

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VÁRZEA GRANDE – UNIVAG  
BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

**AVALIAÇÃO DA CONFIABILIDADE DAS METODOLOGIAS DE  
ESTIMAÇÃO DA PARASITEMIA DO *PLASMODIUM SP***

**Lucas José da Silva**

**Orientador: Prof. Ms. Eduardo Rodrigues Alves Junior**

Várzea Grande  
2017

# AValiação DA CONFIABILIDADE DAS METODOLOGIAS DE ESTIMAÇÃO DA PARASITEMIA DO *PLASMODIUM SP*

Lucas José da Silva<sup>1,2</sup>; Eduardo Rodrigues Alves Junior<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>: Instituto de Ciências da Saúde, UFMT, Campus Cuiabá, Cuiabá (MT).

<sup>2</sup>: Centro Universitário de Várzea Grande (UNIVAG), Várzea Grande (MT).

## RESUMO

A malária é uma das principais doenças infecciosas do mundo e é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (FORATTINI *et al.*, 1986). O gênero *Plasmodium* está dividido em cinco espécies que podem parasitar o homem, o *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. sendo esta última espécie, originalmente de primatas, tem infectado cada vez mais humanos no continente Asiático, causando doença grave e letal (GLOBAL MALARIA PROGRAMME, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WHITE, 2008). A estimativa da densidade parasitária por microscopia é prática rotineira no diagnóstico da malária, ela auxilia na definição da gravidade da doença e na avaliação da resposta terapêutica dos pacientes. Além disso, ela ainda representa ferramenta de muita importância no monitoramento da eficácia de velhas e novas drogas antimaláricas, seja em ensaios *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* (FONTES, 2008; GILLES, 1993; MINISTERIO DA SAÚDE, 2009; ROSS E THOMSON, 1910). A microscopia é a metodologia mais utilizada para diagnóstico da malária em todo o mundo, por ser rápida, barata e sensível, porém, a precisão dessa estimativa de parasitemia varia com o método microscópico empregado (WHO, 2013). O propósito deste estudo é avaliar a concordância das metodologias de determinação da parasitemia por microscopia ótica, tendo por referência a determinação obtida pela microscopia de fluorescência utilizando um reagente fluorescente em câmara de Neubauer (bis – benzimida da Hoechs); Essa padronização tem como objetivo principal mostrar um diagnóstico mais confiável para quantificar o *Plasmodium sp*. Os valores das médias de parasito na metodologia por campo foi de 11781/μL, metodologia por leucócitos foram 20.749/μL; e metodologia por hemácias 31.490 parasitos/μL, metodologia padronizada por fluorescência 19.000 parasitos/μL. O método padronizado de quantificação da parasitemia em câmara de Neubauer mostrou maior semelhança com o método de quantificação por leucócitos. Após aumento do número de amostras, poderemos inferir com análise estatística sobre a concordância entre as metodologias preconizadas pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial de Saúde.

Palavras-chave: Malária, fluoroforo, gravidade, Padronização.

## 1. INTRODUÇÃO

A malária é uma das principais doenças infecciosas do mundo e é causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida pela picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* (FORATTINI *et al.*, 1986). O gênero *Plasmodium* está dividido em cinco espécies que podem parasitar o homem, o *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Essa última espécie, originalmente de primatas, tem infectado cada vez mais humanos no continente Asiático, causando doença grave e letal (GLOBAL MALARIA PROGRAME, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WHITE, 2008).

Aproximadamente 40% da população mundial está sobre o risco de contrair malária, em 2010 foram registrados 216 milhões de casos em todo o mundo, com 660.000 mil óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). No Brasil, apesar da evidente redução de óbitos por malária, ao longo dos últimos 12 anos foram registrados uma média de 422.858 casos da doença (GLOBAL MALARIA PROGRAME, 2012). O *P. vivax* é responsável por mais de 85% dos casos notificados e a região Amazônica concentra 99,7% dos casos ocorridos no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A estimativa da densidade parasitária por microscopia é prática rotineira no diagnóstico da malária, ela auxilia na definição da gravidade da doença e na avaliação da resposta terapêutica dos pacientes. Além disso, ela ainda representa ferramenta de muita importância no monitoramento da eficácia de velhas e novas drogas antimaláricas, seja em ensaios *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* (FONTES, 2008; GILLES, 1993; MINISTERIO DA SAÚDE, 2009; ROSS; THOMSON, 1910).

