

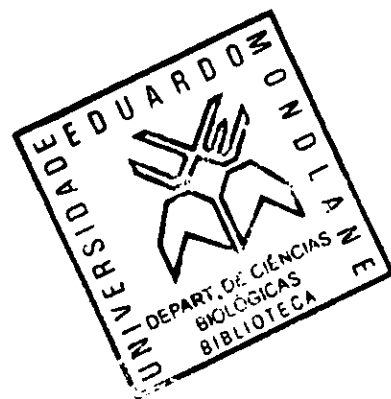
B10-59



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

(Relatório de Estágio)
Trabalho de culminação do curso

**Cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum* no Laboratório de
Biologia Parasitária do Instituto Nacional de Saúde**



Autor: Amílcar Artur Nacima



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

(Relatório de Estágio)
Trabalho de culminação do curso

***Cultura in vitro de Plasmodium falciparum* no Laboratório de
Biologia Parasitária do Instituto Nacional de Saúde**

Supervisores:

Dr. Ricardo Thompson

Dr^a Sandra Silva

Autor:

Amílcar Artur Nacima

Maputo, Dezembro de 2007



AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus supervisores Doutor Ricardo Thompson e dr^a. Sandra Silva, pelo acompanhamento com os seus múltiplos conselhos, inúmeros e relevantes comentários, desempenharam um papel orientador muito apreciado na construção deste trabalho.

Aos meus orientadores dr Dinis Mandlate e a dr^a Sónia Luís, que com muita paciência e humildade souberam partilhar seus conhecimentos para me orientar da melhor forma possível na realização desta trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Parasitaria Teresa, Tomas e Bernardete pelo apoio técnico. A todo pessoal do Departamento de Parasitologia de Sangue do Instituto Nacional de Saúde.

A todos docentes e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas. Aos meus colegas Eliseu, Tандаucane, Bule, Crimildo, Mutombene, Hélder ,Kalid, Tembe, Zita, Quitéria, Sílvia.e Cristolde. Especial agradecimento ao meu grande e inesquecível amigo Nelson Cossa, sem ser injusto com os demais. Foram momentos difíceis superados graças à nossa união.

À minha família; podendo especialmente mencionar a minha incansável mãe: Isabel Nampinga; meus irmãos Calton, Augusto e Carmen; pelo encorajamento, apoio moral e financeiro.

Cumpre-me enfim agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma directa ou indirectamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

DECLARAÇÃO DE HONRA.

Declaro por minha honra que o presente trabalho foi realizado por mim, como resultado do estágio desenvolvido no Laboratório de Biologia Parasitaria do Instituto Nacional de Saúde, e que não foi submetido para outro grau académico. As técnicas apresentadas neste trabalho são executadas neste laboratório.

Amílcar Artur Nacima

(Amílcar Artur Nacima).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e a todos que sempre acreditaram em mim, podendo em especial devotar ao meu pai Janeiro Nacima, descanse em paz.

Resumo

O presente trabalho de estágio foi realizado no Laboratório de Biologia Parasitária do Departamento de Parasitologia de Sangue do Instituto Nacional de Saúde. teve como principais objectivos: adquirir habilidades, conhecimentos teóricos e práticos das técnicas de culturas *in vitro* de *Plasmodium falciparum* realizadas no Laboratório de Biologia Parasitária e saber interpretar os resultados obtidos das culturas.

O estágio decorreu em duas fases: a primeira decorreu de Junho a Agosto de 2007 caracterizada pela adaptação do estudante à unidade de estágio e elaboração do protocolo; havendo a segunda decorrida entre os meses de Agosto e Novembro que consistiu essencialmente na colheita de amostras positivas para o *Plasmodium falciparum* e posterior estabelecimento em cultivo.

Efectuou-se uma amostragem de 10 amostras positivas no laboratório do Banco de Socorros e de Pediatria do Hospital Central de Maputo, e de Urgências do Hospital Geral de Mavalane, das quais 7 foram inoculadas, visto que as restantes não apresentavam condições apropriadas. Obteve-se uma parasitémia máxima de 5.4%, abaixo do esperado (15%).

Foram alcançados os objectivos predefinidos.

Abreviaturas

- Albumax - Lipid-rich bovine serum albumin
CPD - Citrato Fosfato Dextrose
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
DPS - Departamento de Parasitologia de Sangue
HCl - Ácido Clorídrico
HCM - Hospital Central de Maputo
HEPES - *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)
INS - Instituto Nacional de Saúde
LBP - Laboratório de Biologia Parasitaria
MCC - Meio de Cultura Completo
MCI - Meio de Cultura Incompleto
MISAU - Ministério da Saúde
NaCl - Cloreto de Sódio
NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio
NSE - Não Se Encontrou.
PCR - Reacção em Cadeia da Polimerase
pH - Potencial de Hidrogenio
PNCM - Programa Nacional do controlo a Malária
RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute
TPBEE - Tetrabromofenofaleina Etil Éter
WHO - World Health Organization

