

# Comparação entre dois métodos de obtenção de DNA a serem usados como protocolos alternativos para a detecção de parasitas humanos causadores de malária por *nested* PCR

Comparison of two DNA obtainment methods as alternative protocols for the detection of human malaria parasites by *nested* PCR

Comparación entre dos métodos de obtención de DNA a ser usados como protocolos alternativos para la detección de parásitos humanos causadores de malaria por *nested* PCR

Giselle Maria Rachid Viana  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia,  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

José Mário Veloso Peres  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia,  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Danielle Regina Lima Barbosa  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia,  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

José Maria Souza Nascimento  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia,  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Ediclei Lima do Carmo  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia,  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

Marinete Marins Póvoa  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia,  
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Ananindeua, Pará, Brasil

## RESUMO

Um diagnóstico laboratorial correto e preciso de malária humana ainda é considerado um desafio, pois o método de referência, o da gota espessa com colocação pelo Giemsa, apresenta limitações que dificultam o controle da malária. Devido a esses problemas, várias pesquisas têm objetivado desenvolver métodos alternativos para o diagnóstico da malária. Grande parte desses estudos aborda métodos de diagnóstico molecular, que têm acarretado o desenvolvimento de algumas alternativas ao método de coloração pelo Giemsa. No entanto, esses métodos, por sua vez, apresentam suas limitações, que incluem seu alto custo, a complexidade do protocolo e a variação da qualidade das fontes de DNA e de reagentes. Neste aspecto, a técnica de *nested* PCR tem demonstrado ser um bom método e pode ser melhorado usando uma fonte de DNA de alta qualidade. Neste estudo foram avaliados dois métodos para a obtenção de DNA de amostras de sangue seco colhidas em papel de filtro: 1) lavagem e 2) saponina/Chelex-100. O segundo método apresentou sensibilidade e especificidade mais altas em relação ao primeiro, pois detectou mais infecções, tanto simples como mistas, bem como infecções por *Plasmodium malariae*. Com base nesses resultados, apresentamos o segundo como o protocolo de escolha para a obtenção de DNA. A técnica de *nested* PCR usando saponina/Chelex-100 para extração de DNA pode ser um método alternativo ou complementar de diagnóstico de parasitas da malária humana, mas não é considerado adequado para o uso de rotina.

**Palavras-chave:** Malária; DNA; Reação em Cadeia da Polimerase.

## INTRODUÇÃO

A malária é um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e atinge especialmente populações

pobres na Região Amazônica<sup>16,18</sup>. A identificação precisa das espécies de *Plasmodium* que infectam humanos é de extrema importância para que seja viabilizado o seu tratamento de forma rápida e adequada. O método de referência para o diagnóstico de malária é o esfregaço de gota espessa com coloração de Giemsa (TS); apresenta baixo custo, boa sensibilidade, permite a identificação das formas das espécies de *Plasmodium* em todas as fases de desenvolvimento e a quantificação dos estágios do parasita<sup>8,21</sup>. Geralmente, sua sensibilidade para a detecção pelo microscopista varia entre 10-30 parasitas/ $\mu$ L de sangue; no entanto, esta sensibilidade pode ser limitada quando há uma grande quantidade de amostras a serem examinadas em um intervalo de tempo

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Giselle Maria Rachid Viana  
Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia  
Instituto Evandro Chagas  
BR 316, km 7, s/n. 67030-000, Levilândia. Ananindeua-Pará-Brasil  
Phone : 55 91 3214-2148  
E-mail: giselleviana@iec.pa.gov.br

**Traduzido por / Translated by / Traducido por:**  
André Monteiro Diniz

muito curto. É possível obter resultados falsos-negativos devido aos baixos níveis de parasitemia, à existência de infecções mistas ou inexperiência por parte do microscopista. Este fato pode comprometer uma das principais estratégias de controle da malária: um diagnóstico rápido e preciso, que viabilize a realização do tratamento adequado<sup>2,3,7,20</sup>.

