

REA 12 - Desenvolvimento e padronização de ensaio molecular para a detecção de *Plasmodium sp.* em amostras de sangue total e plasma humano

Daniele Rocha^{1*}; Elaine Costa¹; Elisabete Andrade¹; Marisa Ribeiro¹; Marcela Fontana¹; Sthefanie Ribeiro¹; Daniela T. Godoy¹; Antonio G. P. Ferreira¹; Patrícia Alvarez¹.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

Introdução:

A malária é uma protozoonose dos eritrócitos, causada nos seres humanos por cinco espécies do gênero *Plasmodium*: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* e *P.knowlesi*. O *P. falciparum* é a principal causa da malária clínica grave e de mortes. No Brasil, a maioria dos casos de malária se concentra na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), área endêmica para a doença. Para o tratamento adequado dos pacientes com malária, o diagnóstico deve ser realizado de maneira rápida e precisa. O exame de rotina para o diagnóstico da malária é a gota espessa, que consiste na identificação de parasitos no sangue periférico, através de microscopia óptica. Esta técnica é amplamente utilizada, embora possua baixa sensibilidade e especificidade em situações de densidade parasitária baixa e infecções mistas. Por isso, as regiões endêmicas do país necessitam de uma melhor ferramenta de diagnóstico para a detecção de malária.

Objetivo:

Desenvolver e padronizar um ensaio molecular para o diagnóstico de malária (*Plasmodium sp.*) em sangue total e plasma humano, baseada na plataforma de PCR em Tempo Real.

Metodologia:

Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real para o desenvolvimento do teste. E, para detectar qualquer isolado de *Plasmodium sp.* foram desenhadas algumas sequências de iniciadores e de sondas da região genômica conservada 18SrRNA. Em toda reação foi utilizada uma partícula calibradora (PC), como controle interno do sistema. Para a padronização da reação duplex e prova de conceito foram utilizadas amostras de pacientes.

Resultado:

Após diversos testes para a padronização da reação Duplex (Malária CY5/PC ABY), um conjunto de iniciadores e de sonda obtiveram resultados satisfatórios para a detecção do alvo *Plasmodium sp*, apresentando um bom desempenho nas curvas de amplificação e sem reação inespecífica. Os testes para aperfeiçoamento da reação foram realizados com amostras de pacientes com diferentes concentrações de sondas e de iniciadores. Após aperfeiçoamento, o ensaio molecular para o diagnóstico de malária apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade satisfatória. Trinta e duas amostras de plasmas positivos para Malária foram submetidas ao ensaio molecular. Todas as amostras, exceto uma, tiveram amplificação para Malária.

Conclusão:

Os testes realizados mostraram que a reação duplex (Malária/PC) é satisfatória. O desenvolvimento de um ensaio molecular para o diagnóstico de Malária irá ajudar nos inquéritos epidemiológicos, na determinação do portador assintomático, no monitoramento da resposta terapêutica e no rastreamento de doadores infectados em bancos de sangue.

Palavras-chave: Malária; Diagnóstico; PCR em tempo real