ÍNDICE

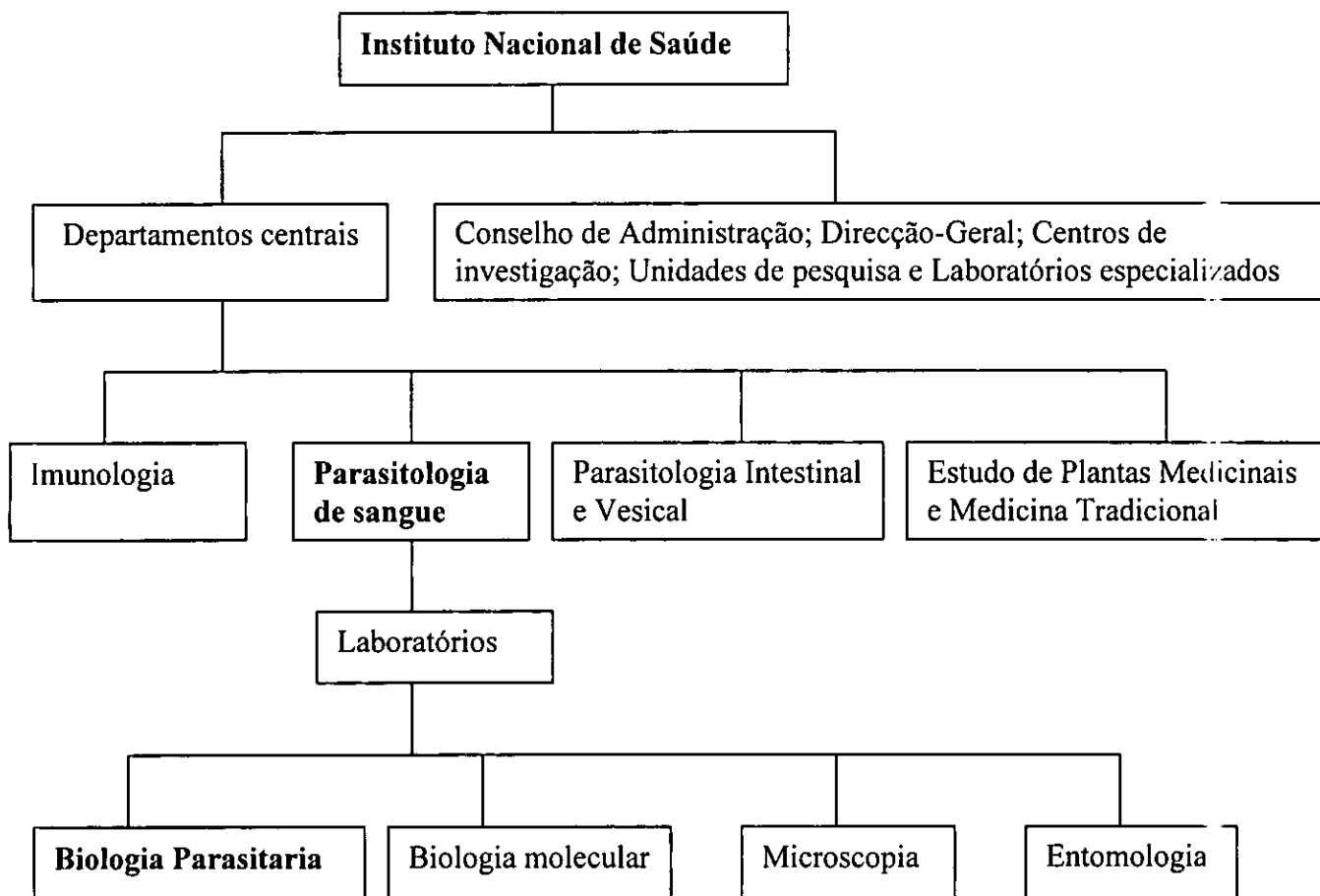
1. Apresentação e caracterização do local de estágio	1
1.1. Breve historial do local de estágio	2
2. Programa do estágio	3
3. O apoio concedido ao estudante por parte da unidade de estágio	3
4. Revisão bibliográfica	3
5. Objectivos	8
5.1 Objectivo Geral:	8
5.2 Objectivos específicos:	8
6. Actividades desenvolvidas durante o período do estágio	8
7. Material e Métodos	9
7.1. Material	9
7.1.1 Equipamento	9
7.1.2 Reagentes	9
7.1.3 Material acessório	10
7.2 Metodologia	11
7.2.1 Preparação de meio de cultura	11
7.2.1.1 Meio de cultura incompleto – MCI	11
7.2.1.2 Meio de cultura completo – MCC	11
7.2.1.3 MCC alternativo	11
7.2.2 Colheita de amostras (<i>P. falciparum</i>)	12
7.2.2.1 Teste de urina para a detecção de antimalárico (Saker-Salmons)	13
7.2.3 Cultura de <i>P. falciparum</i>	14
7.2.3.1 Procedimento	14
8. Resultados e discussão	17
9. Perspectiva critica sobre os processos de trabalho da unidade de estágio ..	19
10. Conclusões	20
11. Recomendações:	20
12. Bibliografia	22
Anexo	25

1. Apresentação e caracterização do local de estágio

O trabalho de estágio foi realizado no Laboratório de Biologia Parasitária (LBP) do Departamento de Parasitologia de Sangue (DPS) do Instituto Nacional de Saúde (INS), localizado no edifício do Ministério da Saúde (MISAU), avenida Eduardo Mondlane nº 1008, CP 264 na cidade de Maputo.

O INS encontra-se estruturado da seguinte maneira: Conselho de Administração; Direcção-Geral; Departamentos centrais; Centros de investigação; Unidades de pesquisa e Laboratórios especializados.

O INS contém 4 departamentos, nomeadamente: Imunologia, Medicina Tradicional e Estudo de Plantas Medicinais, de Parasitologia Intestinal e Visceral, e de Parasitologia de Sangue. Para uma boa coordenação nas suas actividades o DPS encontra-se organizado em 4 laboratórios: LBP, Biologia Molecular, Microscopia e Entomologia (vide o esquema a baixo).



Esquema 1. Organograma da unidade de estágio.

Nos quatro laboratórios do DPS são desenvolvidas várias actividades como:

1. **Biologia molecular** – pesquisas moleculares (extração de DNA) usando técnica de PCR.
2. **Entomologia** – subdividido em duas secções: Insectário – onde se estabelece o cultivo contínuo do vector da malária *Anopheles arabiensis*, com finalidade de desenvolver pesquisa como, papel vectorial, aspectos morfológicos, resistência a insecticidas; e o “verdadeiro” laboratório de entomologia - onde se efectuam dissecações de mosquitos para bioensaios, e testes de resistência a insecticidas.
3. **Microscopia** – é o laboratório de referência do controlo de qualidade.
4. **Biologia parasitária** – realiza-se o cultivo contínuo *in vitro* de *P.falciparum* e testes de sensibilidade do parasita a antimaláricos *in vitro*.