A microscopia é a metodologia mais utilizada para diagnóstico da malária em todo o mundo, por ser rápida, barata e sensível, porém, a precisão dessa estimativa de parasitemia varia com o método microscópico empregado (WHO, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

A densidade parasitária pode ser estimada por três metodologias principais que utilizam esfregaços sanguíneos em lâmina de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Duas destas três metodologias são realizadas por meio do esfregaço espesso de sangue chamado popularmente de gota espessa a outra metodologia é realizada por meio do esfregaço fino de sangue conhecido como distendido delgado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

Para as metodologias de estimação da parasitemia que utilizam o esfregaço espesso, uma se baseia no volume de sangue contado por meio do número de campos observados, este método é chamado método de estimação da parasitemia por campo microscópico. O outro método que utiliza o esfregaço espesso para estimação da densidade parasitária se baseia na relação entre a contagem de parasitos e leucócitos, chamado método de estimação da parasitemia em relação a contagem de leucócitos.

A terceira metodologia que utiliza o esfregaço fino para estimação da parasitemia se baseia na contagem de hemácias infectadas, esta metodologia é chamada de estimação da parasitemia pela proporção de hemácias infectadas. (F LÓPEZ-ANTUÑANO; SCHIMUNIS, 1988; MINISTERIO DA SAÚDE, 2009).

Relatos de variabilidade e falta de concordância entre os resultados obtidos por estas técnicas microscópicas são relatadas já a muitos anos (ALGER, 1999; ALVES-JUNIOR *et al.*, 2014a, 2014b; FONTES, 2008; GILLES, 1993; JEREMIAH; UKO, 2007; MCKENZIE *et al.*, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; O'MEARA *et al.*, 2005; OLLIARO *et al.*, 2011; PRUDHOMME O'MEARA *et al.*, 2006).

Existem outras técnicas para diagnóstico e estimação da densidade parasitária como a reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de proteínas produzidas pelo *Plasmodium* como a proteína 2 rica em histidina (HRPII) e a lactado desidrogenase (pLDH), todas as técnicas citadas são caras e exigem profissional e local especializado para execução, além de serem demoradas, o que não contribui para o atendimento do paciente, portanto são utilizados apenas para fins de pesquisa (CHOTIVANICH; SILAMUT; DAY, 2007; GILLES, 1993; KAMAU *et al.*, 2013; TANGPUKDEE *et al.*, 2009; VERMA *et al.*, 2013).

Recentemente foi padronizada uma metodologia de identificação de malária por fluoróforos para fluorescência fixa e celular viva onde faz com que o núcleo celular brilhe tendo uma ótima resolução do *Plasmodium* sp. Essa técnica necessita de um microscópio de fluorescência onde o fluoróforo se liga ao DNA. Além de ser muito sensível essa técnica elimina muitos interferentes sendo sensível e específica ao mesmo tempo.

A técnica microscópica é a técnica de escolha para diagnóstico da malária em todo o mundo. A microscopia possui três metodologias principais, a metodologia de estimação da parasitemia por campo microscópico, de estimação da parasitemia em relação à contagem de leucócitos e de estimação da parasitemia pela proporção de hemácias infectadas. (Todos

esses processos são derivados do método Romanowky que envolve coloração de Giemsa, Leishman, May – Grunwald – Giemsa etc.).

Inúmeros estudos demonstram que não há concordância entre as parasitemias de um mesmo paciente quando estimado por estes métodos microscópicos.

Diante deste problema, sabendo que a estimação da parasitemia é de fundamental importância para o tratamento, identificação da gravidade da doença e monitoramento de eficácia de drogas é importante estabelecer uma metodologia confiável para que os profissionais da saúde possam orientar melhor os seus pacientes com malária.

Não há nenhum estudo com a mesma proposta publicado nas revistas indexadas ao PUBMED e CAPES de forma que possuímos um estudo inédito e pioneiro.

Com o objetivo de padronizar um método diagnóstico quantitativo da parasitemia do *Plasmodium* sp. por meio da técnica de fluorescência utilizando uma metodologia para a contagem em valores absoluto  $\text{mm}^3$ . O objetivo específico desse trabalho tem como padronizar uma técnica de contagem absoluta para o *Plasmodium* sp. dando uma eficácia maior no diagnóstico dos pacientes com malária aguda.

