

Avaliação da confiabilidade da gota espessa em um estudo de campo conduzido em uma área endêmica de malária no Médio Rio Negro, Estado do Amazonas

Evaluation of the thick smear in a field condition in a malaria endemic area in the Middle Region of Rio Negro, Amazon

Martha Cecilia Suárez-Mutis¹ e José Rodrigues Coura¹

RESUMO

Com o objetivo de medir a confiabilidade da gota espessa em uma área de infecção pelo *Plasmodium* foi realizado um estudo no qual foram avaliadas 322 gotas espessas, lidas em condições normais de campo, por microscopista treinado. Posteriormente, as mesmas lâminas foram examinadas por outro microscopista que fez a leitura em condições ideais. A concordância foi medida usando o índice Kappa. Nos pacientes com sintomas de malária foi encontrada uma concordância de 0,91 (IC 95% 0,57-0,98 $p < 0,05$) enquanto nos pacientes com infecção assintomática o valor do índice Kappa foi de 0,42 (IC 95% 0,15-0,68 $p < 0,05$). Conclui-se que em áreas onde há infecção assintomática é fundamental aumentar a confiabilidade da gota espessa aumentando o número de campos lidos.

Palavras-chaves: Malária. Gota espessa. Concordância. Índice Kappa.

ABSTRACT

In order to assess the reliability of the thick smear in a *Plasmodium* infection area, 322 thick smears were examined by a trained microscopist in field conditions. Later, the same smears were examined by an experience microscopist in ideal laboratory conditions. Reliability was measured by the Kappa index. In symptomatic malaria patients the Kappa index was 0.91 (IC 95% 0.57-0.98 $p < 0.05$) while in asymptomatic *Plasmodium* infection the Kappa index was as low as 0.42 (IC 95% 0.15-0.68 $p < 0.05$). In areas of asymptomatic infection, improvement in the sensibility of thick smears by increasing the number of microscopic fields read or using other more accurate diagnostic malaria techniques alone or in combination is fundamental.

Key-words: Malaria. Thick smear. Measure. Kappa index.

A gota espessa continua sendo o *padrão ouro* para o diagnóstico da malária. Os resultados da microscopia dependem não somente da qualidade da coloração, do microscópio e da técnica de preparação das lâminas, mas também da concentração, experiência e motivação do microscopista^{5,7}. Há um limiar de detecção, segundo o grau de parasitemia existente no paciente e do número de campos lidos¹². Em condições ideais, um microscopista é capaz de detectar densidades parasitárias tão baixas como 10 a 20 parasitas por cada microlitro de sangue. Em condições de campo, o que ocorre normalmente na maior parte das áreas malarígenas do mundo, a capacidade de detecção necessita

de até 100 parasitas por cada microlitro¹⁴. Os programas de prevenção e controle de malária usam o índice Kappa^{3,6,8} como um indicador do controle de qualidade das gotas espessas nos diferentes níveis do laboratório nas áreas endêmicas. O índice Kappa mede a concordância entre técnicas ou observadores levando em consideração a probabilidade de se obter acordos simplesmente por acaso. Segundo as diretrizes dos programas de controle de malária, todas as lâminas positivas para *Plasmodium* e 10% das lâminas negativas devem ser relidas por um microscopista em condições ideais e o resultado deve ser comparado com os resultados do microscopista de campo ou que fez a

1. Departamento de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Órgão financiador: CNPq, PAPES-FIOCRUZ

Endereço para correspondência: Prof. José Rodrigues Coura. Dep^o de Medicina Tropical/IOC/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ. Tel: 55 21 2598-4339, Fax: 55 21 2280-3740.

e-mail: coura@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação em 10/11/2005