Para suplantiar algumas limitações do método TS, alguns métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), como o protocolo *Nested-PCR* desenvolvido por Kimura et al<sup>11</sup>, têm sido utilizados para detectar e identificar parasitas da malária. Esses métodos são mais sensíveis e específicos que o TS e podem detectar até mesmo um único parasita por microfítulo de sangue<sup>5,10,21,23</sup>. Contudo, o sucesso de uma técnica de PCR depende de vários fatores, tais como a qualidade dos reagentes e do DNA obtido de diferentes fontes. Além disso, já foi demonstrado que a amplificação de DNA de amostras de sangue seco em papel-filtro é uma fonte confiável de DNA quando as condições de transporte, de manipulação e armazenamento são consideradas adequadas para evitar a contaminação ou degradação do DNA<sup>1,4,6,12</sup>. Por esta razão, é importante testar diferentes métodos de obtenção de DNA como protocolos alternativos de detecção de parasitas da malária humana por *Nested-PCR*. Este estudo objetivou comparar as duas seguintes técnicas: 1) Extração de DNA por procedimento de lavagens<sup>26</sup>, e 2) Extração de DNA por meio de tratamento de amostras de sangue seco com saponina/Chelex-100 em papel-filtro<sup>27</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizamos neste estudo 75 amostras de sangue seco positivas (parasitemia variando de 0,001% a 2%) e 78 negativas em discos de papel-filtro Whatman®, de 2,5 cm de diâmetro (Titertek, ICN Biomedicals - England). As amostras de sangue foram coletadas de habitantes dos Municípios de Novo Repartimento (04°14' 55" N; 50° 07' 25" W), Parauapebas (06° 04' 03" N; 49° 54' 08" W), Tucuruí (03° 45' 03" N; 49° 40' 03" W) e Belém (01° 27' 20" N; 48° 30' 15" W), no Estado do Pará. Os controles para cada parasita da malária humana incluíram amostras positivas bem caracterizadas e água ultrapura e DNA humano para os controles negativos. Todas as amostras foram testadas e diagnosticadas segundo o método de esfregaço de gota espessa com coloração de Giemsa (TS). A quantificação dos parasitas foi realizada nas lâminas com amostras positivas<sup>14</sup>.

### DNA OBTIDO PELO MÉTODO DE LAVAGEM

As amostras de papel-filtro foram preparadas colocando-se cinco gotas de 20 µL de cada amostra em discos de papel-filtro Whatman® (2,5 cm de diâmetro) (Titertek, ICN Biomedicals - England) e secando-as em temperatura ambiente (TA, 25-27° C). As amostras foram

então armazenadas em embalagens plásticas previamente identificadas (BHL Limited, Poole - England), que haviam sido mantidas a uma temperatura de -20° C até a sua utilização. Foram lavadas com água destilada e solução salina 0,9%, utilizando um sistema de filtragem Millipore® para remover todos os inibidores de PCR<sup>26</sup>.

### EXTRAÇÃO DE DNA PELO MÉTODO DE SAPONINA/CHELEX-100

Um quarto de cada gota seca em papel-filtro foi cortado em pequenos pedaços e incubado em gelo com solução de saponina 0,5% em PBS por 1 h. Posteriormente, a solução foi misturada usando-se um "vórtex" e o sobrenadante foi descartado. Foi feita então uma lavagem com PBS, foi adicionada uma solução de Chelex-100 20% em água e a solução foi incubada em banho seco por 1 h. Após a incubação, o sobrenadante foi transferido para tubos Eppendorf® estéreis e armazenado a -20° C<sup>27</sup>.

### REAÇÃO DE NESTED-PCR

A reação de amplificação da subunidade do gene 18S do RNA ribossômico (rRNA) do *Plasmodium* (ssu-rRNA) foi conduzida de acordo com o descrito no protocolo de Kimura et al<sup>11</sup>. Os *primers* P1 e P2 foram utilizados como *primers* universais no primeiro ciclo, e os *primers* F2, M1 e V1 foram utilizados como *primers* específicos para *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente, no segundo ciclo. Os produtos obtidos pela *Nested-PCR* foram fracionados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% (Ultra pure agarose, BRL 155517-014) a 100 V por 1 h e corada com brometo de etídio (5µL/mL). Os tamanhos esperados dos produtos da PCR eram de 130 bp para o primeiro estágio e 100-110 bp para o segundo estágio. Os técnicos que realizaram a *Nested-PCR* não tiveram ciência dos resultados obtidos pela análise por microscopia.

### ÉTICA

O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (004/2003-CEP/IEC/SVS/MS). Os objetivos e procedimentos do estudo foram devidamente explicados para todos os participantes; todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e dados sociodemográficos e clínicos foram coletados.