1.1. Breve historial do local de estágio

Face as transformações em curso no país decorrentes das reformas do sector público e havendo necessidades de imprimir uma nova dinâmica no sector de saúde, existiu a necessidade eminente de se formar o INS (diploma ministerial nº 89/2004 citado no Boletim da Republica 2004).

O INS é uma instituição de pesquisa técnico-científica subordinada ao MISAU com missão de promover e efectuar a investigação em saúde com base nas prioridades definidas pela agenda nacional de pesquisa; incentivar a investigação em sistemas de saúde como instrumento para a definição da política de saúde; garantir a investigação científica multisectorial e disciplinar, através das instituições de investigação afins e outros órgãos de conhecida competência técnica (Boletim da Republica 2004).

O LBP foi criado entre 1986 e 1987 com objectivos de investigar o problema da resistência do *P.falciparum* a drogas antimaláricas (Evelina, comunicação pessoal).

2. Programa do estágio

O programa de estágio preestabelecido, dividiu-se em duas fases:

- Junho a Agosto de 2007 – consistiu na adaptação aos processos de trabalho da unidade de estágio, pesquisa bibliográfica e a elaboração do protocolo de estágio.
- Agosto a Novembro – no qual foram realizadas várias actividades tais como, preparação de meios de cultura; colheita de amostras de sangue positivas a *P.falciparum* no laboratório de Banco de Socorros e Pediatria do Hospital Central de Maputo (HCM); e de urgências do Hospital Geral de Mavalane; preparação de esfregaço e entendimento, leitura de laminas e o posterior estabelecimento do *P.falciparum* em cultivo *in vitro*.

No total, o estágio teve a duração de 650 horas úteis, este tempo foi suficiente para o alcance dos objectivos traçados.

3. O apoio concedido ao estudante por parte da unidade de estágio

Para a realização deste trabalho, o estudante contou com a disponibilidade imediata do corpo técnico da unidade de estágio, disponibilidade de material (manuais e artigos) especializados para a compreensão e realização do trabalho.

4. Revisão bibliográfica

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do género *Plasmodium*, da família Plasmodiidae, ordem Apicomplexa (Sio *et al.* 2006). É transmitida ao homem, pela picada, de fêmea de mosquito do género *Anopheles* infectado e acidentalmente por transfusão sanguínea, via transplacentária ou transplante de órgãos (W.H.O, 2007).

Existem cerca de 156 espécies do género *Plasmodium* (Bruce-Chwatt, 1985 citado por Leoratt, 2004), das quais quatro provocam malária ao homem, nomeadamente: *P.malariae* descrito por Laveran em 1881, *P. vivax* por Grassi e Feletti em 1890, *P.falciparum* por Welch em 1897 e *P.ovale* por Stephen em 1922 (Enosse, 2004). O *P.falciparum* é a principal causa da morbidade e mortalidade por malária a nível mundial (Enosse, 2004).

4.1 Ciclo de vida de *Plasmodium* sp

O ciclo de vida do *Plasmodium* sp é complexo e compreende duas fases: uma sexual (esporogonia) que ocorre no mosquito e outra assexual (esquizogonia) nos humanos (vide figura 1)

Nos humanos o ciclo começa quando um mosquito infectado pica o homem para sugar o sangue, e injecta esporozoítos (cerca de 10 esporozóitos para causar infecção) contidos na sua saliva. Em cerca de meia hora os esporozoítos alcançam o fígado e invadem as suas células (células hepáticas), onde se desenvolvem e se transformam em esquizontes hepáticos, produzindo milhares de merozoítos. Os merozoítos quando maduros são libertos na corrente sanguínea e em menos de 5 minutos invadem os eritrócitos, transformando-se em trofozoítos. No caso de *P.vivax* e *P.ovale* alguns esporozoítos não se desenvolvem podendo formar um estágio dormente, chamado hipnozoito, que pode permanecer no fígado por semanas a anos, e quando reativado provoca recidivas da doença (Leoratt, 2004). No interior dos eritrócitos os trofozoítos alimentam-se de hemoglobina, permitindo assim o desenvolvimento dos trofozoítos em várias formas (anel, trofozoítos jovens, trofozoítos maduros) para formar esquizontes que quando maduros rompem-se e libertam de 8 – 16 merozoítos; estes por sua vez invadem novos eritrócitos dando início a um novo ciclo. O ciclo esquizogônico leva cerca de 48 horas para o *P. falciparum*. Se a parasitémia alcançar uma densidade elevada seguir-se-ão numerosos ciclos eritrócíticos que podem causar sintomas inespecíficos como: febre, dores de cabeça, fadiga, desconforto abdominal e muscular, dores nas articulações, calafrios, transpiração, anorexia, mal-estar dependendo do grau de imunidade adquirida do hospedeiro (Rey, 1983; Enosse, 2004; WHO, 2006, Happi *et al.*, 2004). O intervalo de tempo entre a infecção e o aparecimento dos sinais clínicos estima-se ser de 8 – 15 dias para o *P.falciparum* (Warrel, 2002 citado por Enosse, 2004).

Depois de vários ciclos da esquizogonia eritrócítica uma pequena proporção de merozoítos diferencia-se nos eritrócitos em gametócitos masculinos e femininos. Estes ao serem ingeridos por fêmeas de mosquitos *Anopheles* se transformam em gametas que após a fertilização resultam em zigoto (em menos de uma hora), que por sua vez se desenvolvem num estágio móvel chamado oocinete. O oocinete atravessa duas barreiras, a matriz peritrópica e o epitélio do estômago para a formação de oocisto, que passam por um

Anualmente a malária mata mais de 1 milhão da população, sendo na sua maioria crianças com idade inferior a 5 anos e mulheres grávidas (Wongsrichanalai *et al.*, 2002 citado por Cravo & Rosário, 2002).

