

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de
malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium
falciparum***

por

Lara Cotta Amaral

Belo Horizonte
Fevereiro / 2014

DISSERTAÇÃO MDIP – CPqRR

L.C. AMARAL

2014

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*

por

Lara Cotta Amaral

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de concentração de Doenças Infeciosas e Parasitárias.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho
Co-orientação: Dra. Cristiana Ferreira Alves de Brito

Belo Horizonte
Fevereiro / 2014

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

A485d Amaral, Lara Cotta.
2014

Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium Vivax* e *Plasmodium falciparum* / Lara Cotta Amaral. – Belo Horizonte, 2014.

XIX, 65 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 77 - 84

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Malária/diagnóstico 2. *Plasmodium Vivax* /parasitologia 3. *Plasmodium falciparum*/parasitologia 4. Reação em Cadeia da Polimerase/instrumentação. III. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). IV. Brito, Cristiana Ferreira Alves de (Co-orientação)

CDD – 22. ed. – 616.936 2

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*

por

Lara Cotta Amaral

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dra. Luzia Helena Carvalho (Presidente)

Prof. Dra. Kezia Katiani Gorza Scopel

Prof. Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz

Suplente: Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2014

COLABORADORES

Centro de Pesquisas René Rachou – Belo Horizonte/MG

Daniela Rocha Robortella

Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Centro de Controle de Zoonoses – Uberlândia/MG

Dr. Jean Ezequiel Limongi

Universidade Federal do Mato Grosso

Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes

"Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro."

BIBLIA SAGRADA, Pv 3:13-14

Dedico este trabalho à minha amada mãe, por ser a base durante toda minha vida, sempre com tanto amor e dedicação.

Ao meu pai pelo suporte em muitos momentos.

Às amigas de vida e profissão, que tornam o caminho sempre tão mais agradável.

A todos os professores que passaram pela minha vida, pelas oportunidades e ensinamentos.

Aos acometidos pela malária, meu objeto de estudo, por serem o incentivo maior ao desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, zeloso e perfeito Pai, pelo fôlego de vida com saúde a cada dia, por me dar condições de trabalhar, estudar e realizar meus sonhos.

À minha amada *mãezinha*, quem eu deveria chamar *mãezona*, por ser minha base de vida com muito mais do que o sustento emocional e financeiro, carinho e cumplicidade, apoio e disposição para fazer acontecer quando não me vejo suficiente. Quem me impulsiona, direciona e aconselha com sabedoria.

Ao meu pai pela torcida com amor, mesmo distante, me vendo capaz de assumir as responsabilidades, se fazendo presente em importantes momentos.

À princesa Dani, *boneca preferida* que colore meus dias, que me cobra ânimo e persistência quando mais preciso, quem me ensina o pensar como criança tantas vezes esquecido.

Ao Danilo, que trilhou parte desta etapa comigo, discutiu problemas e soluções, se tornou importante amigo, namorado e colega de profissão, exemplo de amor pelo que faz.

À Dra. Luzia pela disposição em me guiar nesta pesquisa, mostrando alegria e satisfação ao meu pedido de orientação, atentando para minhas habilidades, acreditando na minha capacidade e me passando segurança a cada obstáculo.

À Dra. Cristiana pela co-orientação nos misteriosos caminhos da Biologia Molecular, sempre disponível em minhas aflições com carinho e paciência.

À querida Dra. Taís, pela disposição em sanar minhas dúvidas, por me aguentar interrompendo seus estudos e me apresentar possibilidades nas dificuldades.

Aos demais professores do curso pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade, sendo estímulos para uma caminhada nas estradas da apaixonante Parasitologia.

À Dani, por ser uma aluna tão esforçada e pela ajuda com satisfação, sempre atenta aos meus pedidos e discussões com carinho e apoio.

Aos colegas de laboratório e profissão, alguns se tornando verdadeiros amigos, agradeço por partilharem minhas alegrias e aflições. Em especial, Dani, Jé e Babi pelos risos e passeios, extrapolando nossa convivência para fora do trabalho. Ao Lipe e Gabi pelos gostosos lanches da tarde. À Sarinha e Dê, importantes demais nesta trajetória, tão pacientes e dispostas a ajudar quando mais precisei.

À Alice, pela boa vontade em atender nosso chamados, suprir as necessidades e cuidar tão bem do laboratório e de todos nós.

Ao Geraldo, pelo cuidado com os materiais e alegres “bom dia” toda manhã.

Aos colaboradores deste trabalho, Dr. Jean e Dr. Cor, pela disponibilidade e cuidado na coleta e envio das amostras, ajuda essencial.

Aos amigos de vida, que não entendem muito meus caminhos, mas me dão apoio todo dia. Sabendo que cada parte de mim interfere no todo, agradeço pela companhia em meus momentos de lazer e descanso, pelos ouvidos inclinados a meus desabaços e pelas palavras de estímulo quando demonstrei desânimo.

À plataforma de PCR em Tempo Real, pelo fornecimento da infraestrutura necessária à realização dos meus experimentos. Em especial à querida Fê, pelo cuidado com minhas placas e discussões dos meus resultados, me ajudando a solucionar problemas e sugerindo alternativas.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oferta deste curso com tanta qualidade.

À Biblioteca do CPqRR, pelo acesso gratuito à informação técnico-científica, sustentada por recursos públicos federais, além da catalogação e normalização desta dissertação.

AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Agradeço às agências de fomento pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

À CAPES, pela minha bolsa de mestrado.

Às agências financiadoras: CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do CPqRR/FIOCRUZ pela infraestrutura e recursos para compra de reagentes e equipamentos necessários.

Sumário

Lista de Figuras	XIV
Lista de Tabelas	XV
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XVII
Resumo	XVIII
Abstract	XIX
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Distribuição Mundial da Malária	20
1.2 Distribuição da Malária no Brasil	23
1.3 Parasitos e Ciclo Biológico	24
1.4 Diagnóstico Laboratorial da Malária Humana	26
1.4.1 Diagnóstico Microscópico	27
1.4.2 Diagnóstico por Testes Rápidos	30
1.4.3 Diagnóstico Molecular	31
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MÉTODOS	37
4.1 População do Estudo	37
4.2 Voluntários e coleta de sangue	37
4.3 Amostras	38
4.3.1 Amostras de área não endêmica para malária	38
4.3.2 Amostras de área endêmica para malária	39
4.4 Diagnóstico microscópico	39
4.5 Extração de DNA	40
4.5.1 Extração de DNA a partir de sangue em papel de filtro	40
4.5.2 Extração de DNA a partir de sangue total	41
4.6 Real-Time PCR para os alvos Pvr47 e Pfr364	42
4.6.1 Desenho de iniciadores para os alvos Pvr47 e Pfr364	42

4.6.2 Padronização da Real-Time PCR para amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 (RT-LAMAL)	44
4.7 Outros protocolos de PCR	44
4.7.1 Amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 por PCR convencional (PCR-Demas)	44
4.7.2 Amplificação do gene 18S rRNA por Real-Time PCR (RT-Mangold)	45
4.7.3 Amplificação do gene 18S rRNA por Nested-PCR (Nested-Snounou) ...	47
4.8 Titulação de amostras de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	48
4.9 Misturas artificiais de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	49
4.10 Análises Estatísticas	49
5 RESULTADOS	52
5.1 Padronização da Real-Time PCR para os alvos Pvr47 e Pfr364	52
5.2 Comparação entre a RT-LAMAL e diferentes protocolos moleculares	53
5.2.1 Limite de Detecção	53
5.2.2 Diagnóstico de infecções mistas por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	55
5.3 Comparação dos protocolos de PCR com amostras de campo	58
5.3.1 Diagnóstico molecular em amostras de área não endêmica	59
5.3.2 Diagnóstico molecular em amostras de área endêmica	61
5.4 Desempenho dos protocolos de PCR para diagnóstico de malária	63
6 DISCUSSÃO	66
6.1 Real-Time PCR LAMAL em comparação com diferentes protocolos moleculares: limites de detecção e infecções mistas	67
6.2 Comparação dos protocolos de PCR em amostras de campo	69
6.3 Índices de validade para diagnóstico molecular de malária	70
7 CONCLUSÕES	72
8 ANEXOS	73
8.1 Documentos de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Protocolos CEP CPqRR N° 24/2008 e 358.698/2013)	73
8.2 Trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Malária do CPqRR, aceito para publicação na revista <i>Memórias do Instituto Oswaldo</i>	

<i>Cruz</i> , em 2014	76
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

Lista de Figuras

Figura 1: Limites espaciais da transmissão mundial de malária por <i>Plasmodium vivax</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> em 2010	21
Figura 2: Distribuição da endemicidade de malária por <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i> no Brasil em 2010	23
Figura 3: Desenho esquemático do ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i> no hospedeiro humano e no vetor <i>Anopheles</i>	26
Figura 4: Distribuição espacial dos membros da família Pfr364 nos 14 cromossomos de <i>P. falciparum</i>	33
Figura 5: Alinhamento das 14 cópias de Pvr47 no genoma de <i>P. vivax</i> , com destaque em preto para as regiões onde foram desenhados os iniciadores (<i>Foward</i> e <i>Reverse</i> , respectivamente)	42
Figura 6: Alinhamento das 41 cópias de Pfr364 no genoma de <i>P. falciparum</i> (subfamílias 1 e 2), com destaque em preto para as regiões onde foram desenhados os iniciadores (<i>Foward</i> e <i>Reverse</i> , respectivamente)	43
Figura 7: Desenho esquemático das análises estatísticas de sensibilidade e especificidade para um teste de diagnóstico	50
Figura 8: Curvas de dissociação da Real-Time PCR LAMAL para <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> , juntamente com os controles negativos	53
Figura 9: Frequência de amostras positivas (%) para as diferentes técnicas avaliadas para o diagnóstico de malária dos 117 indivíduos de área não endêmica. Resultados positivos pelos protocolos de Nested-Snounou, RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL. Dados expressos por espécie de <i>Plasmodium</i> responsável pela doença	61
Figura 10: Frequência de amostras positivas (%) para as diferentes técnicas avaliadas para o diagnóstico de malária dos 163 indivíduos de área endêmica. Resultados positivos pelos protocolos de Nested-Snounou, RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL. Dados expressos por espécie responsável pela doença	63