## RESULTADOS

Das 153 amostras, 49,01% (75/153) foram positivas pelo TS (com parasitemia variando de 0,001% a 2,0%) e 50,98% (78/153) foram negativas. Pela *Nested-PCR*, 43,79% (67/153) das amostras foram positivas e 56,20% (86/153) foram negativas com o método de extração do DNA por procedimento de lavagem, enquanto 51,63% (79/153) foram positivas e 48,36% (74/153) foram negativas com o método por saponina/Chelex-100 (Tabela 1).

**Tabela 1** – Identificação de espécies de *Plasmodium* por esfregaço de gota espessa corado por Giemsa (TS) e por *Nested*-PCR utilizando os métodos com lavagem e saponina/Chelex-100 para a extração do DNA

TS <i>Nested</i> -PCR	Negativo		PF		PV		PM		Mista*		Mista <sup>†</sup>		Total	
	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S	W	S
Negativo	78	74	2	–	6	–	–	–	–	–	–	–	86	74
<i>P. falciparum</i>	–	1	25	27	–	–	–	–	–	–	–	–	25	28
<i>P. vivax</i>	–	–	–	–	37	42	–	–	–	–	–	–	37	42
<i>P. malariae</i>	–	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3
Infecção mista*	–	–	–	–	4	3	–	–	1	1	–	–	5	4
Infecção mista <sup>†</sup>	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–	2
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>	<b>78</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>47</b>	<b>47</b>	<b>–</b>	<b>–</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>–</b>	<b>–</b>	<b>153</b>	<b>153</b>

L: Lavagem; S: Saponina/Chelex-100; PF: *P. falciparum*; PV: *P. vivax*; PM: *P. malariae*; \*: *P. falciparum* + *P. vivax*; <sup>†</sup>: *P. vivax* + *P. malariae*; -: não detectado.

O desempenho da *Nested*-PCR comparada com o TS foi o seguinte: 1) método de lavagem - sensibilidade = 89,33%, especificidade = 100%, acurácia = 94,77%; 2) saponina/Chelex-100 - sensibilidade = 100%, especificidade = 94,87%, acurácia = 97,39%. A concordância entre esses métodos e a análise por microscopia foi quase perfeita [ $Kappa = 0,8952$  e  $0,9477$ , respectivamente; IC 95%: variação de 0,80 a 1,00]. O método de saponina/Chelex-100 fornece amostras de DNA de melhor qualidade do que o método de lavagem.

A frequência de espécies de *Plasmodium* e de infecções mistas detectadas pela *Nested*-PCR usando o DNA extraído pelos métodos de lavagem e saponina/Chelex-100 está demonstrada na Tabela 2. O método de saponina/Chelex-100 forneceu melhores amostras de DNA, o que é demonstrado pelo fato de que, com este método, a *Nested*-PCR pôde detectar tanto infecções simples como mistas por *P. malariae*, e detectou um número maior de outras infecções do que o método de lavagem.

**Table 2** – Frequência de espécies de *Plasmodium* e infecção mista detectada por *Nested*-PCR usando os métodos de lavagem e saponina/Chelex-100 para a extração de DNA

Resultados	Frequência	
	Lavagem	Saponina/Chelex-100
Negativo	56.20% (86/153)	48.36% (74/153)
<i>P. falciparum</i>	13.33% (25/153)	18.30% (28/153)
<i>P. vivax</i>	24.18% (37/153)	27.45% (42/153)
<i>P. malariae</i>	–	1.96% (3/153)
mista ( <i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i> )	3.26% (5/153)	2.61% (4/153)
mista ( <i>P. vivax</i> + <i>P. malariae</i> )	–	1.30% (2/153)
<b>TOTAL</b>	<b>100% (153/153)</b>	<b>100% (153/153)</b>

–: não detectado.

A figura 1 apresenta os resultados da análise por *Nested*-PCR usando DNA obtido pelo método de saponina/Chelex-100. As faixas 2, 3 e 4 contêm amostras de um único paciente; cada poço corresponde a reações para *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente, demonstrando que o paciente apresenta uma infecção mista por *P. malariae* e *P. vivax*.



Colunas: marcador de peso molecular 1 = 50 bp; 3 e 4 = amostras positivas para *P. malariae* e *P. vivax*; 5 e 7 = amostras positivas para *P. falciparum* e *P. vivax*; 8 = amostra positiva para *P. falciparum*; 11 = controle positivo para *P. falciparum*; 12 = controle negativo (DNA humano); 13 = controle positivo para *P. malariae*; 14 = controle positivo para *P. vivax*; 15 e 16 = controles negativos (água ultrapura).