## **2. METODOLOGIA DA PESQUISA**

O estudo foi realizado com parceria entre a UNIVAG e o Hospital Universitário Júlio Müller/UFMT, onde funciona o atendimento de referência da região metropolitana de Cuiabá para diagnóstico e tratamento da malária.

Este é um estudo descritivo de características laboratoriais da padronização de um método de quantificação da parasitemia por *Plasmodium* sp. por fluorescência e comparação com os métodos preconizados pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde. Foi utilizada uma amostra de paciente que teve o diagnóstico de malária confirmado por exame parasitológico microscópico e do qual foi realizada a avaliação hematológica pelo hemograma para contagem de hemácias e leucócitos/ $\mu\text{L}$

### **2.1. Coleta de sangue**

De um paciente foi colhido dois tubos de sangue contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para realização do hemograma completo e outro para confecção dos esfregaços espesso (gota espessa) e fino e contagem em câmara de Neubauer em microscópio de fluorescência. Com exceção da contagem no microscópio de fluorescência que é o método da padronização do trabalho, a confecção das outras lâminas já

acontecem rotineiramente no atendimento de todos os pacientes com suspeita de malária que demandam o fluxo de pacientes do hospital.

## **2.2 Pesquisa de *Plasmodium* sp. pela microscopia de distendido espesso de sangue**

O distendido espesso foi preparado com uma gota de aproximadamente 10  $\mu\text{L}$  de sangue, a qual é uniformemente distribuída numa área de 1,5  $\text{cm}^2$ , com auxílio de um gabarito ou uma única ponteira.

Para o esfregaço fino, a quantidade de sangue colocado também é de 10  $\mu\text{L}$ , aplicados no canto inferior após a etiqueta, feito isso se apoia à extremidade que contém a gota uma segunda lâmina, com uma inclinação de cerca de 45°, aguarda-se que o sangue por capilaridade se espalhe. Então foi distendido o sangue sobre a primeira lâmina empurrando a segunda lâmina com movimento uniforme mantendo as lâminas em contato de modo que forme uma área franjada na parte final do esfregaço. As lâminas então foram secadas com um secador e, em seguida, coradas com Giemsa de acordo com a técnica descrita por Walker (FONTES, 2008; GILLES, 1993).

A pesquisa dos parasitos foi realizada pelo exame microscópico da lâmina, com aumento de 1000 X, em óleo de imersão, a preparação da lâmina acontece imediatamente após a coleta do sangue.

## **2.3 Hemograma completo**

O hemograma foi realizado pelo laboratório de análises clínicas do UNIVAG no contador automático de células (Sysmex XP300, Kobe/Japan), seguindo as normas de controle interno e externo de qualidade, de acordo com o protocolo do fabricante.

## **2.4 Metodologia de estimação da parasitemia por campo microscópico**

A estimação da parasitemia por este método levou em consideração o volume de sangue observado. Considerando que em 200 campos observados com aumento de 1000 vezes há aproximadamente 0,4  $\mu\text{L}$  de sangue, a parasitemia por  $\mu\text{L}$  de sangue é obtida multiplicando por 2,2 a quantidade de parasitos encontrados em 200 campos microscópicos observados (Dowling, M.A. & Shute).

## **2.5 Metodologia de estimação da parasitemia em relação à contagem de leucócitos**

A estimação da parasitemia por este método foi feita pela relação entre o número de parasitos contados em 200 leucócitos (World Health Organization, 2010).

Este número é relacionado com a quantidade de leucócitos/ $\mu\text{L}$  obtido automaticamente pelo hemograma. Neste método a fórmula para estimar a parasitemia /  $\mu\text{L}$  foi:

*(Leucometria automatizada do paciente x número de parasitos contados por 200 leucócitos)/(200 leucócitos)*

## **2.6 Metodologia de estimação da parasitemia pela proporção de hemácias infectadas**

A estimação da parasitemia por este método foi feita encontrando a proporção de hemácias infectadas em um total de 20000 hemácias contadas (MINISTERIO DA SAÚDE, 2009).