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativa da parasitemia a partir da avaliação semiquantitativa	28
Tabela 2: Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária de indivíduos de área não endêmica para malária	38
Tabela 3: Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária de indivíduos de área endêmica para malária	39
Tabela 4: Dados demográficos e epidemiológicos dos 280 indivíduos envolvidos neste estudo, com prevalências determinadas pela microscopia óptica	40
Tabela 5: Resumo dos iniciadores utilizados para as reações de Real-Time PCR padronizadas no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou	43
Tabela 6: Resumo dos iniciadores utilizados para a reação de PCR Convencional (Demas <i>et al.</i> , 2011) e amplicons gerados	45
Tabela 7: Resumo dos iniciadores utilizados para a reação de Real-Time PCR descrita por Mangold <i>et al.</i> , 2005	46
Tabela 8: Resumo dos iniciadores utilizados para a reação de Nested-PCR (Snounou <i>et al.</i> , 1993) e tamanho da sequência amplificada por cada um	48
Tabela 9: Diluições de DNA sucessivas utilizadas para titulação de amostras sabidamente infectadas com <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> e suas respectivas quantidades de parasitos	48
Tabela 10: Misturas artificiais de DNA com suas respectivas parasitemias, utilizadas para avaliação da detecção de DNA dos parasitos <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> pelos quatro diferentes protocolos de PCR	49
Tabela 11: Titulação de amostra de campo sabidamente infectada por <i>P. vivax</i> em comparação a diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares	54
Tabela 12: Titulação de amostra de campo sabidamente infectada por <i>P. falciparum</i> em comparação a diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares	54
Tabela 13: Diagnósticos de misturas artificiais de duas amostras de campo, sabidamente infectadas por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> , em comparação a	

diferentes protocolos de PCR (titulação de <i>P. falciparum</i>)	56
Tabela 14: Diagnósticos de misturas artificiais de duas amostras de campo, sabidamente infectadas por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> , em comparação a diferentes protocolos de PCR (titulação de <i>P. vivax</i>)	57
Tabela 15: Resultados de diagnóstico de misturas artificiais de amostras de campo, sabidamente infectadas por <i>P. vivax</i> ou <i>P. falciparum</i> e com parasitemias semelhantes determinadas pelo método de cruzes, em comparação a diferentes protocolos de PCR	58
Tabela 16: Resultados positivos / negativos para malária dos 117 indivíduos de área não endêmica	59
Tabela 17: Resultados positivos para malária dos 117 indivíduos de área não endêmica, de acordo com a parasitemia microscópica e espécie causadora da doença	60
Tabela 18: Resultados positivos / negativos para malária dos 163 indivíduos de área endêmica	62
Tabela 19: Resultados positivos para malária dos 163 indivíduos de área endêmica, de acordo com a parasitemia microscópica e as espécies encontradas	62
Tabela 20: Amostras consideradas nas análises estatísticas dos protocolos RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL. Foram considerados verdadeiros positivos ou verdadeiros negativos as amostras com resultado positivo ou negativo concordantes no exame microscópico e Nested-Snounou	64
Tabela 21: Análises estatísticas das três técnicas de PCR avaliadas, sendo considerados verdadeiros positivos ou verdadeiros negativos as amostras com resultado positivo ou negativo concordantes no exame microscópico e Nested-Snounou	64

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- DNA** – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)
- dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- GQ** – Garantia da Qualidade
- LAMP** – *Loop Mediated Isothermal Amplification* (Amplificação Isotérmica de DNA)
- mM** – Milimolar
- n** – Número de indivíduos
- Nested-Snounou** – Protocolo de PCR baseado no descrito por Snounou *et al.*, 1993
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- P.A** – Pró-análise
- pb** – Pares de base
- PCR** – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- PCR-Demas** – Protocolo de PCR baseado no descrito por Demas *et al.*, 2011
- Pf** – *Plasmodium falciparum*
- POPs** – Procedimentos operacionais padrão
- Pv** – *Plasmodium vivax*
- Pv+Pf** – Infecção mista por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*
- p/μl** – parasitos por microlitro de sangue
- RDTs** – *Rapid Diagnostics Tests* (Testes Rápidos para Diagnóstico)
- RT-LAMAL** – Protocolo de PCR em Tempo Real desenvolvido e apresentado neste trabalho
- RT-Mangold** – Protocolo de PCR em Tempo Real baseado no descrito por Mangold *et al.*, 2005
- TAE** – Tampão Tris-acetato EDTA, pH 8,0
- Tm** – Temperatura de *melting* (dissociação)
- g** – Força centrífuga em medida da gravidade da Terra
- μl** – Microlitro
- μM** – Micromolar

Resumo

O diagnóstico adequado de malária permanece como um dos pilares dos programas de controle da doença no mundo, já que um diagnóstico eficiente permite a identificação precoce de casos e definição do esquema terapêutico, contribuindo para interrupção do ciclo biológico do parasito. A microscopia óptica (MO), atual diagnóstico de referência para malária, tem apresentado limitações, principalmente em casos de co-infecções e baixas parasitemias. Assim sendo, busca-se por técnicas mais sensíveis e específicas para auxiliar a MO, sendo os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) considerados mais adequados para identificação de indivíduos com infecção submicroscópica. Entretanto, os vários protocolos de PCR apresentados até o momento tem se baseado no gene da subunidade menor do RNA ribossomal 18S dos plasmódios (18S rRNA), que se encontra em poucas cópias no genoma destes parasitos. Recentemente, foram descritas sequências não ribossomais para identificação de *Plasmodium vivax* (Pvr47) e *Plasmodium falciparum* (Pfr364), sendo estas sequências promissoras para o diagnóstico molecular de malária. Baseando-se nestes achados, este trabalho propôs o desenvolvimento de um protocolo de Real-Time PCR para validar os alvos Pvr47 e Pfr364 para o diagnóstico de malária vivax e falciparum, respectivamente, com ênfase em infecções mistas e baixas parasitemias. Após padronização com sucesso da técnica de Real-Time PCR (RT-LAMAL), a mesma foi comparada a três outros protocolos moleculares, sendo duas técnicas baseadas no gene 18S rRNA – Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993) e Real-Time PCR (Mangold *et al.*, 2005) – e uma PCR convencional baseada nos alvos Pvr47/Pfr364 (Demas *et al.*, 2011). Para avaliar os protocolos quanto aos seus limites de detecção de infecções únicas e mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*, foram realizadas titulações de misturas artificiais com diferentes concentrações dos parasitos. Os resultados obtidos nesta etapa revelaram que a PCR-Demas e RT-LAMAL apresentaram os menores limites de detecção para *P. vivax* e *P. falciparum*, tanto em infecções únicas quanto mistas, e que o protocolo de RT-Mangold foi incapaz de detectar co-infecções. Posteriormente, os protocolos foram avaliados para o diagnóstico de malária em amostras de campo, incluindo área não endêmica (n=117) e área endêmica para malária (n=163). Os resultados revelaram que os protocolos de RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL foram mais eficientes na detecção de parasitemias submicroscópicas, porém, o protocolo de RT-Mangold novamente mostrou ser incapaz de detectar infecções mistas. Em conjunto, os dados obtidos demonstraram que os alvos Pvr47/Pfr364 foram mais adequados para o diagnóstico molecular de malária vivax e falciparum do que o gene 18S rRNA. Contudo, o protocolo aqui desenvolvido (RT-LAMAL) se mostra em vantagem à PCR-Demas, com maior rapidez na obtenção de resultados, dispensando a revelação em gel de agarose e uso de brometo de etídeo, além de diminuir a possibilidade de contaminação de reagentes e amostras. Portanto, conclui-se que a RT-LAMAL possui grande potencial para o diagnóstico molecular de certeza de pacientes com infecções mistas e baixas parasitemias.

Abstract

Accurate diagnosis of malaria remains as one of the pillars for prevention and control of the disease. An efficient diagnostic test may allow early case detection and appropriate treatment, therefore contributing to the interruption of malaria transmission cycle. Because the optical microscopy (OM) – the gold standard of malaria diagnosis – presents significant limitations, mainly in cases of co-infections and low parasitemias, it seems to be essential to develop a more sensitive and specific diagnostic tool. In this context, methods based on the polymerase chain reaction (PCR) seem to be more suitable for detecting individuals with submicroscopic malaria infections. Unfortunately, the majority of PCR-based methods still rely on the 18S rRNA gene targets, present in few copies in the parasite genome. Recently, new target DNA sequences were described for the identification of *Plasmodium vivax* (Pvr47) and *Plasmodium falciparum* (Pfr364). Due to the importance of these findings, the goal of the present study was to validate the Pvr47 and Pfr364 targets for the diagnosis of vivax and falciparum malaria, focusing on the development of a real-time PCR for detection of mixed infection and sub-microscopic parasitemia. After successful standardization of the Real-Time PCR (RT-LAMAL), this-PCR protocol was compared with three well-established PCR protocols, two of them relied on the gene 18S rRNA – Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993) and Real-Time PCR (Mangold *et al.*, 2005) -- and a third protocol based on the Pvr47/Pfr364 as target for a conventional PCR assay (Demas *et al.*, 2011). In order to evaluate these different PCR-protocols in terms of their limit of detection, titrations of artificial mixtures of DNA plasmodial were performed. The results revealed that the PCR-Demas and RT-LAMAL presented the lowest limit of detection for either single or mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections. In addition, the RT-Mangold protocol was unable to detect co-infections. To further evaluate the performance of these four PCR protocols for diagnosis of malaria in the field, we analyzed samples from malaria-endemic areas (n=163) as well as from non-endemic area (n = 117). While the results confirmed that PCR-Demas and RT-LAMAL protocols as being more appropriate for the diagnosis of submicroscopic infection, the data demonstrated again that the RT-Mangold protocol was unable to detect mixed infections. Together, the data confirmed Pvr47/Pfr364 targets as more suitable for molecular diagnosis of *P. vivax* and *P. falciparum*. Of interest, the Real-time PCR developed here (RT-LAMAL) offers several advantages over the traditional PCR-Demas, including faster processing time and decreased risk of contamination. In conclusion, that RT-LAMAL has great potential for molecular diagnosis of patients with mixed infections and low levels of parasitemia.