**Figura 1** – Análise das colunas 1 a 16 por eletroforese em gel de agarose

## DISCUSSÃO

Apesar de o TS ainda ser o método de referência para o diagnóstico de malária, as técnicas moleculares são mais sensíveis e específicas para detectar parasitas e podem ser utilizadas para avaliar o desempenho das análises por microscopia<sup>20,28</sup>.

As amostras de sangue seco em papel-filtro constituem um método simples e acessível para coleta e armazenamento. Eles têm sido amplamente utilizados em triagem para diagnóstico, análise genética e estudos sobre epidemiologia molecular em áreas remotas com clima tropical, onde as condições de transporte e armazenamento não são ideais. A perda de sensibilidade

de métodos baseados em PCR devido às condições de campo já foi reportada e é provavelmente causada pela baixa pureza, estabilidade e integridade do DNA obtido de amostras de sangue em papel-filtro. Um problema observado com a coleta em papel-filtro é a limitação no volume de amostras que podem ser utilizadas para a extração de DNA. Portanto, um bom isolamento do DNA é fundamental para assegurar a qualidade e eficácia de métodos moleculares<sup>7,20</sup>.

Vários estudos visaram reduzir os custos de protocolos baseados em PCR, bem como torná-los rápidos e precisos. Um fator essencial do protocolo para a aquisição de bons resultados é a obtenção de uma amostra de DNA de boa qualidade<sup>1,5,6,7</sup>.

Neste estudo realizamos uma análise comparativa de dois protocolos para a obtenção de DNA, levando em consideração o tempo necessário, seus custos e a qualidade do DNA extraído<sup>7</sup>. Os resultados demonstraram que a técnica de *Nested-PCR* com procedimento de lavagem não detectou oito amostras positivas (seis com *P. vivax* e dois com *P. falciparum*) identificadas por TS, enquanto o método de *Nested-PCR* com saponina/Chelex-100 detectou todas as amostras positivas identificadas por TS, bem como outras cinco amostras (três infecções simples por *P. malariae* e duas infecções mistas por *P. vivax* e *P. malariae*). Uma razão possível para a falha na detecção de algumas amostras positivas se deve ao fato de que o método de lavagem não eliminou inibidores de *Nested-PCR* adequadamente, como a hemoglobina. Os resultados demonstraram que o método de *Nested-PCR* com saponina/Chelex-100 se mostrou mais sensível e específico que o de lavagem, especialmente para a detecção de *P. malariae*.

Análises da extração de DNA com lavagem e com saponina/Chelex-100, como descrito por Warhurst et al<sup>26</sup> e Wooden et al<sup>27</sup>, respectivamente, de 153 amostras de sangue seco em papel-filtro demonstraram que ambos os métodos são sensíveis e apresentam alta especificidade, além de serem de realização fácil e rápida. Além disso, pelo fato de esses métodos constituírem protocolos in house, seus custos foram mais baixos do que os kits comerciais disponíveis. No entanto, o método com saponina/Chelex-100 foi considerado mais sensível e, conseqüentemente, deveria ser o protocolo de escolha para a detecção de parasitas de malária com base na extração de DNA por *Nested-PCR*.

O protocolo de *Nested-PCR* desenvolvido por Kimura et al<sup>11</sup> para espécies de *Plasmodium* que infectam humanos demonstrou ser útil, pois é bastante sensível, específico, é possível de ser reproduzido e não apresenta evidências de contaminação cruzada no estudo. Utilizando este

protocolo, detectamos infecções mistas que haviam sido identificadas por TS como infecções simples, o que corrobora com os dados apresentados por Ebrahimzadeh et al<sup>5</sup>, Scopel et al<sup>21</sup>, Singh et al<sup>22</sup>, Snounou et al<sup>24</sup> e Toma et al<sup>25</sup>.

Em casos de infecção mista, há predominância de uma espécie de *Plasmodium*, que normalmente é a detectada por ambas as técnicas, TS e PCR, enquanto que a espécie não dominante é identificada apenas por métodos baseados em análises de PCR. Além disso, um baixo nível de parasitemia de *P. malariae* é frequente principalmente em infecções mistas, provavelmente por causa das características desta espécie e do mecanismo de regulação dependente de densidade. Por isso, esta espécie poderia passar facilmente sem ser notada em análises por microscopia quando *P. falciparum* ou *P. vivax* são as espécies dominantes. Este fato também ajuda a explicar o maior número de infecções mistas detectadas por meio de métodos de biologia molecular, quando comparado com as ferramentas microscopias tradicionais<sup>27</sup>.