A malária é endêmica em todo território moçambicano, nas áreas onde o clima favorece a sua transmissão ao longo de todo o ano, atingindo o seu ponto mais alto após a época chuvosa (Dezembro a Abril) (Roll Back Malaria, 2005; PNCM, 2006).

Em Moçambique, a malária é a principal causa de problemas de saúde, sendo responsável por 40% de todas as consultas externas. Até 60% de doentes internados nas enfermarias de pediatria são admitidos como resultado da malária severa. A malária é também a principal causa de mortalidade nos hospitais em Moçambique, ou seja de quase 30% de todos os óbitos registados. A estimativa de prevalência no grupo etário de 2 a 9 anos de idade varia de 40 a 80%, com 90% de crianças menores de 5 anos de idade infectadas por parasitas da malária em algumas áreas (Saúte *et al.*, 2003; PNCM, 2006).

O *P. falciparum* é o parasita mais frequente em moçambique, sendo responsável por cerca de 90% de todas infecções maláricas, enquanto que o *P. malariae* e *P. ovale* é responsável por 9,1 e 0,9% respectivamente (Tiago e Saúte, 2005, Roll Back Malaria, 2005; PNCM, 2006).

A elevada patogenicidade do *P. falciparum* esta relacionada com vários factores como: curto período de incubação (6 a 10 dias), a capacidade de infectar eritrócitos jovens e maduras, diversidade genética e a ocorrência de esquizogonia nos vasos capilares profundos de alguns órgãos como: cérebro, baço, intestinos, coração, fígado, pulmões, placenta (Glenister *et al.*, 2002).

Em muitos países de África onde a malária é endêmica, incluindo Moçambique, o esforço para o controle da malária tem sido principalmente ao uso de insecticidas e tratamento de pacientes sintomáticos com antimaláricos. Mas, nos últimos anos a situação da malária tem sido bastante alarmante por causa de: ineficácia do sistema de controlo vectorial e resistência do vector a insecticidas e a resistência do parasita aos antimaláricos disponíveis no país (Hastings e D'Alessandro, 2000 citado por Enosse, 2004).

Para o tratamento da malária, Moçambique tem usado três linhas de tratamento nomeadamente: a combinação de Sulfodoxina-pirimetamina + Artesunato, Artemeter + Lumefantrina e Quinino como primeira, segunda e terceira linha respectivamente (Tiago e

Saúde, 2005). Mas, com o surgimento de estirpes de *P.falciparum* resistente a algumas destas drogas (exemplo Sulfadoxina-pirimetamina) faz com que se efectuem estudos *in vivo* e *in vitro* (Hastings e D'Alessandro, 2000 citado por Enosse, 2004, Basco, 2004).

Então o LBP dedica-se ao cultivo *in vitro* de *P.falciparum* para a realização de estudos de sensibilidade deste parasita aos antimaláricos disponíveis no país.

As culturas *in vitro* de *Plasmodium* também têm sido aplicadas na quimioterapia, imunologia, genética, gametocitogeneses, biologia celular e molecular e a bioquímica dos parasitas em relação aos eritrócitos do hospedeiro (Trager e Jensen, 1997).

5. Objectivos

5.1 Objectivo Geral:

- Adquirir habilidades, conhecimentos teóricos e práticos das técnicas de culturas *in vitro* de *P.falciparum* desenvolvidas no LBP do DPS do INS.

5.2 Objectivos específicos:

- Conhecer e saber executar as técnicas de cultura *in vitro* de *P.falciparum*;
- Saber Determinar a parasitémia e caracterizar os diferentes estágios de desenvolvimento de *P.falciparum* nas culturas;
- Compreender e saber interpretar os resultados obtidos na cultura *in vitro* de *P.falciparum*.

6. Actividades desenvolvidas durante o período do estágio

Durante o período de estágio foram desenvolvidas as seguintes actividades: preparação de material laboratorial; preparação de volumes de meios de cultura (RPMI 1640) e sua conservação; colheita de amostras positivas de *P.falciparum* e sua posterior inoculação. Cada amostra era previamente avaliada, antes da sua inoculação, quanto à espécie e parasitémia.

7. Material e Métodos

7.1. Material

7.1.1 Equipamento

- Fluxo laminar
- Centrifugadora
- Estufa (37 °C)
- Banho-Maria
- Geleira
- Excicador de vidro (Candle jar)

7.1.2 Reagentes

- Sangue humano parasitado
- Eritrócitos do grupo O⁺
- Soro humano do grupo AB, A, B e O Rh +
- Meio RPMI 1640
- AlbumaxII
- HEPES
- Gentamicina
- Sorbitol
- Hipoxantina
- NaHCO₃
- Hipoclorito de sódio
- Água bidestilada
- Álcool (70%)
- HCl
- NaOH
- Metanol
- Giemsa
- Óleo de imersão

7.1.3 Material acessório

- Pipetas de Pasteur
- Micropipetas
- Ponta de pipetas
- Tubos de Falcom (15 e 50 ml)
- Placas de Petri estéreis
- Balões volumétrico de 1 L
- Copos de 200 ml
- Provetas
- Tubos vacuntiner
- Filtros milípores de 0,22 μ m
- Microscópio óptico
- Laminas
- pHmetro
- Luvas
- Gaze cirúrgico
- Lamparina
- Algodão
- Pêra de Borracha
- Velas
- Fósforo
- Bandejas
- Papel de filtro
- Agitador magneto
- Espátulas
- Tesoura
- Marcador
- Colman
- Balança eléctrica
- Agitador

7.2 Metodologia

7.2.1 Preparação de meio de cultura

7.2.1.1 Meio de Cultura Incompleto (MCI)

- Mede-se cerca de 900 ml de água bidestilada num balão volumétrico de 1 L;
- Pesa-se 10.43 g de RPMI 1640; 6 g ou 25 ml a 1 de HEPES; e 50 mg de Hipoxantina;
- Adiciona-se 0.5 ml de gentamicina (50 mg/ ml);
- Perfaz-se o volume até 1L com água bidestilada;
- Dissolve-se o soluto usando agitador magneto;
- Esteriliza-se a solução por filtração usando filtros milíporos de 0.22 μm ;
- Distribui-se o meio em frascos com tampa de rosca de 100 ml de capacidade ou tubos de falcon estéreis de 50 ml;
- Conservar na geleira a 4 °C até ao momento do uso. Este meio poderá ser usado até 4 -5 semanas.