Aceito em 10/8/2006

primeira leitura. Na maior parte das áreas malarígenas nas Américas, onde os pacientes têm parasitemias altas ou moderadas, espera-se uma concordância por índice Kappa, superior a 0,8. Em áreas onde há infecção assintomática os pacientes apresentam baixas parasitemias^{4,13}. Nos últimos anos, no Brasil têm sido descritas algumas áreas onde ocorre infecção assintomática por *P. falciparum* e/ou *P. vivax* em Rondônia¹, Mato Grosso², no Médio Rio Negro¹¹ e na área Yanomami⁹. Não sabemos qual é o comportamento do índice Kappa nestas áreas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de medir a concordância entre dois microscopistas experientes no diagnóstico de malária em uma área de infecção assintomática.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas 322 gotas espessas envolvendo todos os moradores em uma área de infecção assintomática de malária no rio Padauri, Médio Rio Negro, Amazonas. Todas as gotas espessas foram coletadas e coradas pela mesma pessoa usando a técnica padronizada pela FUNASA/MS e lidas por um microscopista experiente em condições de campo, logo após a coleta. Posteriormente, as mesmas lâminas foram entregues a outro microscopista experiente, que não conhecia os resultados prévios, que fez novas leituras em condições de laboratório para o controle de qualidade. Tanto o microscopista no campo quanto o do controle de qualidade leram 200 campos em cada lâmina. Foi realizada uma avaliação qualitativa da densidade parasitária assim: +/2: 40 a 60 parasitas contados nos 200 campos; +: 1 parasita por campo; ++: de 2 a 20 parasitas por campo; +++: de 21 a 200 parasitas por campo; ++++: mais de 200 parasitas por campo. Quando houve uma parasitemia menor de 40 parasitas por campo, os resultados foram expressos pelo número de parasitas contados nos 200 campos. Foram definidos como infecção assintomática os casos de pessoas com gota espessa positiva que não apresentaram nenhum sintoma de malária (febre, cefaleia ou calafrios) trinta dias antes e depois da realização da gota espessa.

Para medir a concordância resultante foi usado o Coeficiente Kappa. Os valores de Kappa ajustados por prevalência e viés de discordância e os intervalos de confiança foram calculados usando o programa kappa.exe (software de uso livre). Posteriormente, foi realizado um *PCR-nested* de todas as amostras obtidas de pacientes, segundo o protocolo modificado de Snounou¹⁰. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da FIOCRUZ-RJ (Protocolo CEP 157/02)

RESULTADOS

Das 322 lâminas examinadas, 17 (5,3%) foram dadas como positivas; 6 (1,9%) foram de pacientes sintomáticos e 11 (3,4%) de pacientes assintomáticos. Dos pacientes com sintomas, 5 (83,3%) foram dados como positivos por ambos microscopistas e 1 (16,7%) foi discordante. Dos pacientes assintomáticos, 3 (27,3%) foram dados como positivos por ambos microscopistas, 7 (63,6%) só foram detectados no

controle de qualidade e 1 (9,1%) foi detectado pelo microscopista de campo. O coeficiente Kappa geral (infecções sintomáticas + assintomáticas) foi de 0,63 (IC 95% 0,39-0,80 $p < 0,05$). Na Tabela 1, observa-se a concordância quando se estratifica entre infecção sintomática e assintomática. A concordância foi de 0,91 (IC 95% 0,57-0,98 $p < 0,05$) quando comparadas lâminas de pacientes sintomáticos, enquanto o coeficiente Kappa foi baixo 0,42 (IC 95% 0,15-0,68 $p < 0,05$) se são comparadas lâminas de casos de infecção assintomática. O grau de falta de concordância foi mais forte nas mais baixas densidades parasitárias; entre os pacientes assintomáticos, 5 (62,5%) de 8 lâminas foram discordantes. Todos os resultados dados como positivos no controle de qualidade foram positivos no PCR. Todos os pacientes sintomáticos tinham infecção pelo *P. vivax*; nos pacientes assintomáticos, 10 tinham infecção pelo *P. vivax* e um pelo *P. falciparum*.

Tabela 1 - Resultados das leituras das lâminas de malária dadas pelo microscopista de campo e pelo microscopista responsável pelo controle de qualidade.

Código do paciente	Infecção sintomática*		Infecção assintomática**	
	microscopista de campo	controle de qualidade	microscopista de campo	controle de qualidade
030-04	-	-	+ /2 <i>P. vivax</i>	+ + <i>P. vivax</i>
015-06	-	-	10 <i>P. vivax</i>	2 <i>P. vivax</i>
025-03	-	-	+ + <i>P. vivax</i>	+ /2 <i>P. vivax</i>
018-06	-	-	negativo	+ /2 <i>P. vivax</i>
002-04	-	-	negativo	6 <i>P. falciparum</i>
010-08	-	-	negativo	+ <i>P. vivax</i>
030-01	-	-	negativo	20 <i>P. vivax</i>
023-04	-	-	negativo	+ /2 <i>P. vivax</i>
022-02	-	-	negativo	+ <i>P. vivax</i>
037-03	-	-	negativo	+ + <i>P. vivax</i>
010-06	-	-	10 <i>P. vivax</i>	negativo
037-01	20 <i>P. vivax</i>	+ <i>P. vivax</i>	-	-
037-04	+ /2 <i>P. vivax</i>	+ + <i>P. vivax</i>	-	-
019-09	+ + <i>P. vivax</i>	+ + <i>P. vivax</i>	-	-
018-04	+ <i>P. vivax</i>	+ + <i>P. vivax</i>	-	-
021-01	+ + <i>P. vivax</i>	negativo	-	-
025-02	10 <i>P. vivax</i>	10 <i>P. vivax</i>	-	-
Negativos	316	317	307	301
Total	322	322	311	311