Os métodos de diagnóstico de malária baseados em PCR são bastante específicos e sensíveis; no entanto, não podem substituir as análises convencionais por microscopia para uso de rotina<sup>9</sup>, pois não permitem a quantificação das formas de parasitas. Ademais, eles são técnicas complexas, com várias etapas e alto custo. Portanto, eles podem ser úteis como ferramentas alternativas e complementares para o diagnóstico de malária humana em países em desenvolvimento<sup>4,13,19,22</sup>.

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem a ocorrência de infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*; *P. vivax* + *P. malariae*) na área investigada, as quais não foram identificadas pelo método de microscopia convencional (TS). Além disso, os dois métodos para obtenção de DNA analisados, o de lavagem<sup>26</sup> e o de extração com saponina/Chelex-100<sup>27</sup>, apresentaram sensibilidade e alta especificidade, bem como um custo mais baixo em comparação com os kits comerciais; eles também foram considerados de execução fácil e rápida. O segundo método, no entanto, foi considerado mais sensível: ele fornece um protocolo simples para a extração de DNA de amostras de sangue seco e poderia ser o protocolo de escolha para a obtenção do DNA.

## AGRADECIMENTOS

A Ivana Pimentel e aos técnicos do Laboratório de Pesquisa em Malária do Instituto Evandro Chagas por seu apoio técnico.



## Comparison of two DNA obtainment methods as alternative protocols for the detection of human malaria parasites by nested PCR

### ABSTRACT

The correct and precise laboratory diagnosis of human malaria is still a challenge because the reference method, the Giemsa-stained thick blood smear (TS), has limitations that present problems for malaria control. Because of these problems, several studies have attempted to develop alternative methods for malaria diagnosis. Many of these studies focus on molecular diagnosis methods and have led to the development of some alternatives to TS. However, their limitations include high cost, protocol complexity and variable quality of DNA sources and reagents. Nested PCR has been shown to be a good method in this respect and it can be improved by using a high-quality source of DNA. In this study we evaluated two methods for the obtainment of DNA from dried blood samples on filter paper: 1) washing and 2) saponin/chelex-100. The second method showed higher sensitivity and specificity compared to the first, as it detected more infections, whether single or mixed, as well as *Plasmodium malariae* infections. Based on these results, we present this method as the protocol of choice for DNA obtainment. Nested PCR using saponin/chelex-100 for DNA extraction could be an alternative or complementary diagnosis method for human malaria parasites, but it is not appropriate for routine use.

**Keywords:** Malaria; DNA; Polymerase Chain Reaction.

## Comparación entre dos métodos de obtención de DNA a ser usados como protocolos alternativos para la detección de parásitos humanos causadores de malaria por nested PCR

### RESUMEN

Un diagnóstico de laboratorio correcto y preciso de malaria humana todavía se considera un desafío, pues el método de referencia, el de la gota espesa con colocación en Giemsa, presenta limitaciones que dificultan el control de la malaria. Debido a esos problemas, varias investigaciones han tenido como objetivo desarrollar métodos alternativos para el diagnóstico de la malaria. Gran parte de esos estudios aborda métodos de diagnóstico molecular, que han resultado en el desarrollo de algunas alternativas al método de tñido por Giemsa. Sin embargo, esos métodos, por su vez, presentan limitaciones, que incluyen su alto costo, la complejidad del protocolo y la variación de la calidad de las fuentes de DNA y de reactivos. En este aspecto, la técnica de nested PCR ha demostrado ser un buen método y puede ser mejorado usando una fuente de DNA de alta calidad. En este estudio se evaluaron dos métodos para la obtención de DNA de muestras de sangre seca recogidas en papel de filtro: 1) lavado y 2) saponina/Chelex-100. El segundo método presentó sensibilidad y especificidad más altas en relación al primero, pues detectó más infecciones, tanto simples como mixtas, bien como infecciones por *Plasmodium malariae*. Con base en estos resultados, presentamos el segundo método como el protocolo de elección para la obtención de DNA. La técnica de nested PCR usando saponina/Chelex-100 para extracción de DNA puede ser un método alternativo o complementario de diagnóstico de parásitos de la malaria humana, pero no se considera adecuado para uso de rutina.