7.2.1.2 Meio de Cultura Completo (MCC)

- Adiciona-se ao MCI, 4.2 ml de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 5 % por cada frasco de 100 ml. Desta forma obtém-se o MCC sem soro. Este meio poderá ser usado dentro de 10 dias.

Se o NaHCO_3 for fresco, conterà uma quantidade considerável de CO_2 , o que fará com que após a adição deste meio, haja mudança de cor: de amarelo para laranja.

7.2.1.3 MCC alternativo

i) MCC + Soro

- Pesa-se 10.43 g de RPMI 1640;
- Pesa-se 6 g ou 25 ml de HEPES;
- Pesa-se 2 g de NaHCO_3 ;
- Adicionar 0.5 ml de gentamicina (50 mg/ ml);
- Adiciona-se água bidestilada até perfazer 1L conserva-se em alíquotas de 45 ml;
- Suplementa-se 5 ml soro humano do grupo AB ou A, B, O inativado em banho-maria a 56 °C por 60 minutos a cada tubo. O soro AB⁺ é o mais preferindo;

- Estabiliza-se o pH para 7,2 – 7,4. Adicionam-se umas gotas de solução de HCl ou NaCl de modo a se obter este intervalo;
- Filtra-se o MCC + soro com filtros milíporos de 0.22 µm;

O meio de cultura completo com soro ser usado por uma semana se conservado a 4 °C.

ii) MCC + Albumax

Pesa-se 10 g de Albumax e adiciona-se aos reagentes usados na preparação de MCI e MCC. Neste meio não se adiciona soro humano.

7.2.2 Colheita de amostras (*P.falciparum*)

- Informa-se ao paciente que será necessário uma amostra de sangue para cultura *in vitro* de *P.falciparum* e colhe-se duas gotas de sangue por punção capilar;
- Prepara-se lâmina por esfregaço (gota estendida e espessa), cora-se com Giemsa (vide 6.2.3.1 iii) e observa-se ao microscópio óptico com auxílio de óleo de imersão. Se o resultado microscópico for positivo a malária e apresentar uma parasitemia superior ou igual a três cruzes (vide tabela 1 em anexo), então consente-se para colher cerca de 3 ml por punção venosa; também lhe é pedida urina para teste de detecção de antimaláricos (Saker-Solomons) (ver 7.2.2.1);
- Pede-se ao paciente para estar numa posição cómoda, deitado ou sentado, nunca em pé;
- Coloca-se a garrote alguns centímetros acima do cotovelo e pede-se para abrir e fechar a mão várias vezes para favorecer a dilatação das veias;
- Palpa-se as veias e identifica-se o lugar da punção;
- Desinfecta-se a área com algodão embebido no álcool etílico a 70% e deixa-se secar;
- Testa-se a seringa e a agulha por método de aspiração e expiração, de modo a comprovar se o êmbolo não fica aderido;
- Coloca-se a agulha sobre a veia, um pouco de lado, com o bisel orientado para cima e introduz-se a agulha sem receios seguindo a direcção da própria veia;
- Puxa-se o êmbolo para trás lentamente, a seringa começa a se encher de sangue até a quantidade necessária (3 - 5ml);

- Pede-se ao paciente para abrir a mão, relaxar e tira-se a garrote;
- Põe-se um pedaço de algodão limpo e seco no lugar da punção, e retira-se a agulha;
- Pede-se ao paciente para manter o algodão alguns minutos até parar de sangrar;
- Tira-se a agulha e deita-se num recipiente contendo hipoclorito de sódio;
- Deita-se o sangue num tubo vacutiner contendo anticoagulante (CPD), deixando-o escorrer lentamente pelas paredes para não provocar hemólise;
- Identifica-se a amostra com um marcador e mexe-se o conteúdo várias vezes para evitar a coagulação;
- Introduce-se num colmam sem gelo e transporta-se imediatamente ao laboratório (tempo não superior a duas horas);
- Regista-se a amostra e outros dados relevantes no livro de entrada de amostras (vide em anexo).

7.2.2.1 Teste de urina para a detecção de antimalárico (Saker-Solmons)

- Explica-se ao paciente como usar o frasco;
- Rotula-se o frasco;
- Pede-se que o paciente introduza dentro do frasco (5 a 10 ml);
- Recolhe-se a amostra para o teste;
- Pipeta-se 1 ml de tampão fosfato a pH 8,0 para um tubo de falcom de 15 ml;
- Adiciona-se 0,2 ml de TBPEE;
- Dilui-se na solução 2 ml de urina a ser testada;
- Tapa-se o tubo e agita-se vigorosamente cerca de 15 segundos;
- Deixa-se repousar durante 15 minutos até a formação de duas fases;
- Procede-se a leitura dos resultados.

Resultados esperados:

É positivo - se tiver uma cor vermelha púrpura;

É negativo - se tiver uma cor amarela esverdeada.

Nota: o teste é valido para as seguintes drogas: Cloroquina, Quinina, Mefloquina Pirimetamina e Proguanil.

7.2.3 Princípio da cultura *in vitro* de *P. falciparum*

O cultivo *in vitro* do *P.falciparum* segundo a técnica descrita por Trager & Jensen (1976) consiste no estabelecimento e manutenção do parasita em condições favoráveis a sua sobrevivência: meio de cultura RPMI 1640, suspensão de eritrócitos O⁺ a 37°C, em condições de esterilidade, a uma atmosfera ótima.