Esta proporção é relacionada com a quantidade de hemácias/ $\mu\text{L}$  obtida automaticamente pelo hemograma. Neste método a fórmula para estimar a parasitemia/ $\mu\text{L}$  foi:

*(Quantidade de hemácias do paciente x número de parasitos contados por 20000 hemácias)*  
*(20000 Hemácias)*

## **2.7 Metodologia de estimação da parasitemia por microscópio de fluorescência em Câmara de Neubauer**

O método apresentado é inédito, não sendo encontrado na literatura nacional nem internacional.

O procedimento parte do princípio que hemácias infectadas quando “coradas” com o fluoróforo Hoeschst-33342 emitem fluorescência em microscópio de fluorescência, pois este fluoróforo tem afinidade com o DNA (adenina – timina).

Poderiam ser utilizados outros fluoróforos como laranja de acridina, brometo de etideo, sybr-green, entre vários, porém as vantagens do Hoechst sobre os outros foi que ele apresenta um baixo custo, apresenta boa permeabilidade na membrana plasmática das hemácias, o que simplifica o protocolo, é excitado quando exposto a luz ultravioleta com comprimento de onda de 350 a 461 (emissão entre 510 a 540 nm) que é comumente presente em microscópios de fluorescência e pode ser diluído em PBS.

O procedimento consistiu em estabelecer uma diluição em PBS salino (*Phosphate – Buffered Saline*) de fluoróforo Hoechst-33342. O Hoechst utilizado no projeto foi da marca Thermofisher. A preparação da solução foi testada nas seguintes diluições: 1/500, 1/1000, 1/2000 e 1/4000 em PBS salino obtendo boa visualização em todas as concentrações, porém permanecendo por mais tempo a fluorescência quando utilizado a diluição 1/500. Este reagente foi mantido fora do alcance da luz para evitar a degradação.

Desta forma preparamos o seguinte protocolo que foi utilizado:

- 1- Pipetar 100 microlitros da solução Hoechst 1/500 em um tubo de 1,5mL;
- 2- Adicionar 10 µL de sangue total em EDTA e homogeneizar;
- 3- Incubar protegido da luz por 10 minutos conforme recomendação do fabricante;
- 4- Após incubação foi realizada a lavagem 3X com solução PBS salino, deixando na última lavem apenas as células sanguíneas, retirando ao máximo o PBS sem encostar a ponteira nas células;
- 5- Foi adicionado então 990 µL de PBS para preparar uma diluição 1/100 com as células que ficaram no fundo do tubo;
- 6- Após, homogeneizou-se e inoculou-se em uma Câmara de Neubauer esta solução diluída e a contagem foi realizada em microscópio de fluorescência;

Realizamos a leitura dos quatro quadrantes em câmara de Neubauer contando os parasitos. O fator de conversão de cada quadrante da câmara de Neubauer para µL é de 0,01, a diluição da nossa amostra foi de 1/100, neste caso temos a seguinte formula para conversão da quantidade de parasitos nos quatro quadrantes:

$$\text{Parasitos}/\mu\text{L} = (n^\circ \text{ de parasitos} / n^\circ \text{ de quadrantes}) \times \text{fator de diluição} \times 0,01$$

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação da densidade do parasito é um componente importante no diagnóstico da infecção da malária aguda. Com o intuito de avaliar essa estimativa foram feitas comparação das metodologias: por campo, por leucócitos, por hemácias (três diferentes métodos clássicos de estimação preconizados pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde) e por fluorescência em Câmera de Neubauer como foi já descrito anteriormente. O estudo foi feito com um paciente do HUIJM infectado com malária aguda, que estava exatamente no estagio de reprodução do parasito, pois no ato da coleta o paciente se encontrava com febre de 41°C e na microscopia haviam muitos esquizontes, a parasitemia semiquantitativa foi de +++ (três cruces) e a espécie foi *Plasmodium vivax* ) (F López-Antuñano, Schimunis G).

Em decorrência de menor probabilidade de erro associado à mensuração, a estimação pela câmara de Neubauer foi considerada referência, isto é, como sendo o real parâmetro da

parasitemia na população de pacientes com malária. Destaca-se que a enumeração dos parasitos nos distendidos sanguíneos foi feita por dois microscopistas, o que minimizou a possibilidade de erro sistemático na contagem.