* coeficiente Kappa=0,91 ($p < 0,05$ IC 95% 0,57-0,98)

** coeficiente Kappa=0,42 ($p < 0,05$ IC 95% 0,15-0,68)

DISCUSSÃO

Apesar do exame padrão da gota espessa permitir facilmente o diagnóstico da infecção por *Plasmodium* em indivíduos não imunes devido à alta ou moderada densidade parasitária, é freqüentemente inadequado para o diagnóstico em áreas onde a densidade parasitária é muito baixa como ocorre em locais de infecção assintomática^{4,13}. Os programas de controle usam o índice Kappa que permite verificar a concordância dos resultados das gotas espessas entre diferentes examinadores. Um índice entre 0,8 e 1,0 é considerado quase perfeito, entre 0,4 e 0,79 moderado e um índice menor de 0,39 é considerado pobre e o microscopista deve passar por uma reciclagem. Nas infecções

sintomáticas nas quais a parasitemia é elevada, a concordância entre diferentes examinadores normalmente é alta. Em nosso estudo, a concordância foi quase perfeita ($K=0,91$) na infecção sintomática. Entretanto, encontramos uma moderada concordância do índice Kappa em casos de infecção assintomática por *Plasmodium* ($K=0,42$) apesar de ter realizado a leitura de 200 campos microscópicos. Concluímos que é necessário reconsiderar a utilização exclusiva da gota espessa em áreas nas quais existe infecção assintomática onde baixas parasitemias são prevalentes. É preciso melhorar a confiabilidade da gota espessa aumentando o número de campos lidos, o que nem sempre é possível em áreas de alta endemicidade devido a carga de trabalho. Neste caso, especificamente, este aumento da confiabilidade levaria também a um aumento da sensibilidade. Por outro lado, deveríamos melhorar o controle de qualidade dos laboratórios de referência.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários da Fundação Nacional da Saúde em Barcelos assim como à Gerência da malária da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas pela leitura e controle de qualidade das lâminas de malária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LHP, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* infections in native amazonian populations. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 66:641-648, 2002.
- Andrade ALSS, Martelli CMT, Oliveira RM, Arias J, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. Clinical Infectious Diseases 20:475, 1995.
- Cohen JA. A coefficient of agreement for nominal scales. Educational Psychology Measurement 20:37-46, 1960.
- Coleman RE, Maneechai N, Rachaphaew N, Kumpitak C, Scott Miller R, Soyseng V, Thimasarin K, Sattabongkot J. Comparison of field and expert laboratory microscopy for active surveillance for asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Western Thailand. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67:141-144, 2002.
- Dowling MAC, Shute GT. A comparative study of thick and thin blood films in the diagnosis of scanty malaria parasitaemia. Bulletin of the World health Organization 34:249-267, 1966.
- Fleiss JL. Statistical Methods for rates and proportions. 2 edition, Wiley, New York, 1981.
- Killian AHD, Metzger WG, Mutshelknauss EJ, Kagambe G, Langi P, Korte R, Sonnengurg FV. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. Tropical Medicine and International Health 5:3-8, 2000.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics 33: 159-174, 1977.
- Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR. Cross-sectional Study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 99:369-376, 2004.
- Snounou G, Viriyakosol S, Ping Zhu X, Jarra W, Pinheiro L, Rosário V, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested PCR. Molecular and Biochemical Parasitology 61: 315-320, 1993.
- Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Fernández O, Coura JR. Diferença na sazonalidade da infecção assintomática por *Plasmodium* em uma área endêmica de malária no médio rio Negro, Amazonas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 38(supl D):408, 2005.
- Thellier M, Datry A, Alfa Cissé O, San C, Biligui S, Silvie O, Danis M. Diagnosis of malaria using thick blood smears: definition and evaluation of a faster protocol with improvement readability. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 96:11-124, 2002.
- Trape JE. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79:181-184, 1985
- World Health Organization. Malaria diagnosis. Memorandum from a WHO meeting. Bulletin World Health Organization 66:575-594, 1988.