7.2.3.1 Procedimento

i) Inoculação

- ✓ Abrem-se placas de Petri estéreis de 50 ml de volume, no fluxo laminar, e com um marcador de ponta fina marca-se a cada placa segundo o tipo de soro suplementado no MCC;
- ✓ Pipeta-se, com pipetas de vidro de Pasteur estéreis, 10 ml de MCC + soro ou Albumax as respectivas placas. O meio deve ser previamente aquecido durante 10 – 15 minutos;
- ✓ Pipeta-se eritrócitos do grupo O⁺ numa proporção de 5%, previamente lavados (duas vezes) com MCI;
- ✓ Adiciona-se parasitas na densidade apropriada (não superior a 1%, preferivelmente 0,1 – 0.5% se pretender obter dois ciclos até a realização da subcultura seguinte, ou entre 0,5 – 1% para um ciclo).
- ✓ Agita-se lenta e cuidadosamente, de modo a espalhar os parasitas.
- ✓ Leva-se as placas ao excicador (candle jar) com velas acesas, tapa-se e espera-se que as velas se apaguem, de modo a que a atmosfera interior seja cerca de 2-3% de O₂ e 3-6% de CO₂, e restante para Nitrogénio;
- ✓ Transfere-se o excicador para a estufa a 37 °C.

Passado 24 horas faz-se a mudança dos respectivos meios de cultura e a leitura de lâminas.

ii) Mudança de meio

- ✓ Introduz-se 10 ml de MCC + soro ou Albumax em tubos de falcom de 15 ml e aquece-se em banho-maria a 37 °C durante aproximadamente 15 minutos;
- ✓ Retira-se as placas ao fluxo laminar;
- ✓ Com uma pipeta de Pasteur de vidro estéril, aspira-se o meio de cultura antigo sem remover os eritrócitos para um recipiente contendo hipoclorito de sódio;
- ✓ Pipeta-se o meio cultura novo para as respectivas placas e agita-se suavemente;
- ✓ Deita-se duas gotas de sangue na lâmina para a observação microscópica e devolve-se ao excicador com velas acesas e posteriormente a estufa a 37 °C;
- ✓ Faz-se o esfregaço (gota espessa e estendido), fixa-se e cora-se com Giemsa (vide em 7.2.3.1 iii);
- ✓ Faz-se a caracterização das culturas (identificação dos estágios presentes, caracterização biológica, densidade) com objectiva de 100x e óleo de imersão;
- ✓ Regista-se os resultados no livro de controle de amostras inoculadas.

iii) Preparação de lâminas

- Deita-se duas gotas de sangue (uma para a gota espessa e outra para a estendida);
- Espalha-se o sangue com o canto de uma outra lâmina limpa, dando o formato de um rectângulo ou círculo de, aproximadamente, 1 cm;
- Para a gota estendida coloca-se o bordo de uma outra lamina um pouco a frente da gota de sangue, recua-se a lamina até tocar na gota de sangue, deixa-se o sangue correr ao longo de todo o bordo da lâmina e desloca-se para a frente de modo a espalhar o sangue ao longo de toda a lamina, num movimento firme mais não rápido demais. Depois do uso, deita-se (a lâmina usada para espalhar) no hipoclorito de sódio;
- Marca-se com um marcador de ponta fina, o nome do laboratório, instituição, n° da amostra e a data, na extremidade próxima a gota espessa;
- Deixa-se secar ao ar ou na estufa a 37 °C durante 15 minutos;

- Fixa-se mergulhando rápida e cuidadosamente a parte da lâmina que tem o esfregaço com álcool (etílico ou metílico) absoluto (98 – 100%) evitando tocar a gota espessa;
- Coloca-se na prancha de drenagem com a gota espessa para cima de modo que o álcool não possa escorregar sobre ela e deixa-se secar;
- Mete-se, as laminas secas, uma a uma numa caixa de coloração. Coloca-se todas com sangue no mesmo lado;
- Enche-se a caixa com solução de Giemsa e deixa-se ficar durante aproximadamente 20 minutos. O enchimento da caixa é feito lenta e cuidadosamente de modo a cobrir completamente as laminas e evita-se o deslizamento da gota espessa;
- Retira-se o Giemsa a um copo e deita-se num frasco e posteriormente é conservado a 2 – 8 0C;
- Deita-se na caixa água limpa muito lentamente de modo a retirar a camada superficial, que contém um precipitado, que poderá impedir a observação das lâminas;
- Despeja-se lentamente a água de lavagem;
- Retira-se as lâminas, uma a uma, e coloca-se na prancha de secagem;
- Após a secagem colocam-se as lâminas numa “bandeja” e deita-se óleo de emersão;
- Coloca-se ao microscópio óptico e faz-se a contagem e caracterização dos parasitas;

Para a determinação da parasitémia (em percentagem), calculou-se usando a seguinte formula:

$$P (\%) = E_0 / E * 100$$

Onde: P - parasitémia

E_0 – n^o de eritrócitos infectados

E – total de eritrócitos

8. Resultados e discussão

Durante o período de estágio foram colhidas 10 amostras, das quais 7 foram inoculadas porque apresentaram uma parasitemia adequada e as restantes foram descartadas. Cada uma das 7 amostras era inoculada em condições de cultura completamente: MCC suplementado a Albumax, os outros 4 com tipo de soro (AB, A, B e O).

Os resultados verificados por cada amostra nas diferentes condições são apresentados a seguir, em forma de tabelas.