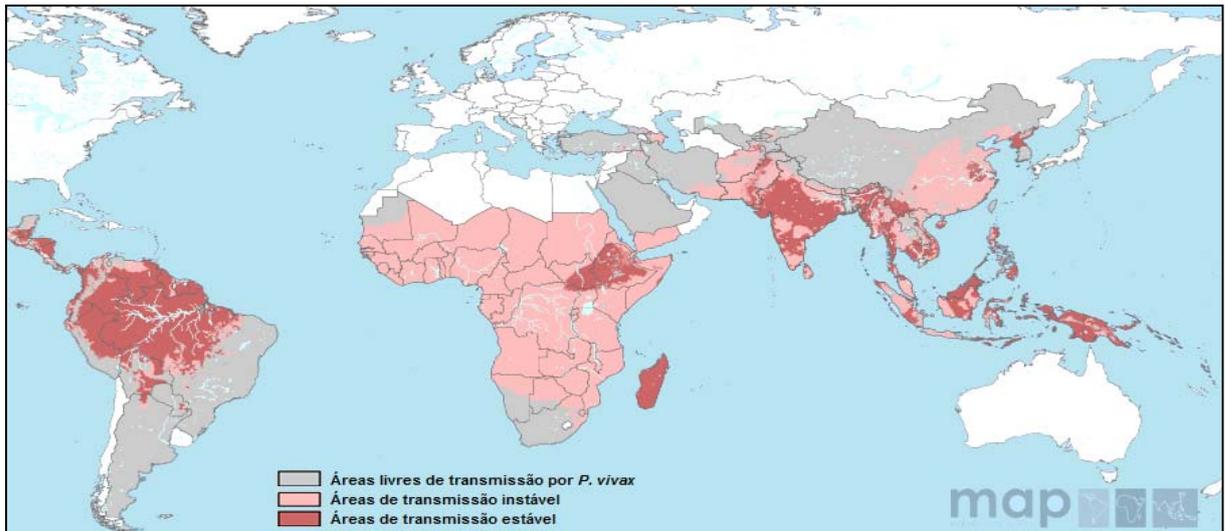
1.1 Distribuição Mundial da Malária

Doença infecciosa febril aguda, a malária possui como agentes etiológicos protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo estes transmitidos por vetores. Considerada uma das principais doenças infecciosas em regiões tropicais e subtropicais do mundo, a doença ocorre em mais de 109 países, destacando-se o continente africano com a grande maioria de acometimentos, sendo crianças menores de 5 anos e mulheres grávidas os grupos mais afetados (WHO, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, em 2012, aproximadamente 627.000 mortes por malária tenham ocorrido no mundo (WHO, 2013). Cerca de 3,4 bilhões de pessoas se encontravam em situação de risco para a doença no mesmo período. Dessas, 2,2 bilhões se caracterizavam por baixo risco (<1 caso por 1000 habitantes), dos quais 94% habitavam em áreas fora da região africana. O restante, 1,2 bilhão de pessoas viviam sob alto risco de infecção (>1 caso por 1000 habitantes), principalmente na região africana (47%) e sudeste asiático (37%).

A transmissão da malária pode ocorrer em países ou territórios dos cinco continentes, sendo as espécies *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* as mais prevalentes (Figura 1). O risco de aquisição da doença não é uniforme dentro de um país e, frequentemente, é desigual para locais situados em uma mesma região, além de sofrer variações de acordo com as estações do ano. Casos de malária em viajantes que retornam de áreas endêmicas tem sido frequentemente relatados, como consequência do aumento do turismo e da cooperação entre países endêmicos, aliados ao número crescente de casos com resistência a medicamentos anti-maláricos (Paglia *et al.*, 2012).

A



B

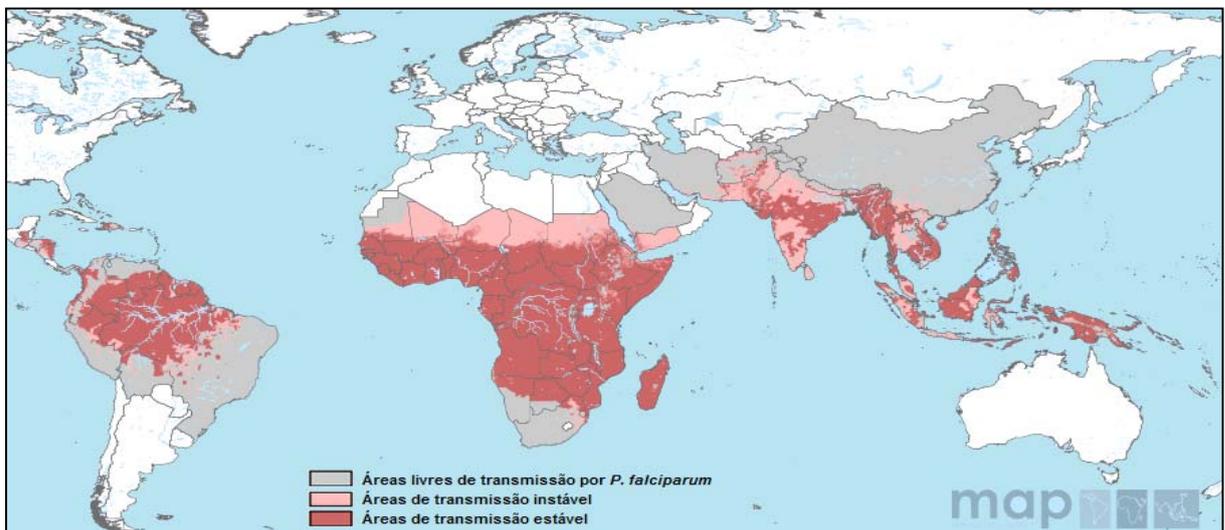


Figura 1: Limites espaciais da transmissão mundial de malária por *Plasmodium vivax* (A) e *Plasmodium falciparum* (B) em 2010. Áreas definidas como livres de transmissão (cinza), regiões de transmissão instável (rosa-claro) e regiões de transmissão estável (rosa-escuro). Fonte: Adaptado de Gething *et al.*, 2011 e Gething *et al.*, 2012.

O controle mundial da malária humana, segundo a OMS, se baseia no combate ao vetor, no diagnóstico precoce e no tratamento adequado dos indivíduos doentes. Além disso, a preocupação com a doença não se restringe aos países endêmicos e inclui todas as regiões do globo, inclusive às áreas consideradas livres de transmissão, já que o processo de globalização proporciona intenso trânsito de pessoas, favorecendo a dispersão de várias doenças (WHO, 2012; Qi *et al.*, 2012).

Em regiões não africanas, as mortes por malária ocorrem geralmente em populações não imunes, adultos e crianças, com recursos escassos para diagnóstico e terapêutica. Tem-se que, nos últimos 20 anos, a malária importada aumentou em torno de 400% nos países em desenvolvimento (Hawkes & Kain, 2007) e, anualmente, entre 10.000 e 30.000 viajantes contraem a doença (Vliegenthart-Jongbloed *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, a agenda internacional tem direcionado os recursos financeiros para o controle da malária, bem como investido nos campos de pesquisa com o objetivo principal de eliminação regional da doença. A meta se estendeu inicialmente a todos os tipos de malária humana, porém, atenção especial se voltou para casos relacionados à *P. falciparum*, comumente responsável pela forma mais grave da doença. Esta postura desencadeou certa negligência com relação à outra importante espécie causadora de malária, *P. vivax*, até então considerada responsável apenas por uma malária pouco agressiva (Gething *et al.*, 2011; Gething *et al.*, 2012).

Estudos posteriores revelaram que, mesmo após a eliminação de *P. falciparum* em certas regiões do globo, infecções por *P. vivax* continuavam ocorrendo. O aumento no número de casos, incluindo elevada gravidade e mortes, bem como o grande número de pessoas em situação de risco chamou atenção das autoridades e elevou o status de *P. vivax* a uma grande ameaça à saúde pública, atingindo as regiões mais populosas do mundo (Gething *et al.*, 2012).

Dados atuais revelam que muitos dos esforços direcionados para intervenções de controle da malária em todo o mundo tem contribuído efetivamente para reduções na morbidade e mortalidade devido à doença. Maiores investimentos tem sido destinados, até então, à países de alto risco, incluindo o continente sul africano, América Central, Ásia Central e a região Ásia-Pacífico (Cotter *et al.*, 2013).

Como consequência das estratégias de controle implementadas, segundo a OMS, as taxas de mortalidade da malária no mundo caíram em torno de 45% entre os anos de 2000 e 2012, em todas as faixas etárias, com redução de 51% em crianças menores de 5 anos de idade. Assim sendo, se permanecer estável esta taxa anual de redução, as projeções para até 2015 consistem na diminuição da mortalidade da malária em 56%, em todas as idades, e em 63% em crianças menores de 5 anos (WHO, 2013).

1.2 Distribuição da Malária no Brasil

No Brasil, três são as espécies causadoras de malária, sendo estas *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, com a maioria dos casos decorrentes de infecção por *P. vivax*, responsável por cerca de 80% de casos notificados no período de 2000 a 2011. Nos últimos 12 anos, uma média de aproximadamente 420 mil casos de malária foram registrados anualmente, grande parte destes – em torno de 99,7% – concentrada na região amazônica do país (SVS/MS, 2013) (Figura 2).

Na Amazônia brasileira, a malária está concentrada na chamada Amazônia Legal, constituída pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados de estados brasileiros pertencentes à área endêmica, bem como do continente africano e outros países da América do Sul (SVS/MS, 2010a; SVS/MS, 2010b).

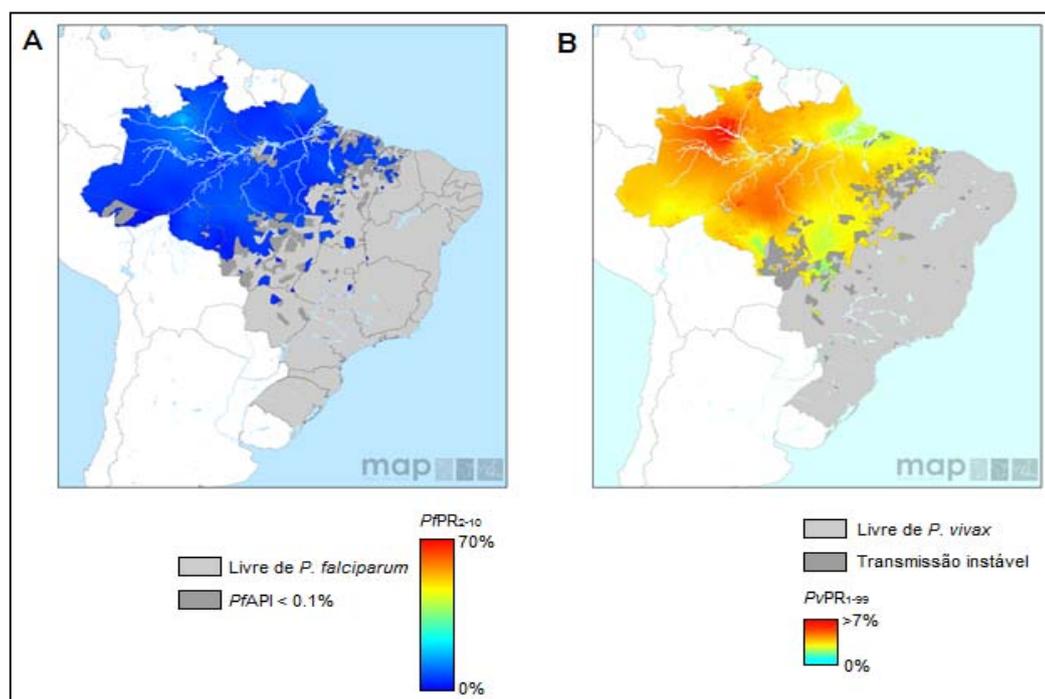


Figura 2: Distribuição da endemicidade de malária por *Plasmodium falciparum* (A) e *Plasmodium vivax* (B) no Brasil em 2010. Fonte: Malaria Atlas Project (www.map.ox.ac.uk/explore/countries/BRA/), 2013.

No Brasil, apesar de a malária ser endêmica na região da Amazônia Legal, a doença apresenta relevante impacto também nas áreas consideradas não endêmicas (Região extra-Amazônica). Estas são regiões com importância epidemiológica devido ao seu elevado potencial de disseminação pela migração

constante da população na presença do vetor, além da gravidade clínica observada em indivíduos não imunes, em casos de diagnóstico e tratamento tardios. É necessário ressaltar que, em 2011, a letalidade na Região extra-Amazônica se mostrou 108 vezes maior do que na Região Amazônica (SVS/MS, 2013). O desconhecimento da população em relação à doença e a pouca familiaridade dos profissionais de saúde para o diagnóstico e terapêutica da malária também constituem fatores importantes para um prognóstico desfavorável nestas regiões.

A transmissão de malária é instável e geralmente focal, sendo o período de maior transmissão após as estações chuvosas. A grande extensão geográfica e condições climáticas da região Amazônica favorecem a disseminação das espécies causadoras da doença. Além disso, a ocupação desordenada dos espaços peri-urbanos também tem sido relatada como importante fator na ocorrência de casos de malária em áreas urbanas (SVS/MS, 2013).

O período de transmissibilidade da malária se baseia na existência de portadores da forma sexuada do parasito (gametócitos), da presença de vetores e de indivíduos susceptíveis. Centenas de espécies de anofelinos são capazes de transmitir a doença sendo que, no Brasil, se destacam o *Anopheles darlingi*, *Anopheles aquasalis*, *Anopheles albitarsis*, *Anopheles cruzi* e *Anopheles bellator*, que se desenvolvem em águas limpas e sombreadas (SVS/MS, 2009). Transmissões de parasitos via congênita e transfusional também podem ocorrer (Osungbade & Oladunjoye, 2012; Pallavi *et al.*, 2011).

1.3 Parasitos e Ciclo Biológico

Causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, a malária possui cinco espécies que frequentemente podem parasitar o homem: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Todas podem ser encontradas no continente africano, sendo neste predominante *P. falciparum*, responsável pela forma mais grave da doença (WHO, 2012). No Brasil, *P. vivax* é a espécie predominante, com a maior parte dos casos de malária registrados. *P. knowlesi* é a espécie mais recentemente relatada como causadora de malária em humanos, infectando usualmente primatas não-humanos do continente asiático. (revisto por Singh & Daneshvar, 2013).

O ciclo biológico dos plasmódios humanos tem sido alvo de vários estudos nos últimos anos, pois envolve uma série de interações específicas entre as

diferentes formas do parasito e as células do hospedeiro, as quais culminam no sucesso da infecção e consequente transmissão da doença. Os plasmódios possuem ciclo heteroxênico, com fase assexuada ocorrendo no hospedeiro vertebrado (homem) e reprodução sexuada no hospedeiro invertebrado (anofelino). A malária é geralmente transmitida pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, que injetam formas infectantes de *Plasmodium*, chamados esporozoítos, na pele do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo, podendo estas permanecerem no local por um longo período após a picada do vetor (Amino *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007). Uma resposta imune do hospedeiro parece ser desencadeada neste momento e, os esporozoítos que conseguem escapar, atingem a circulação sanguínea.

Após caírem na corrente sanguínea, os esporozoítos seguem para os hepatócitos dando início ao ciclo pré-eritrocítico da doença, caracterizado pela reprodução assexuada dos parasitos no fígado (esquizogonia tecidual). Os esporozoítos migram através dos hepatócitos, até se estabelecerem em um deles, onde irão se desenvolver (Mota *et al.*, 2001). Os mecanismos pelos quais os esporozoítos passam dos capilares sinusóides do fígado aos hepatócitos são variados, incluindo trânsito através das células de Kupffer e das células endoteliais dos vasos sanguíneos (Ménard *et al.*, 2013).

O tempo de esquizogonia tecidual varia para cada espécie de plasmódio, sendo os parasitos, agora chamados esquizontes, mantidos em estruturas denominadas vacúolos parasitóforos durante este período (Sturm *et al.*, 2006). Algumas formas de *P. vivax* e *P. ovale* apresentam desenvolvimento lento e dão origem aos chamados hipnozoítos, que são formas latentes mantidas nos hepatócitos por meses ou anos, responsáveis pelas recaídas da doença.

Após vários ciclos de multiplicação, os esquizontes deixam os hepatócitos, sendo liberados na corrente sanguínea em vesículas chamadas merossomos (Sturm *et al.*, 2006). Estas, após algum tempo, irão se romper liberando merozoítos no sangue, que irão invadir eritrócitos dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada, o ciclo eritrocítico. Durante um período de 48 a 72 horas, os parasitos se desenvolvem no interior dos eritrócitos até seu rompimento, momento em que são liberados novos merozoítos que invadirão novos eritrócitos. Este ciclo eritrocítico é responsável pelos principais sintomas clínicos da doença, incluindo a chamada febre intermitente (White *et al.*, 2013).

Em seguida às sucessivas replicações assexuadas nos eritrócitos, os parasitos sofrem transformações morfológicas intra-eritrocíticas, se diferenciando em formas sexuadas (gametócitos), infectantes aos vetores. Gametócitos masculinos (microgametócitos) e femininos (macrogametócitos) são ingeridos pelos anofelinos no momento do repasto, seguindo para o estômago destes, onde ocorre a reprodução sexuada dos parasitos. Após desenvolverem-se em gametas que se fundem, tem-se a formação do zigoto, que se transforma em uma forma móvel denominada oocineto, a qual migra à parede do intestino médio do inseto gerando um oocisto (forma fixa), onde se desenvolvem os esporozoítos. Estes são liberados na hemolinfa do anofelino e migram para suas glândulas salivares, sendo injetados no sangue de um novo hospedeiro humano durante um novo repasto sanguíneo (Figura 3).

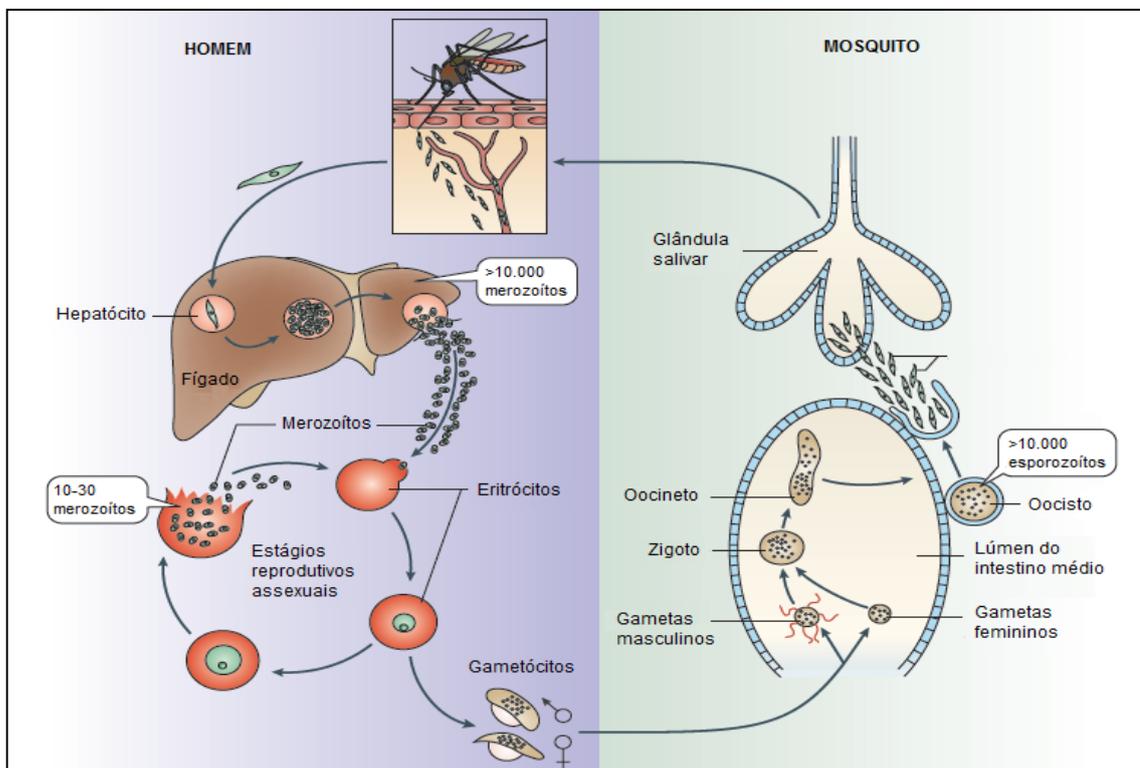


Figura 3: Desenho esquemático do ciclo de vida do *Plasmodium spp.* no hospedeiro humano e no vetor *Anopheles*. Fonte: Ménard *et al.*, 2013.

