.K.; HAY, S.I. Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95(Suppl 6), p. 15–34, 2016.

KIMURA, M.; KANEKO, O.; LIU, Q.; ZHOU, M.; KAWAMOTOC, F.; WATAYAD, Y.; OTANI, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANABE, K. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, n. 2, p. 91–95, 1997.

KHAIRNAR, K.; MARTIN, D.; LAU, R.; RALEVSKI, F.; PILLAI, D.R. Multilex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of *Plasmodium* spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. **Malaria Journal**: 8: 284, 2009.

LADISLAU, J.L.B.; LEAL, M.C.; TAUIL, P.L. Evaluation of the Plan for Intensification of Malaria Control Actions in the Brazilian Amazon Region, Based on a Decentralization Process. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 15 - nº2, 2006

LAPOUBLE, O.M.M.; SANTELLI, A.C.F.S.; MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v 38(4):300–6, 2015.

LOIOLA, C. C. P., SILVA, C. J. M., TAUIL, P. L. Controle da Malária no Brasil: 1965 a 2001. **Revista Panamericana de Salud Pública** 11, 2002.

LUZZATTO, L.; SENECA, E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. **British Journal of Haematology**, v. 164, n. 4, p. 469–480, 2013.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L. B., TAUIL, P. L., DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 115, 2010.

PINA-COSTA, A. D.; BRASIL, P.; SANTI, S. M. D.; ARAUJO, M. P.; SUÁREZ-MUTIS, M. C.; SANTELLI, A. C. F. S.; OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.

SILVA-NUNES, M., MORENO, M., CONN, J. E., GAMBOA, D., ABELES, S., VINETZ, J. M FERREIRA, M. U. Amazonian malaria: Asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Tropica** **121**: 281-291, 2012.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. The skin: where malaria infection and the host immune response begin. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 787–792, 2012.

SIQUEIRA, A. M.; MESONES-LAPOUBLE, O.; MARCHESINI, P.; SAMPAIO, V. S., BRASIL, P., TAUIL, P. L., FONTES, C. J., COSTA, F. T. M., DANIEL-RIBEIRO, C. T., LACERDA, M. V. G., DAMASCENO, C. P., SANTELLI, A. C. S. *Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, 2016.

SIVEP-MALÁRIA - **Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica - Notificação de Casos**. Disponível em:<http://200.214.130.44/sivep_malaria/>. Acesso em: 20 de mar. de 2020.

SWIERCZYNSKI, G.; GOBBO, M. **Atlas of human malaria = Atlante della malaria umana**. Italia: Az Color, 2007.

TANGPUKDEE, N.; DUANGDEE, C.; WILAIRATANA, P.; KRUDSOOD, S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93, 2009.

TAUIL, P.L. The prospect of eliminating malária transmission in some regions of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **106** (1): 105-106, 2011.

TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Some aspects of epidemiology and control of malaria in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**. 58 (3-4): 163-167, 1998.

WHITE, N & BREMAN, J.G. Malária. In: KASPER, D.L. **Medicina Interna de Harrison - 2 Volume**. 19 ed. Porto Alegre: Editora AMGH, 2017. pg: 248-282.

WHITE, N. J. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, 2011.

WHITE, N. J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T. T.; FAIZ, M. A.; MOKUOLU, O. A.; DONDORP, M. A. Malaria. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Ministerial Conference on Malaria (1992: Amsterdam, Netherlands) & World Health Organization. Division of Control of Tropical Diseases. Ministerial Conference on Malaria: report.** Amsterdam, Netherlands, 1992

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Basic Malaria Microscopy.** 2nd edition, (Part 1), Geneva, Switzerland, 80p, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Technical Strategy for Malaria 2016– 2030**, Geneva, Switzerland, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2016**, Geneva, Switzerland, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2017**, Geneva, Switzerland, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2018**, Geneva, Switzerland, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2019**, Geneva, Switzerland, 2019.

8. ANEXO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Carta de nº 0015/2007
 Protocolo CEP/IEC - Nº 0012/06
 CAAE: 0021.0.072.000-06

Ananindeua/PA, 09 de março de 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: "Detecção de citocinas produzidas por linfócitos T específicos e estimulados *in vitro* com antígenos da fase sanguínea de *Plasmodium vivax*".

Pesquisador Responsável: MARISELA GOMES DA CUNHA

Conforme tramitação junto ao CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC