

TÍTULO: COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA DE NESTED-PCR PARA DETECÇÃO DAS TRÊS ESPÉCIES DE PARASITOS DE MALÁRIA HUMANA EM ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO PARÁ – RESULTADOS PRELIMINARES.

AUTOR(ES): BARBOSA, D. R. L.; VIANA, G. M. R.

CO-AUTOR(ES): CARMO, E. L.; PÓVOA, M. M.

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS/SVS/MS

INTRODUÇÃO: A Gota Espessa (GE) é o método de escolha para o diagnóstico da malária humana em áreas endêmicas, sobretudo devido ao baixo custo e sensibilidade satisfatória. Porém, possui alguns limitantes, como: experiência do microscopista, coloração adequada das lâminas e tempo gasto para examiná-las, etc. Para superar algumas destas limitações, métodos baseados na Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase (PCR) têm sido desenvolvidos. Dentre os métodos de obtenção de DNA disponíveis para realização do diagnóstico molecular para malária humana, foram comparados o preparo e lavagem de amostras sanguíneas de acordo com Warhurst et al. (1991) e extração de DNA pelo método de Saponina/Chelex-100 segundo Wooden et al. (1993) para verificação do comportamento da Nested-PCR nestas condições.

MÉTODOS: Foram incluídas 52 amostras de sangue total preparadas em membrana de fibra de vidro Whatman® de 2,5 cm de diâmetro (Whatman International, Maidstone - England) oriundas das localidades de Novo Repartimento, Parauapebas, Cachoeira do Piriá e Belém (PA), além de controles positivos para as três espécies de plasmódios (*Plasmodium falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*) e água destilada estéril como controle negativo. Estas membranas foram submetidas ao método de obtenção de DNA de acordo com Warhurst et al. (1991) e também pela extração de DNA pelo método de Saponina/Chelex-100 segundo Wooden et al. (1993) e posteriormente encaminhadas para a Nested-PCR de acordo com protocolo descrito por Kimura et al. (1997).

RESULTADOS PRELIMINARES: Com a Nested-PCR, obteve-se na análise estatística (BioEstat 2.0) os seguintes parâmetros em relação ao método de obtenção de DNA descrito por Warhurst et al. (1991): sensibilidade = 84,62 %, especificidade = 100%, falso-positivo = 0,000, falso-negativo = 0,076 e acurácia = 94,62 % quando comparada com a GE; enquanto pelo protocolo descrito por Wooden et al. (1993) foram obtidos sensibilidade = 99,7 %, especificidade = 100%, falso-positivo = 0,074, falso-negativo = 0,0000 e acurácia = 99,98 % quando comparada com a GE. Além disso, a Nested-PCR detectou duas infecções mistas (*P. falciparum* + *P. vivax*) pelos dois métodos de obtenção de DNA analisados que não foram detectadas pela GE ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO: Nesta etapa do estudo, pode ser sugerido que: a sensibilidade e especificidade da técnica molecular comparada com a GE pelos dois métodos de obtenção de DNA foram elevadas; o protocolo de extração de DNA descrito por Wooden et al. (1993) é de menor custo em relação a outros disponíveis, como kits comerciais, além de ser de fácil e rápida execução e pode ser utilizado como protocolo de escolha para a etapa de obtenção de DNA na pesquisa de espécies de plasmódios humanos pela técnica de Nested-PCR.