1.4 Diagnóstico Laboratorial da Malária Humana

O diagnóstico de malária é comumente realizado pelo exame microscópico do sangue, sendo este preparado em esfregaço ou gota espessa corados por Giemsa.

Além do baixo custo, esta técnica permite identificar a espécie de *Plasmodium* infectante, bem como quantificar a densidade parasitária. Entretanto, a microscopia tem apresentado lacunas que vem motivando, nos últimos anos, a busca por métodos alternativos e/ou auxiliares. Entre as propostas atualmente disponíveis tem-se os chamados testes imunocromatográficos ou testes rápidos (RDTs – *Rapid Diagnostics Tests*) e protocolos moleculares baseados em PCR, que muitas vezes tem se mostrado mais sensíveis do que a microscopia padrão.

1.4.1 Diagnóstico Microscópico

O diagnóstico de rotina para malária humana se baseia na visualização do parasito em gota espessa ou esfregaço delgado do sangue do indivíduo doente, o que possibilita a identificação das diferentes espécies causadores da doença, mesmo em diferentes estágios de vida. O exame microscópico de referência é a gota espessa corada por Giemsa, uma técnica simples e de baixo custo que também possibilita a quantificação da densidade parasitária, além de permitir o monitoramento da resposta ao tratamento contra formas sanguíneas do parasito (acompanhamento de cura), em casos de doença confirmada (Erdman & Kain, 2008).

A OMS recomenda o diagnóstico imediato de malária por microscopia ou testes imunocromatográficos (testes rápidos) em todos os pacientes com suspeita da doença antes de ser iniciado o tratamento. Nesse sentido, o número de pacientes submetidos ao exame microscópico em 2012 foi de 188 milhões, com grande maioria atribuída à Índia, a qual respondeu por mais de 120 milhões de lâminas examinadas. No que se refere à região africana, líder no número mundial de casos de malária, o número de pacientes examinados pela microscopia ainda é relativamente baixo, apesar de ter aumentado nos últimos quatro anos. Grande parte do aumento em diagnósticos nesta área se deve ao aumento do uso de testes rápidos (*Rapid Diagnostics Tests* – RDTs), que responderam por 40% dos casos avaliados em 2012 (WHO, 2013).

No Brasil, o diagnóstico microscópico pode ser feito pelas técnicas de gota espessa ou esfregaço delgado com coloração por Giemsa. A quantificação da parasitemia é realizada pelo método de avaliação semiquantitativa, caracterizada pelo registro de cruces de acordo com a quantidade de parasitos detectados na lâmina (Tabela 1). São examinados inicialmente 100 campos microscópicos,

anotando-se valores absolutos em casos de número inferior a 40 parasitos encontrados e meia cruz (+/2) em casos de 40 a 60 parasitos. Em maiores quantidades, a partir de um parasito por campo, o resultado é registrado como uma, duas, três ou quatro cruces (SVS/MS, 2009). Em seguida à contagem direta de parasitos, é feita uma estimativa da parasitemia a partir da avaliação semiquantitativa, que registra o intervalo de parasitemia por μl de sangue, com 100 campos equivalendo a 0,2 μl de sangue (Tabela 1).

Tabela 1: Estimativa da parasitemia a partir da avaliação semiquantitativa.

Parasitos por campo	Cruces	Parasitos por μl
40 a 60/100	+/2	200 - 300
1	+	301 - 500
2 - 20	++	501 - 10.000
21 - 200	+++	10.001 - 100.000
+ 200	++++	100.000 ou mais

Fonte: Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, SVS/MS (2009).

A OMS destaca como um serviço aceitável de microscopia aquele que fornece resultados precisos em tempo suficiente para ter impacto direto sobre o tratamento, além de possuir o menor custo possível. Desta forma, se faz necessário um abrangente e funcional programa de garantia da qualidade (GQ), que requer (WHO, 2012): um coordenador central para supervisionar a GQ; um grupo referência de microscopistas na liderança, com suporte de um programa externo de garantia da qualidade e com experiência em treinamento; bom sistema de treinamento com base em competências relevantes para situações clínicas; reciclagem regular com avaliação/classificação de competências; um sistema sustentável de validação de lâminas que detecte deficiências com bom *feed-back* e um sistema para lidar com o desempenho inadequado; boa supervisão em todos os níveis; boa gestão de abastecimento e manutenção de microscópios; claros procedimentos operacionais padrão (POPs); e um orçamento adequado como parte de um fundo para gestão de casos de malária.

Infelizmente, as garantias sobre a qualidade dos diagnósticos microscópicos tem apresentado falhas, sendo frequentemente observadas inadequações, o que reflete diretamente sobre a boa sensibilidade e especificidade do diagnóstico de malária, conseqüentemente afetando negativamente os resultados. Desta forma, apesar de suas vantagens e de ser considerado método de referência para o

diagnóstico de malária, o exame de gota espessa também é caracterizado por difícil leitura, exigindo tempo considerável para análise, além de equipamentos de boa qualidade e recurso humano bem capacitado, tanto para o preparo quanto para o exame das lâminas (Hanscheid, 1999; Bailey *et al.*, 2013).

Estudos recentes tem mostrado que a microscopia também possui limitações no que diz respeito a casos de baixas parasitemias e infecções mistas. O limite microscópico de detecção tem sido relatado entre 20-100 parasitos / μ l de sangue, dependendo da experiência do microscopista e outros fatores (Lucchi *et al.*, 2013; Kamau *et al.*, 2013; Polley *et al.*, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que portadores de gametócitos sub-microscópicos, os quais só podem ser detectados por métodos moleculares, também são capazes de transmitir malária (Bousema & Drakeley, 2011). Desta forma, a pouca quantidade de parasitos muitas vezes passa despercebida na análise do profissional, resultando em um diagnóstico falso-negativo. Também as similaridades morfológicas existentes entre estágios jovens dos parasitos causadores de malária de diferentes espécies podem confundir o microscopista, que acaba por apresentar um resultado errôneo, principalmente em casos de infecções mistas (Mangold *et al.*, 2005; Noedl *et al.*, 2006).

Estudos realizados em áreas endêmicas para malária tem mostrado que, em alguns locais, o número de residentes com parasitemia patente pode ser menor do que daqueles com infecções sub-patentes, que podem persistir por vários meses (Cunningham & Bosman, 2013). Além disso, tem-se que pessoas imunes infectadas por *Plasmodium* permanecem em situação de infecção sub-patente (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010). Casos como estes diminuem a sensibilidade de detecção do método de gota espessa, tornando difícil a identificação de espécies devido à baixa quantidade de parasitos, e permitem a manutenção do ciclo da doença, com tais indivíduos atuando como reservatórios (Proux *et al.*, 2011).

Tais limitações da microscopia óptica tem estimulado a busca de novos métodos que possam suprir suas deficiências, de forma a auxiliar e aprimorar o diagnóstico da doença (Brasil *et al.*, 2013; França *et al.*, 2013). Entre estes, tem-se o diagnóstico por testes imunocromatográficos rápidos, que se baseiam em proteínas do parasito no indivíduo infectado, podendo, porém, apresentar resultados falso-positivos em indivíduos tratados, já que algumas proteínas permanecem circulantes por tempo prolongado. Além disso, em muitos casos estes testes não permitem a diferenciação de espécies não *P. falciparum* ou infecções mistas (SVS/MS, 2009). Métodos moleculares também tem se mostrado promissores nos últimos anos,

detectando o material genético dos parasitos e possibilitando a identificação/diferenciação das espécies e infecções mistas (Lucchi *et al.*, 2013).

1.4.2 Diagnóstico por Testes Rápidos

O diagnóstico microscópico para malária demanda condições essenciais para a obtenção de resultados confiáveis. Dessa forma, em muitos locais são observados limitações na realização das técnicas disponíveis, seja pela precariedade dos serviços de saúde ou pela dificuldade de acesso dos indivíduos aos centros de diagnóstico. Este fato motivou o desenvolvimento de métodos mais rápidos e práticos para o diagnóstico da doença, mesmo com sensibilidade inferior à do método padrão.

Os chamados testes rápidos (*Rapid Diagnostic Tests* – RDTs), baseados na detecção de antígenos do parasito presentes no sangue do indivíduo infectado, utilizam a técnica de imunocromatografia para diagnosticar a doença. Através da utilização de anticorpos monoclonais e policlonais, a técnica é capaz de detectar proteínas do parasito, como a *Pf*-HRP2 de *P. falciparum* e as enzimas aldolase e desidrogenase láctica (pDHL) dos plasmódios (Mouatcho & Goldring, 2013).

Com sensibilidade inferior à do diagnóstico microscópico de rotina (100-200 parasitos / μ l de sangue), os testes rápidos se tornaram uma boa ferramenta para auxiliar o diagnóstico de malária, apresentando fácil manuseio e transporte, sobretudo para uso em regiões de difícil acesso (malERA, 2011). Entretanto, deficiências do método são observadas na medida em que há permanência de algumas proteínas do parasito no organismo do hospedeiro por tempo prolongado, mesmo após o tratamento, resultando em casos falso positivos. Além disso, este tipo de diagnóstico reconhece, em geral, apenas *P. falciparum*, diferenciando-o de outras espécies (consideradas como infecção não *P. falciparum*) e não contemplam infecções mistas. De qualquer modo, o diagnóstico por testes imunocromatográficos tem se mostrado de grande utilidade para triagens e confirmação de diagnósticos, principalmente para turistas que visitam áreas endêmicas e pacientes hospitalizados (SVS/MS, 2009).

1.4.3 Diagnóstico Molecular

As técnicas baseadas em ácidos nucleicos tem revolucionado a detecção e identificação de patógenos nos últimos 30 anos, com novas perspectivas para o diagnóstico de várias doenças infecto-parasitárias. A chamada PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase), desenvolvida por Kary Mullis em meados da década de 80, é capaz de identificar o material genético alvo em um processo cíclico através da geração de milhares de cópias idênticas, que poderão ser analisadas em pouco tempo (revisto por Lorenz, 2012). Considerada um método de alta sensibilidade e especificidade, o princípio da PCR está no uso de um par de iniciadores que flanqueiam uma sequência alvo de determinada espécie que, juntamente à enzima Taq polimerase, desnatura o DNA e permite a amplificação da quantidade de material genético em uma amostra.

Muitos protocolos tem sido desenvolvidos na busca por métodos alternativos e/ou auxiliares ao exame microscópico. Nesse sentido, o diagnóstico molecular tem se mostrado uma das ferramentas mais promissoras na detecção de *Plasmodium* por possuir alta sensibilidade e especificidade, alcançando até mesmo infecções subclínicas (Gama *et al.*, 2007; Demas *et al.*, 2011; Cordray & Richards-Kortum, 2012). Sequências do genoma podem ser analisadas na procura de regiões conservadas, de forma a não haver reações cruzadas com hospedeiros ou outras espécies do mesmo gênero. Além disso, sequências presentes em grande número de cópias permitem ensaios cada vez mais sensíveis (Lucchi *et al.*, 2013).

Para o diagnóstico molecular de malária, algumas variações da PCR convencional têm sido descritas, incluindo a nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993; Paglia *et al.*, 2012), com duas reações de amplificação, uma gênero e outra espécie-específica, e a PCR em tempo real (Perandin *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2012), uma espécie de refinamento da PCR original que permite o monitoramento da amplificação e análise quantitativa de ácidos nucleicos com precisão e reprodutibilidade, demonstrando maior sensibilidade e dispensando a manipulação pós-amplificação (Kubista *et al.*, 2006; Alam *et al.*, 2011).

Recentemente, um novo método molecular tem sido apresentado para o diagnóstico de malária, baseado na amplificação isotérmica do DNA (LAMP – *Loop Mediated Isothermal Amplification*). O LAMP é uma técnica simples, rápida e de baixo custo que vem demonstrando alta sensibilidade, com possibilidade de aplicação em campo, onde os recursos são escassos (Han *et al.*, 2007; Patel *et al.*,

2013; Singh *et al.*, 2013; Polley *et al.*, 2013). Os resultados são visualizados por turbidez ou fluorescência, dispensando então a manipulação pós-amplificação.

Vários estudos tem destacado a grande discrepância observada entre dados obtidos via exame microscópico e a verdadeira prevalência de parasitos, que se tornou evidente desde que os protocolos baseados em amplificação de ácidos nucléicos foram introduzidos. As subestimativas da prevalência de infecção malárica pela microscopia se tornaram mais evidentes, deixando a desejar principalmente em casos de infecções mistas (Perandin *et al.*, 2004; Proux *et al.*, 2011). Desta forma, os métodos moleculares de diagnóstico se encontram em vantagem no sentido de serem mais acurados na identificação de espécies causadoras da malária, além de detectarem densidades parasitárias muito abaixo dos limites microscópicos (Coleman, *et al.*, 2006; Lucchi *et al.*, 2013).

A PCR para diagnóstico de malária foi primeiramente descrita em 1989 por Waters & McCutchan, com base em sequências gênero e espécie-específicas na região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal dos plasmódios, gene 18S (18S rRNA). Desde então, o diagnóstico molecular para malária tem se baseado preferencialmente nesta sequência, caracterizada por regiões polimórficas flanqueadas por regiões conservadas.

Todos os organismos eucarióticos examinados inicialmente apresentavam grande número de cópias idênticas deste gene, alcançando centenas delas. Por este motivo, viu-se no 18S rRNA a oportunidade de clonagem de várias espécies de *Plasmodium*, o que facilitaria o desenho de iniciadores específicos (Snounou *et al.*, 1993). Entretanto, análises posteriores da sequência genômica dos plasmódios revelaram apenas um número de 4 a 8 cópias divergentes de 18S rRNA, dependendo da espécie (Carlton *et al.*, 2008). Levando-se em consideração que a sensibilidade de uma PCR está diretamente relacionada à quantidade inicial de sequência-alvo, tem-se que um baixo número de cópias desta no parasita limitaria a detecção deste tipo de ensaio.

Embora as sequências genômicas das espécies *P. falciparum* e *P. vivax* estejam disponíveis publicamente (PlasmoDB: www.plasmodb.org), a maioria dos métodos de diagnóstico baseados em PCR, ainda nos dias de hoje, recorre ao 18S rRNA como alvo. Entretanto, as poucas sequências deste gene no genoma das espécies de *Plasmodium* não são idênticas e se mostram variavelmente expressas durante o ciclo de vida do parasita. Buscando-se suprir a necessidade de novas opções de alvos promissores para o diagnóstico molecular de malária, recentemente

foram descritas duas sequências, *Pvr47* e *Pfr364*, presentes em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, ainda sem funções conhecidas (Demas *et al.*, 2011).

A sequência *Pfr364* está presente em 41 cópias no genoma de *P. falciparum*, cada uma delas localizada na região de repetição subteloamérica SB2, encontradas principalmente nas extremidades dos cromossomos. Por outro lado, *Pvr47* se encontra em 14 cópias no genoma de *P. vivax*, sendo dois membros dessa família localizados próximos a *vir* genes, enquanto um terceiro se encontra próximo à proteína transmembrana subteloamérica *Pvstp1*. Estes alvos foram descritos como promissores para detecção de malária *vivax* e *falciparum*, sendo avaliados apenas por PCR convencional (Demas *et al.*, 2011). A Figura 4 exemplifica a distribuição das cópias de *P. falciparum*.

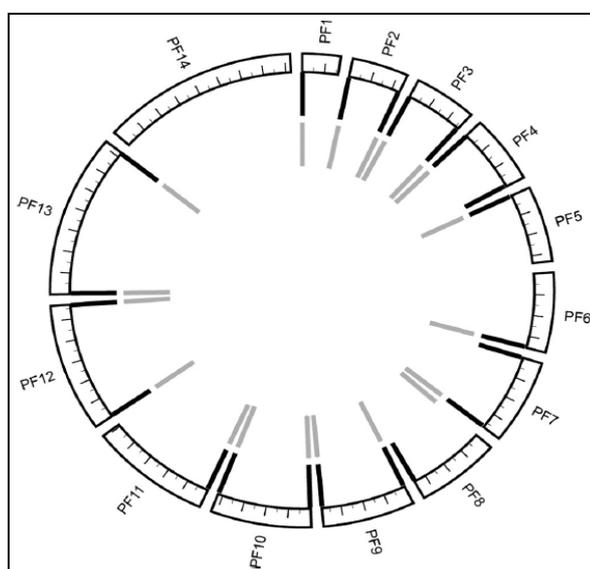


Figura 4: Distribuição espacial dos membros da família *Pfr364* nos 14 cromossomos de *P. falciparum*. Cada membro ocorre em duas cópias na maioria das extremidades dos cromossomos. Linhas pretas indicam cópias mais periféricas (subfamília 1) e linhas cinzas indicam cópias mais internas (subfamília 2). O cromossomo 6 possui três cópias em sua extremidade 3' (apenas duas são mostradas). Fonte: Demas *et al.*, 2011.

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico de malária é um dos pilares dos programas de prevenção e controle da doença em todo o mundo. Um diagnóstico eficiente propicia a identificação precoce dos casos e permite a caracterização da espécie, importante para a definição do esquema terapêutico (WHO, 2013). Estima-se que um diagnóstico de qualidade seja capaz de evitar cerca de 100 mil mortes por malária e mais de 360 milhões de tratamentos desnecessários (Rafael *et al.*, 2006). Além disso, um diagnóstico correto é essencial para a realização de estudos epidemiológicos, direcionando projetos, implementação e monitoramento de medidas de controle (Proux *et al.*, 2011; SVS/MS, 2013).

Na busca por técnicas cada vez mais sensíveis e específicas, vários métodos tem sido utilizados para o diagnóstico de malária. Atualmente, estão disponíveis ferramentas moleculares, imunológicas e microscópicas, sendo esta última estabelecida como padrão-ouro em todo o mundo, através do exame de gota espessa corada por Giemsa (Hanscheid *et al.*, 1999; SVS/MS, 2010b). Apesar de ocupar posição de destaque entre as outras técnicas, o diagnóstico microscópico de rotina apresenta muitas limitações. Além da boa qualidade do material preparado para leitura e interpretação dos resultados, deve-se contar com microscopistas experientes, eficientes na detecção dos parasitos, mesmo em casos de infecções mistas ou baixas parasitemias. Estudos prévios têm demonstrado que, mesmo em diagnósticos realizados por excelentes microscopistas, há ocorrência de erros ou inconclusões, causados principalmente pela semelhança morfológica entre as espécies e/ou pouca quantidade de parasitos (Hanscheid, 2003; Proux *et al.*, 2011).

Um método de diagnóstico ideal deve ser de fácil e rápido desempenho, possuindo altos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia, sendo capaz de quantificar uma parasitemia. Além disso, deve apresentar o menor custo possível (Hanscheid & Grobusch, 2002). Entretanto, diante da inexistência de uma técnica que apresente todas estas características para o diagnóstico de malária até o presente momento, tem-se procurado pelo que mais se aproxima deste ideal, com melhor custo-benefício.