Erros na determinação da parasitemia por *Plasmodium* são decorrentes da densidade dos parasitos no sangue e, em geral, são motivados pela técnica de mensuração, pela qualidade do distendido de sangue microscopicamente examinado e pela distribuição estatística da contagem. Assim, considerando os métodos de quantificação utilizados neste estudo, as seguintes fontes de erros sistemáticos devem ser destacadas como explicação para as discrepâncias nos resultados observados: i) perda de parasitos e leucócitos durante o processo de coloração dos distendidos sanguíneos; ii) degradação de parasitos e leucócitos durante o tempo de armazenamento das lâminas; iii) baixa acurácia dos recursos de enumeração microscópica dos parasitos e; iv) distribuição aleatória dos parasitos no distendido sanguíneo (O'Meara, W. P. *et al*).

Na análise em câmara de Neubauer encontramos parasitos nas formas trofozoitas, esquizontes e gametócitos nos quatro quadrantes da câmara, assim como nos outros métodos. A distinção de parasitos e leucócitos é simples, sendo possível observar com clareza os núcleos dos leucócitos.

O resultado da quantidade de leucócitos e hemácias obtidos pelo hemograma foram de 5.500 leucócitos/ $\mu\text{L}$  e 3.760.000 hemácias/ $\mu\text{L}$ .

As técnicas de leitura das lâminas foram realizadas por dois microscopistas de modo cego, não houve discrepância maior que 20% na comparação dos dados. Por isso não foi necessário a leitura de um terceiro microscopista.

Os três métodos clássicos demonstraram baixa concordância entre eles, o que já foi descrito por outros autores (ALVES-JUNIOR, E. R. *et al*).

Os valores das médias de parasitemia na metodologia por campo foram de 11781 parasito / $\mu\text{L}$ , da metodologia por leucometria foram 20.749 parasitos/ $\mu\text{L}$ , da metodologia por hemácias foram 31.490 parasitos/ $\mu\text{L}$ , todos métodos preconizados pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde para quantificação no diagnóstico (Lawrence R. Ash et al., Ministério da Saúde, 2009). Para a metodologia padronizada por fluorescência a

parasitemia na contagem dos quadrantes laterais em câmara de Neubauer foi de 19.000 parasitos/ $\mu$ L.

A literatura traz que a contagem por leucócitos é mais acurada do que a contagem por campo e por hemácias (Jeremiah, Z. A. & Uko, E. K, O'Meara, W. P. et al, Olliaro, P. et al; ALVES-JUNIOR, E. R. et al.), e o resultado da contagem por Câmara de Neubauer foi semelhante a esta contagem, o que de certa forma valida a padronização da contagem por Câmara de Neubauer.

Sempre houve muita divergência entre qual método é o melhor para quantificação, com o aumento do número de pacientes neste estudo podemos mostrar com maior certeza que o método de contagem por leucócitos, é o método mais acurado.

Como há muita divergência entre as contagens preconizadas pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde, optamos por considerar o método por Câmara de Neubauer como a referência na comparação por ser um método clássico de contagem e utilizado para contagem de células sanguíneas e líquidos corporais.

Quando comparamos as contagens com o método fluorescência, obtivemos um resultado mais próximo que foi o da quantificação por leucócitos, um resultado mais baixo que foi o da quantificação por campo e um resultado mais alto que foi o da quantificação por hemácias.

Para evidenciar isto, realizamos a razão (divisão simples) entre os métodos com a referência para obter a inclinação em porcentagem a partir da seguinte fórmula:

$$(Razão - 1) \times 100$$

Podemos perceber no presente estudo que o resultado da quantificação por campo subestimou em 39% a parasitemia quando comparado ao método por fluorescência, o resultado da quantificação por leucócitos apesar de próximo ficou 9% acima e o resultado da quantificação por hemácias superestimou em 66% a parasitemia quando comparado ao método de fluorescência (tabela 1, figura 1).

Tabela 1 – Descrição da parasitemia entre os métodos, da razão entre os métodos e a referência e a inclinação das médias comparadas.