Tabela 1. Parasitemia de *P.falciparum* em MCC com soro AB e Albumax

Tipo de Soro (032)	Parasitemia (%)				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
AB	0.5	NSE	NSE	NSE	NSE
Albumax	1.5	1.3	NSE	NSE	NSE

No MCC com soro do tipo AB a parasitemia alcançada foi de 0.5% tendo sobrevivido cerca de 24 horas, enquanto que, no MCC suplementado com Albumax teve 1.5% e 1.5 % por cerca de 24 e 48 horas respectivamente, não tendo se encontrado nos restantes dias.

Tabela 2. Parasitemia de *P.falciparum* no MCC com soro AB, A, B e O, e Albumax.

Tipo de Soro (034)	Parasitemia (%)				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
AB	0.5	NSE	NSE	NSE	NSE
A	0.1	0.06	NSE	NSE	NSE
B	0.25	NSE	NSE	NSE	NSE
O	0.05	0.03	0.01	NSE	NSE
Albumax	0,1	0.08	0.02	0.01	NSE

Os soros AB e B ofereceram uma parasitemia de 0.5% e 0.25% respectivamente num período de 24 horas. O Albumax ofereceu uma de parasitemia decrescente: 0.1%, 0.08%, 0.02, 0.01%.

Tabela 3. Parasitemia de *P.falciparum* nos soros A, B e O e, em Albumax recente (I) e antigo (II)

Tipo de Soro (037)	Parasitemia (%)					
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
A	0.3	0.1	0.04	0.8	NSE	NSE
B	0.28	0.16	0.04	NSE	NSE	NSE
O	0.3	0.61	0.075	NSE	NSE	NSE
Albumax novo	0.7	1.1	0.3	0.14	0.04	0.15
Albumax antigo	0.82	0.4	0.08	0.06	0.05	NSE

Nesta experiência em consistiu em comparar o MCC suplementado a Albumax recentemente preparado e Albumax antigo obteve-se parasitemia máxima de 1.1 % e 0.82 % respectivamente.

Tabela 4. Parasitemia de *P.falciparum* no MCC adicionado a Albumax.

Amostra	Parasitemia (%)						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
038	1.8	1.1	2.3	1.95	1.18	0.26	0.23
039	1.04	2.1	2.9	3.21	NSE	NSE	NSE
040	1.12	1.08	0.74	0.43	0.93	0.16	0.2
041	2.2	5.4	2.73	1.3	0.5	0.06	0.15

Amostras diferentes de *P.falciparum* foram submetidas a iguais condições de cultura, tendo se verificado parasitemia máxima de 2.3%, 3.21%, 1.12% e 5.4% para amostra 038, 039, 040 e 041 respectivamente.

O presente trabalho constatou que as amostras de *P.falciparum* inoculadas em MCC com soro AB ofereceram uma baixa parasitémia (0.5%) e menor tempo de sobrevivência do *P.falciparum*.

O menor tempo de sobrevivência e baixa parasitémia do *P.falciparum* no meio de cultura com soro AB, provavelmente estar relacionado a presença de factores imunológicos no soro. Uma vez que, este grupo sanguíneo encontra-se em menor frequência no país, aumentando a probabilidade de se ter usado soro AB altamente imune a malária.

A baixa parasitémia e a não sobrevivência dos parasitas nos A, B e O poderá estar relacionado a factores como: incompatibilidade dos eritrócitos e presença de anticorpos no soro (basco, 2004; Hurd *et al.*, 2003)

Os baixos resultados obtidos das culturas poderão estar relacionada também a factores como: a demora das amostras desde a colheita até a inoculação, a não realização de teste de urina para a detecção de antimaláricos nalgumas amostras, a técnica de preparação das lâminas e má leitura das lâminas.

9. Perspectiva critica sobre os processos de trabalho da unidade de estágio

No que concerne aos processos de trabalho do LBP, a que referir o não total cumprimento normas internacionais. Uma vez que, constatou-se algumas irregularidades como o uso de amostras colhidas acima do tempo aceitável, inoculação de algumas amostras sem a realização previa do teste de detecção de antimaláricos e não realização de testes de confirmação da não imunidade dos soros.

Em relação a biossegurança, constatou-se que o LBP não dispõe de algum material e equipamentos que garante a segurança do seu pessoal, como por exemplo tocas e extintores de gás respectivamente o que periga a saúde dos técnicos.

Durante o período de estágio, verificou-se falta de meio RPMI durante um mês devido a demora na compra do mesmo, o que causa retardamento nas investigações do *P.falciparum*. A demora deve-se, em muitos casos, ao facto das instituições que onde se efectua a compra demorarem em fazer chegar ao destinatário.

10. Conclusões

A variante estágio como trabalho de culminação de curso de ciências biológicas, é de grande relevância uma vez que este incute no estudante uma nova dinâmica no processo de aprendizagem, permitindo que o mesmo consolide e alie os conhecimentos teóricos adquiridos durante a formação aos conhecimentos práticos. Desta forma, o estudante pode analisar as diferentes circunstâncias negativas da sociedade e através do sinergismo (teórico-prática) desenvolver estratégias no sentido de resolvê-las. O mesmo abre uma visão crítica no estudante, oferecendo conhecimentos sobre a deontologia profissional, capacidade de trabalhar em equipa e individualmente, criatividade, responsabilidade e maturidade profissional.

Concluiu-se que os resultados insatisfatórios constatados deveram-se a factores como: a demora das amostra (desde a colheita até a inoculação), a não realização de testes para confirmação da não imunidade do soro, e nalgumas vezes a inoculação de amostras de *P.falciparum* de pacientes que não cederam urina para o teste de detecção de antimaláricos e a técnica de preparação e leitura das lâminas.

Os objectivos traçados para o estágio foram alcançados, uma vez que, no fim do período de estágio o estudante adquiriu conhecimentos práticos e desenvolveu habilidades na técnica de cultivo *in vitro* de *P.falciparum* aplicadas no LBP.

11. Recomendações

No que concerne aos reagentes, recomenda-se aos responsáveis do LBP que faça uma melhor gestão dos reagentes de modo a evitar que haja rotura de stock, o que faz com que as investigações retardem.