Até o momento, a maior parte dos estudos que avaliam os índices de validade de métodos moleculares para o diagnóstico de malária tem utilizado curvas de titulação realizadas com DNA plasmidial ou de cultivo (no caso de *P. falciparum*), os

quais apresentam amplificação facilitada em comparação ao DNA proveniente de amostras de campo (Mangold *et al.*, 2005; Kamau *et al.*, 2013). Poucos trabalhos tem avaliado o desempenho de diferentes protocolos de PCR em função da densidade parasitária e casos de infecções mistas em populações naturalmente infectadas. Assim sendo, estudos desta natureza se fazem necessários.

Apesar de os diferentes protocolos de PCR desenvolvidos até o momento não se mostrarem ideais para o diagnóstico individual de malária aguda, esta técnica tem sido uma excelente ferramenta para estudos epidemiológicos, quimioterápicos e de vacinas, além de auxiliarem o diagnóstico microscópico em casos de inconclusões. Portanto, tendo-se em vista que o diagnóstico precoce aliado a uma terapia eficaz é essencial para a redução das taxas de morbidade e mortalidade da doença, espera-se que o desenvolvimento e utilização de métodos cada vez mais sensíveis e específicos possibilitem diagnósticos mais rápidos e precisos, assegurando o tratamento adequado imediato e, conseqüentemente, prevenindo a disseminação da doença.

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo de PCR em Tempo Real para validar os alvos Pvr47 e Pfr364 para o diagnóstico de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, com ênfase em infecções mistas e baixas parasitemias.

3.2 Objetivos específicos

- Desenhar iniciadores específicos para detecção do DNA das espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, com base nos alvos descritos por DEMAS *et al.* (2011);
- Padronizar a PCR em Tempo Real com os iniciadores desenhados, de forma a identificar e distinguir as infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* em amostras de sangue de indivíduos naturalmente infectados;
- Avaliar a eficiência da PCR em Tempo Real padronizada para detecção de baixas parasitemias e infecções mistas, utilizando-se amostras de área endêmica e não endêmica para malária;
- Comparar o desempenho da PCR em Tempo Real padronizada com o diagnóstico realizado por outras técnicas de PCR estabelecidas: nested-PCR (baseada no protocolo descrito por Snounou *et al.*, 1993), PCR convencional (baseada no protocolo descrito por Demas *et al.*, 2011) e PCR em Tempo Real (baseada no protocolo descrito por Mangold *et al.*, 2005).

4.1 População de estudo

Este estudo foi conduzido com 280 amostras de DNA extraídas do sangue de indivíduos recrutados por busca ativa e passiva, cujo diagnóstico microscópico foi realizado em serviços de Referência de Minas Gerais (área não endêmica) ou da Amazônia (área endêmica). Os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Protocolos CEP CPqRR N° 24/2008 e 358.698/2013; Anexo 8.1). A todos os indivíduos participantes foram prestados esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos deste trabalho, sendo a participação voluntária.

4.2 Voluntários e coleta de sangue

Este projeto foi desenvolvido com amostras de sangue dos voluntários, sendo a coleta realizada após consentimento por escrito, conforme protocolo bem estabelecido pelo grupo de pesquisa (Kano *et al.*, 2012), sem restrição quanto ao sexo, cor e nível sócio-econômico dos indivíduos. Os critérios de inclusão no estudo foram: (1) ausência de sinais ou sintomas relacionados à malária clínica grave, tais como confusão mental; (2) em caso de sexo feminino, relato de ausência de gravidez. De todos os indivíduos foram confeccionadas gotas espessas e/ou esfregaços sanguíneos e, aqueles com parasitas circulantes, foram encaminhados para tratamento imediato nos serviços de saúde locais. Para as amostras provenientes de área endêmica, foi realizada punção venosa em cada paciente, obtendo-se cerca de 5 a 10 ml de sangue. Já para as amostras de área não endêmica, o sangue foi coletado em papel de filtro através de punção digital, sendo este armazenado em papel alumínio e enviado ao CPqRR via correio. Neste caso, utilizou-se a mesma punção digital feita para confecção de gotas e esfregaços sanguíneos (diagnóstico microscópico). O sangue foi coletado por profissionais de saúde que compõem a equipe de pesquisa local – tais como médicos, farmacêuticos e auxiliares de enfermagem – os quais tem treinamento específico e possuem

experiência nestes tipos de coleta. O sangue obtido foi utilizado para obtenção de DNA, sendo esta etapa realizada no Laboratório de Malária do CPqRR.

4.3 Amostras

4.3.1 Amostras de área não endêmica para malária

O estudo incluiu 107 amostras de DNA genômico extraído do sangue de indivíduos com suspeita de malária que procuraram o Laboratório de Referência em Malária do Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia, em Minas Gerais, no período de Novembro de 2009 a Dezembro de 2013. O diagnóstico microscópico foi realizado imediatamente ao atendimento pelo laboratório de Uberlândia e o tratamento dos casos positivos foi realizado de acordo com protocolos preconizados pelo Ministério da Saúde sob supervisão de Jean E. Limongi, colaborador neste projeto. Para o diagnóstico molecular, gotas de sangue foram coletadas em papel de filtro, sendo o material enviado ao Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou. Também foram incluídas 10 amostras de DNA positivas para malária pelo exame microscópico, provenientes do Serviço de Referência de Belo Horizonte (Faculdade de Medicina da UFMG), as quais já se encontravam devidamente armazenadas no nosso laboratório desde o ano de 2009 (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária de indivíduos de área não endêmica para malária.

Amostras		MO*	N amostral	%
Positivas (n = 42)	Infecção única	1 - 199	6	5
		200 - 300	7	6
		301 - 500	3	3
		501 - 10.000	18	15
	Infecção mista	-	8	7
Negativas		-	75	64
Total			117	100

*Parasitas/ μ l de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO), através do método semiquantitativo. Infecção única = positiva para *P. vivax* ou *P. falciparum*; Infecção mista = positiva para *P. vivax* e *P. falciparum*.

4.3.2 Amostras de área endêmica para malária

Foram incluídas neste estudo 153 amostras de DNA genômico extraído do sangue de indivíduos residentes na comunidade de Rio Pardo (AM), onde nosso grupo de pesquisa tem conduzido um estudo longitudinal (Kano *et al.*, 2012). A comunidade se localiza a 139 km de Manaus via BR-174, sentido Boa Vista-RR, a 40 km do município Presidente Figueiredo. Um total de 10 amostras de DNA extraído do sangue de indivíduos provenientes de Cuiabá (MT) e Porto Velho (RO) também foram utilizadas neste estudo em colaboração com o Dr. Cor Jesus Fernandes Fontes, da Universidade Federal do Mato Grosso, cujo laboratório realiza diagnóstico por microscopia convencional e tratamento específico para malária, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde. Estas foram positivas para malária pelo exame microscópico realizado anteriormente. As amostras coletadas pelo nosso grupo de pesquisa em Rio Pardo e as amostras enviadas pelo Dr. Cor são listadas na Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição da frequência de amostras positivas e negativas para malária em função da densidade parasitária de indivíduos de área endêmica para malária.

Amostras		MO*	N amostral	%
Positivas (n = 34)	Infecção única	1 - 199	7	4
		200 - 300	7	4
		301 - 500	2	1
		501 - 10.000	12	8
		10.001 - 100.000	4	3
		>100.000	2	1
	Infecção mista	-	0	0
Negativas		-	129	79
Total			163	100

*Parasitas/ μ l de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO), através do método semiquantitativo. Infecção única = positiva para *P. vivax* ou *P. falciparum*; Infecção mista = positiva para *P. vivax* e *P. falciparum*.

4.4 Diagnóstico microscópico

Para o diagnóstico microscópico utilizou-se a técnica de gota espessa. As lâminas de cada paciente foram preparadas e examinadas por microscopistas bem capacitados dos Laboratórios de Referência em Minas Gerais (Uberlândia e Belo Horizonte) e na área endêmica (AM, MT e RO). As lâminas foram consideradas

positivas ou negativas após o exame de 200 campos microscópicos (600-1000x), sendo as positivas avaliadas para a espécie de *Plasmodium* e quantificadas pela densidade parasitária. Todo paciente positivo para malária foi tratado no próprio serviço de referência por pessoal autorizado na unidade, de acordo com protocolos preconizados pelo Ministério da Saúde (Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil, SVS/MS, 2010).

A distribuição por idade e sexo dos 280 indivíduos incluídos neste estudo está listada na Tabela 4. Foi obtida uma mediana de idade de 33 anos e proporção de homens e mulheres em 2,42:1. Segundo o exame microscópico de rotina, 76 sujeitos (27%) se encontravam infectados por alguma espécie de *Plasmodium*, sendo 45 (16%) infecções decorrentes de *P. vivax*, 23 (8%) decorrentes de *P. falciparum* e 8 (3%) de infecções mistas pelas duas espécies.

Tabela 4: Dados demográficos e epidemiológicos dos 280 indivíduos envolvidos neste estudo, com prevalências determinadas pela microscopia óptica.

Característica	
Mediana de idade em anos (intervalo)	33 (0,75-67)
Gênero (M:F)	2,42:1
Prevalência de malária, n (%)	
<i>P. vivax</i>	45 (16)
<i>P. falciparum</i>	23 (8)
<i>P. vivax</i> + <i>P. falciparum</i>	8 (3)
Total	76 (27)
Negativos	204 (73)

4.5 Extração de DNA

4.5.1 Extração de DNA a partir de sangue em papel de filtro

Para as amostras estocadas em papel de filtro, o DNA do parasito foi extraído do sangue total seco em papel através do kit para extração de DNA em papel de filtro QIAGEN *QIAamp*[®] *DNA Mini Kit* (PUREGENE[®], Genra Systems, Minneapolis, USA), de acordo com instruções do fabricante. Resumidamente, círculos de sangue em papel de filtro (aproximadamente 30µl de sangue/papel) foram cortados e colocados em microtubos de 1,5ml do tipo *ependorf*. Em seguida, adicionou-se 180µl de tampão de lise celular aos tubos, sendo estes incubados a 85°C por 10

minutos. Acrescentou-se, então, 20µl da solução de proteinase K com homogeneização por 30 segundos em agitador de tubos (*vórtex*), sendo posteriormente incubados a 56°C por uma hora.