Resultados	Método de quantificação da parasitemia			
	Microscopia convencional			Microscopia de fluorescência
	Campo	Leucócitos	Hemácias	Quadrantes

Parasitemia/ $\mu$ L	11.781	20.749	31.490	19.000
Razão	0,61	1,09	1,66	1,00
Inclinação	- 39 %	09%	66%	00

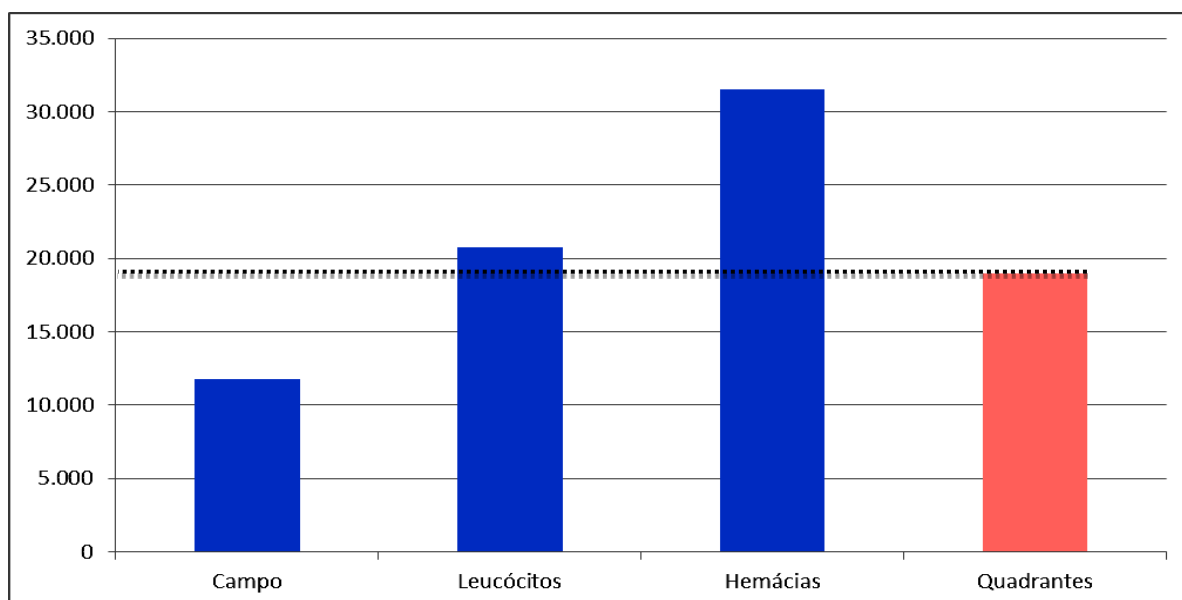


Figura 1.1 – Gráfico de barras com a comparação das contagens entre os métodos com a referência.

No presente estudo, verificou-se subestimação da parasitemia pelo método por campo. Isto já foi observado em outros estudos e tem sido explicado por problemas técnicos relacionados ao exame, tais como a perda sistemática de parasitos durante o procedimento de preparo e coloração do distendido sanguíneo (Dowling, M. a & Shute, Limaye, C. S., Londhey, V. A. & Nabar). Ainda assim, é pouco provável que tal falha esteja contribuindo em grande escala para a subestimação observada neste estudo, haja vista a experiência e qualificação dos profissionais envolvidos com a técnica. Assim por haver variabilidade entre as espessuras de cada distendido sanguíneo, implica em diferentes volumes de sangue parasitado a ser examinado numa mesma área microscópica (González, B. *et al*).

Uma importante fonte de erro no método que utiliza a quantificação da parasitemia por campos examinados é a espessura do distendido espesso de sangue, obviamente

relacionada à quantidade de parasitos presentes. Já foi observado que o volume entre 5 e 10/ $\mu$ L de sangue resulta em distendido espesso adequado para a determinação da parasitemia (Greenwood, B. M. & Armstrong, J. R. M). A variação na espessura dos distendidos examinados neste estudo principalmente se predominou aqueles com menor volume de sangue, pode também ser uma explicação para a discrepância registrada com esse método.

A contagem por hemácias superestimou a parasitemia, porém não há na literatura resultados de comparação com esta técnica que apesar de preconizada pelo Ministério da Saúde e Organização Mundial de Saúde é pouco utilizada na prática para quantificação e diagnóstico, pois é realizada em esfregaço fino, e padrão ouro devido ao aumento da sensibilidade é a gota espessa. Por isso apesar de superestimar, precisamos aumentar o número de pacientes para inferir com confiança sobre este método.

#### **4. CONCLUSÃO**

O método padronizado de quantificação da parasitemia em câmara de Neubauer mostrou maior semelhança com o método de quantificação por leucócitos. Após aumento do número de amostras, poderemos inferir com análise estatística sobre a concordância entre as metodologias preconizadas pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial de Saúde.