**Palabras clave:** Malaria; ADN; Reacción en Cadena de la Polimerasa



### REFERÊNCIAS

- Alger J, Acosta MC, Lozano C, Velasquez C, Labrada LA. Stained smears as a source of DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91(5):589-91.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):641-8.
- Ciceron L, Jaureguiberry G, Gay F, Danis M. Development of a *Plasmodium* for monitoring efficacy of antimalarial treatment. J Clin Microbiol. 1999;37(1):35-8
- Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KC, Oliveira AM, Ferreira SR, Boulos M. PCR - based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 Jul-Aug; 46(4):183-7.
- Ebrahimzadeh A, Fouladi B, Fazaeli A. High rate of detection of mixed infections of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in South-East of Iran, using nested PCR. Parasitol Int. 2007;56(1):61-4.
- Edoh D, Steiger S, Genton B, Beck HP. PCR amplifications of DNA from malaria parasites on fixed and stained thick and thin blood films. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997 May-Jun;91:361-3.
- Farnert A, Arez AP, Correia AT, Bjorkman A, Snounou G, Rosário V. Sampling and storage of blood and detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999 Jan-Feb; 93:50-3.
- Gilles HM. The malaria parasite. In: Gilles HM, Warrell DA, editors. Essential Malariaology. London: Edward Arnold. 1993. p. 12-34.
- Haghdoust AA, Mazhari S, Bahadini K. Comparing the results of light microscopy with the results of PCR method in the diagnosis of *Plasmodium vivax*. J Vec Dis. 2006;43:53-7.

- 10 Imirzalioglu C, Soydan N, Schaller M, Bretzel RG, Chakraborty T, Domann E. Diagnosis of mixed *Plasmodium malariae* and *P. vivax* infection in a development aid volunteer by examination of bone-marrow specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2006 Jun;44(6):2307-10.
- 11 Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitology Int.* 1997;46:91-5.
- 12 Maeno Y, Nakazawa S, Dao le D, Yamamoto N, Giang ND, Van Hanh T, et al. A dried blood sample on filter paper is suitable for detecting *Plasmodium falciparum* gametocytes by reverse transcription polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 2008;107(2):121-7.
- 13 McNamara DT, Thomson JM, Kasehagen LJ, Zimmerman PA. Development of a multiplex PCR-ligase detection reaction assay for diagnosis of infection by the four parasite species causing malaria in humans. *J Clin Microbiol.* 2004 Jun;42(6):2403-10.
- 14 Ministério da Saúde (BR). Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2.ed. Brasília; 2009. 112 p.
- 15 Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico da malária nº 02. 2005
- 16 Ministério da Saúde (BR). Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, ano de 2008. Brasília, 2008. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder\\_malaria\\_2009\\_web.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2009_web.pdf)
- 17 Organização Mundial de Saúde. revised July, 2003. Fact sheet nº 94. Disponível em: <http://www.who.int.dsa>.
- 18 Pan American Health Organization. Regional Strategic Plan for Malaria in the Americas 2006-2010. Washington, D.C: PAHO; 2006. 85 p.
- 19 Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatou K. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5636-43.
- 20 Schindler HC, Montenegro L, Montenegro R, Carvalho AB, Abath FG, Jaureguiberry G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Oct;65(4):355-61.
- 21 Scopel KK, Fontes CJ, Nunes AC, Horta MF, Braga EM. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás – Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Trop.* 2004 Mar;90(1):61-4.
- 22 Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. A Genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Apr;60(4):687-92.
- 23 Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaitong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Apr;58(2):283-92.
- 24 Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Oct;61(2):315-20.
- 25 Toma H, Kobayashi J, Bouakham V, Arakawa T, Sato Y, Nambanya S, et al. A field study on malaria prevalence in southeastern Laos by polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(5, 6):257-61.
- 26 Warhurst DC, Awad el Kariem FM, Miles MA. Simplified preparation of malarial blood samples for polymerase chain reaction. *Lancet.* 1991 Feb;337(8736):303-4.
- 27 Wooden J, Kyes S, Silbly CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today.* 1993 Aug;9(8):303-5.
- 28 World Health Organization. Malaria diagnosis – new perspectives: report of a joint WHO/USAID informal consultation, 25-27 October 1999. Geneva: WHO; 2000. 1091 p.

Recebido em / Received / Recibido en: 23/7/2009  
 Aceito em / Accepted / Aceito en: 21/9/2010