Pelo facto dos resultados das culturas serem influenciados por vários factores, recomenda-se que se melhore o procedimento tanto de colheita de amostra de sangue positivo a *P.falciparum*, para que não se inocule amostras de pacientes que primeiro se tenha realizado o teste de detecção de antimaláricos e que se façam testes para a confirmação da não imunidade do soro, para permitir que haja uma melhor discussão em caso de insucesso das culturas.

Recomenda-se ao laboratório que melhore o nível de biossegurança dos seus funcionários, fornecendo tocas, extintor de gás e material de primeiros socorros.

Recomenda-se a direcção do INS para aumentar o pessoal técnico especializado, de modo que, se possa trabalhar em turnos, por que o processo de trabalho é longo e cansativo, isto faz com que os técnicos trabalhem a correrias o que pode influenciar negativamente nos resultados, exemplo a má leitura das laminas.

12. Bibliografia

Basco, L. K. (2004). Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. Xx. Experimental studies on various factors of *in vitro* drug sensitivity assays using fresh isolates of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70(5): 474-480pp.

Boletim da republica (2004). Estatuto Orgânico do Instituto Nacional de Saúde. Série I. Número 19. Maputo.

Cravo, P. & V. E. do Rosário (2002). Aspectos de genética molecular da resistência aos fármacos antimaláricos. *Bio-medicina e Saúde Publica*. 8pp. Lisboa.

Enosse, S. M (2004). Antimalarial drug resistance in southern Mozambique: treatment efficacy and molecular characterization of the *Plasmodium falciparum* resistance to sulfadoxine-pyrimethamine. *Danish Bilharziasis Laboratory*. Denmark.

Glenister, F. K.; R. L. Coppel, A. F. Cowman, N. Mohandas e B. M. Cooke (2002). Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood*. Vol. 99 (3): 1060-1063pp.

Happi, C. T; G. O. Gbotosho, A. Sowunmi; C. O. Falade; D. O. Akinboye; L. Gerena; D. E. Kyle; W. Milhous; D E. F. Wirth; e A. M. J. Oduola (2004). Molecular analysis of *Plasmodium falciparum* recrudescence malaria infections in children treated with chloroquine in Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70 (1) 20-26pp.

Hurd, H; E. Al-Olayan, G. Butcher (2003). In vitro methods for culturing vertebrate and mosquito stages of *Plasmodium*. *Microbes and infections*. 5: 321-327pp.

Leoratt, F.M.S., (2004). Resposta imune humoral na malária humana: qualidade e quantidade de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum*. Dissertação de Pós graduação. 165pp. São Paulo.

Muatinte, B.L. (2006). Manual de Introdução a Entomologia Médica. 1ª edição. Curso de Biologia -UEM. Maputo.

Mzilahowa, T., P. J. McCall e I. M. Hastings (2007). "Sexual" Population Structure and Genetics of the Malaria Agent *P. falciparum*. PLoS ONE 2(7):1-8pp.

Orjih, A. U. (2005). Comparison of *Plasmodium falciparum* growth in sickle cells in low oxygen environment and candle-jar. *Acta Tropica*. 94: 25-34pp.

PNCM (2006). Documento estratégico para o controlo da malária em Moçambique. Direcção Nacional de Saúde. MISAU.

Rey, L. (1992). Bases de Parasitologia Médica. Guanabara Koogan. 2ª Edição. 106-125pp. Rio de Janeiro. Brasil.

Roll Back Malaria (2005). Monitoring and Evaluation Mozambique. Page1 of 5.

Saute, F., J. Aponte, J. Almeida, C. Ascasa, R. Abellana, Vaz, M. C. Dgedge e P. Alonso (2003). Malaria in Southern of Mozambique: malariometric indicators and malaria case definition in Manhiça Distrit. *Transition of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. nº 97. 661-666pp.

Sio, S. W. S., W. Sun, S. Kumar, W. Z. Bin, S. Tan, S. H. Ong, H. Kikuchi, Y. Oshima, K. S.W. Tan (2006). MalariaCount: An image analysis-based program for the accurate determination of parasitemia. *Journal of Microbiological Methods*. 68:11-18pp.

Soares, I. (2005). Malária. *Parasitologia Médica*. FCS. USP. Brasil.

Tiago, A. e F. Saute (2005). Normas de manejo de casos de malária em Moçambique. PNCM. Moçambique.

Trager, W e J. B. Jensen (1997). Continuous Culture of *Plasmodium falciparum*: its Impacts on Malaria Research. *Internactional Journal for Parasitology*. Volume. 27 (9): 989-1006pp.

WHO (2005). Global malaria situation. Data availability and sources.

___ (2006). Guidelines for the treatment of malaria. *Library Cataloguing-in-Publication Data*. 253pp.

___ (2007). Malaria in Africa. *World Health Organization*. Retirado do http://rbm.who.int/cmc_upload/0/000/015/370/RBMInfosheet.

Anexo

Tabela 1. Resultado do diagnóstico de malária

Símbolo	Significado
NSE	0 Parasitas em 100 campos
1+ ou +	1-10 Parasitas em 100 campos
2+ ou ++	10-100 Parasitas em 100 campos
3+ ou +++	1-10 Parasitas por campo
4+ ou ++++	10-100 Parasitas por campo
5+ ou +++++	100 Parasitas por campo

Folha de registos de dados de amostra

1. Participante n^o: _____
2. Data: ___/___/___
3. Local de Colheita: _____
4. Residência: _____
5. Última vez em que esteve de malária: Data: ___/___/___; semana ____; meses ____
6. Tratamento (medicamento que tomou): _____
7. Teste de urina: Saker-Solmons __ Lignina__ urina não colhida ____
8. Aceitar amostra ____ rejeitar ____
9. Espécie de *Plasmodium* identificada _____
10. Densidade parasitária : ____ (%)
11. Hora de inoculação _____