## REFERÊNCIAS

- ALGER, J. Diagnóstico Microscópico de la Malaria Gota Gruesa y Extendido Fino. **Rev Med Hond**, v. 67, p. 216–218, 1999.
- ALVES-JUNIOR, E. R. *et al.* Assumed White Blood Cell Count of 8,000 Cells/ $\mu$ L Overestimates Malaria Parasite Density in the Brazilian Amazon. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94193, 2014a.
- ALVES-JUNIOR, E. R. *et al.* Quantification of parasite density in 200 microscopic fields underestimates the parasitemia level in malaria patients. **Tropical Biomedicine**, v. v. 31, p. 387–391, 2014b.
- BEI, A. K. *et al.* A flow cytometry-based assay for measuring invasion of red blood cells by *Plasmodium falciparum*. **American journal of hematology**, v. 85, n. 4, p. 234–7, abr. 2010.
- CHOTIVANICH, K.; SILAMUT, K.; DAY, N. P. J. Laboratory diagnosis of malaria infection – A short review of methods. n. 6, p. 6–9, 2007.
- F LÓPEZ-ANTUÑANO; SCHIMUNIS, G. Diagnóstico de malária. **Organización panamericana de la Salud**, v. 512, p. 84, 1988.
- FONTES, C. J. F. *Plasmodium* spp. In: **Parasitologia Clinica**. 2. ed. [s.l.] ATHENEU, 2008. p. 355.
- GILLES, H. M. Diagnostic methods in malaria. In: GILLES, H. M.; WARRELL, D. A. (Eds.). . **Bruce-Chwatt's Essential malariology**. 3<sup>a</sup>. ed. [s.l.] Edward Arnold, 1993. p. 78–95.
- GLOBAL MALARIA PROGRAME. **World Malaria Report**. 1. ed. [s.l.] World Health Organization, 2012.
- GREENWOOD, B. M. & ARMSTRONG, J. R. M. **Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density**. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**, 186–188 (1991).
- JEREMIAH, Z. A.; UKO, E. K. Comparative analysis of malaria parasite density using actual and assumed white blood cell counts. **Annals of tropical paediatrics**, v. 27, n. 1, p. 75–9, 1 mar. 2007.
- KAMAU, E. *et al.* Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. 1–9, jan. 2013.
- MCKENZIE, F. E. *et al.* White blood cell counts and malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 2, p. 323–30, 15 jul. 2005.
- MINISTERIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. 2<sup>a</sup>. ed. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspéctos Clínicos. In: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (Ed.). . **Ações de Controle da Malária**. 1<sup>a</sup>. ed. Brasília/DF: [s.n.]. p. 27–31.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. 1<sup>a</sup>. ed. Brasília/DF: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico do SUS - Malária**. Brasília/DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2013.

O'MEARA, W. P. *et al.* Sources of variability in determining malaria parasite density by microscopy. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 73, n. 3, p. 593–8, set. 2005.

OLLIARO, P. *et al.* Standardised versus actual white cell counts in estimating thick film parasitaemia in African children under five. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 16, n. 5, p. 551–4, maio 2011.

PRUDHOMME O'MEARA, W. *et al.* Systematic comparison of two methods to measure parasite density from malaria blood smears. **Parasitology research**, v. 99, n. 4, p. 500–4, set. 2006.

ROSS, R.; THOMSON, D. Some Enumerative Studies on Malarial Fever. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 83, n. 562, p. 159–173, 19 dez. 1910.

TANGPUKDEE, N. *et al.* Malaria Diagnosis: A Brief Review. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93, 2009.

VERMA, P. *et al.* Detection of histidine rich protein & lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum* in malaria patients by sandwich ELISA using in-house reagents. **The Indian journal of medical research**, v. 138, n. 6, p. 977–87, dez. 2013.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 2, p. 172–3, 15 jan. 2008.

WHO. MALARIA LIGHT MICROSCOPY CREATING A CULTURE OF QUALITY REPORT OF WHO SEARO. **Organização Mundial da Saúde**, v. 1, 2005.

WHO. **World Malaria Report**. France: World Health Organization, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Basic Malária Microscopy, Learner's guide**. 2<sup>a</sup> Edition ed.Switzerland: WHO, 2010.