Após a incubação, foram adicionados 200µl de tampão de lise às amostras, sendo os tubos homogeneizados novamente por 30 segundos em *vórtex* e incubados a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200µl de etanol 100% gelado (4°C) ao material, que foi homogeneizado e colocado em colunas *QIAamp spin* agregadas a tubos de coleta de 2ml. As colunas foram centrifugadas a 800xg por 1 minuto à temperatura ambiente, sendo posteriormente descartados os tubos contendo filtrados. Novos tubos de 2ml foram acoplados às colunas, seguindo-se adição de 500µl de tampão para lavagem do DNA, com centrifugação a 800xg por 1 minuto à temperatura ambiente. Novamente, as colunas foram colocadas em novos tubos de 2ml, com descarte dos tubos contendo os filtrados. Foram adicionados 500µl de tampão para uma segunda lavagem do material e os tubos foram centrifugados a 1500xg por 3 minutos à temperatura ambiente. As colunas foram colocadas em novos *ependorfs* de 1,5ml e os tubos contendo filtrados foram descartados. Por fim, acrescentou-se 150µl de água destilada para eluir o DNA, seguido por incubação à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugação a 800xg por 1 minuto. As colunas foram descartadas e o material obtido foi armazenado a -20°C até o uso.

4.5.2 Extração de DNA a partir de sangue total

Para as amostras de punção venosa, o DNA do parasito foi extraído do sangue total através do kit QIAGEN (PUREGENE[®], Genra Systems, Minneapolis, USA), seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, para cada 1ml de sangue total, foram acrescentados 3ml de solução de lise para eritrócitos em tubos de 15ml (Falcon). Após lise visível (aproximadamente 10 minutos), o material foi centrifugado a 2000xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspendido em 1ml de solução de lise celular. Em seguida, foram adicionados 300µl de solução de precipitação de proteína, sendo o material submetido à agitação em *vórtex* por 30 segundos e centrifugação a 2000xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi colocado em tubos com 1ml de isopropanol P.A gelado (Merck) para precipitação. Posteriormente, o DNA foi centrifugado a 2000xg por 3

minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. Adicionou-se, então, 1ml de etanol 70% para lavagem do DNA seguido de centrifugação a 2000xg por 1 minuto, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi novamente descartado e, após completa evaporação do etanol (aproximadamente 20min), o DNA foi hidratado com 330µl de solução de hidratação (Tris-hidrometil aminometano, EDTA), sendo por fim incubado por 1 hora a 65°C. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso.

4.6 PCR em Tempo Real para os alvos Pvr47 e Pfr364

4.6.1 Desenho de iniciadores para os alvos Pvr47 e Pfr364

Os iniciadores para a Real-Time PCR foram desenhados através dos programas *OLIGO* (versão 4.0, 1999) e *Primer-Blast* (NCBI), observando-se regiões conservadas nos alinhamentos de cada espécie (Figuras 5 e 6). Os alinhamentos foram realizados com base nas sequências disponibilizadas por Demas *et al.* (2011), sendo 14 cópias da família Pvr47 (*P. vivax*) e 41 cópias da família Pfr364 (subfamílias 1 e 2 de *P. falciparum*).

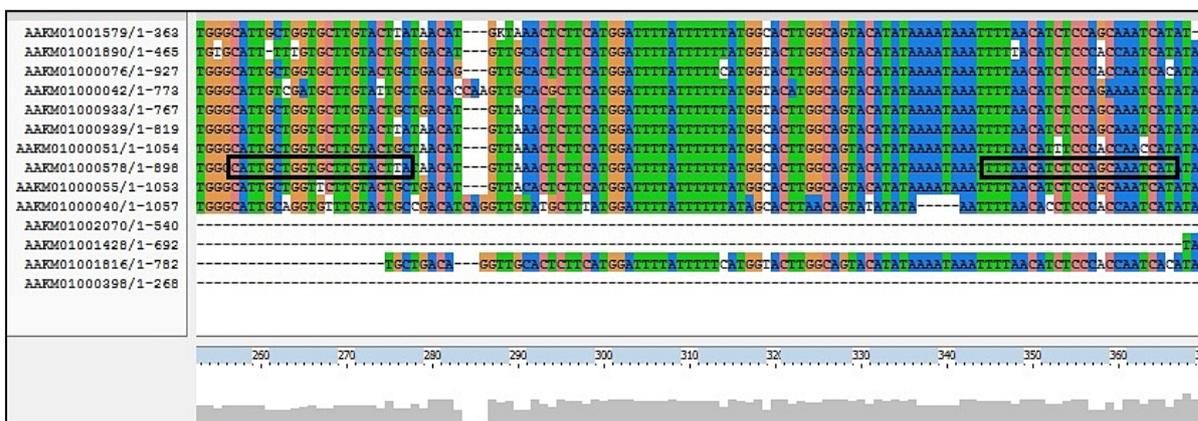


Figura 5: Alinhamento das 14 cópias de Pvr47 no genoma de *P. vivax*, com destaque em preto para as regiões onde foram desenhados os iniciadores (*Foward* e *Reverse*, respectivamente). FONTE: Adaptado de Demas *et al.*, 2011.

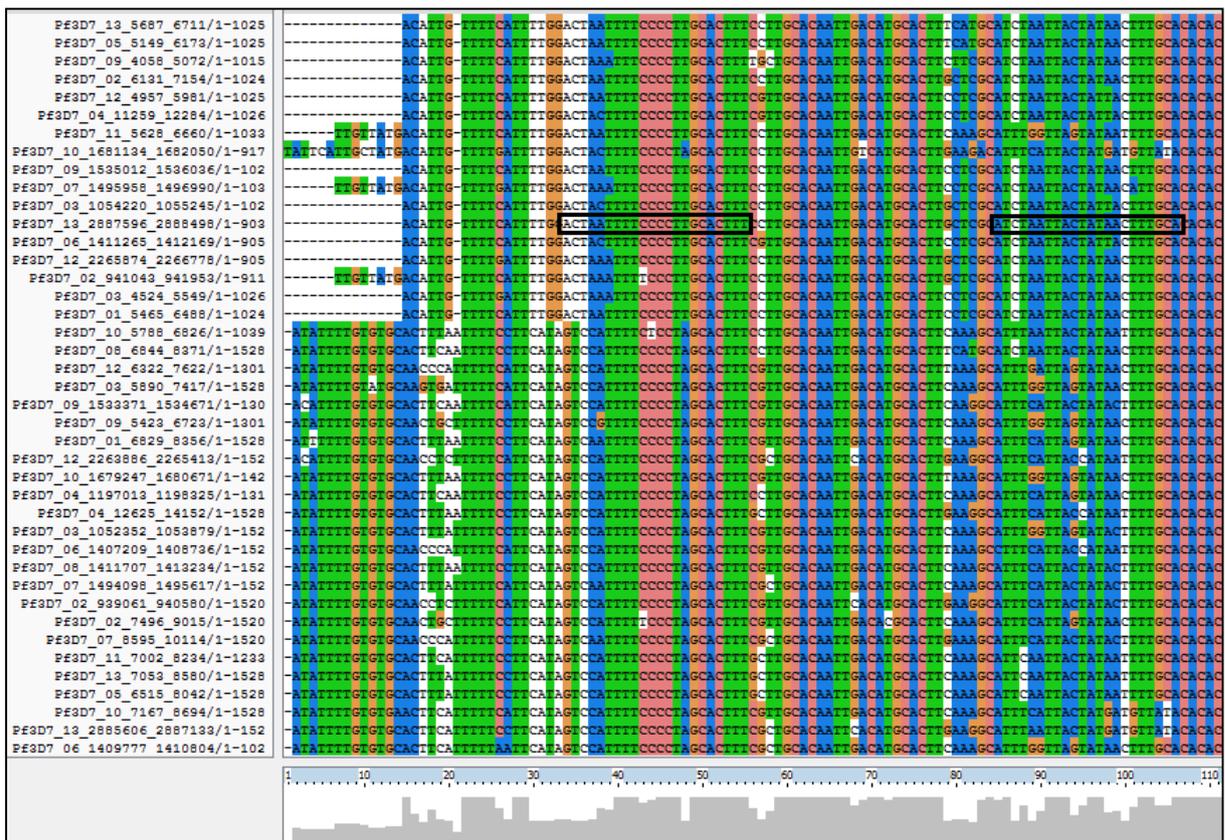


Figura 6: Alinhamento das 41 cópias de Pfr364 no genoma de *P. falciparum* (subfamílias 1 e 2), com destaque em preto para as regiões onde foram desenhados os iniciadores (*Foward* e *Reverse*, respectivamente). FONTE: Adaptado de Demas *et al*, 2011.

Para o alvo Pvr47 foi obtido o par 5'CATTGCTGGTGCTTGTACTTA3' (*foward*) e 5'ATGATTTGCTGGAGATGTTAAA3' (*reverse*), que se liga respectivamente às posições 255-275 e 340-361 do genoma do parasito, resultando em um amplificado de 107 pb. Já para o alvo Pfr364 foi obtido o par 5'ACTAATTTTCCCCTTGCACCTT3' (*foward*) e 5'TGCAAAGTTATAGTAATTAGAT3' (*reverse*), que se liga às posições 19-40 e 70-91 do genoma, respectivamente, resultando em um amplificado de 73 pb. Os pares de iniciadores e as condições estabelecidas nas reações padronizadas são especificados na Tabela 5.

Tabela 5: Resumo dos iniciadores utilizados para as reações de Real-Time PCR padronizadas no Laboratório de Malária do Centro de Pesquisas René Rachou.

Parasita alvo	Iniciador	Sequência	Tm
<i>P. vivax</i>	PvDig F	5'CATTGCTGGTGCTTGTACTTA3'	72.7 a 74.1°C
	PvDig R	5'ATGATTTGCTGGAGATGTTAAA3'	
<i>P. falciparum</i>	PfDig F	5'ACTAATTTTCCCCTTGCACCTT3'	75.6 a 77.7°C
	PfDig R	5'TGCAAAGTTATAGTAATTAGAT3'	

*Temperatura de *melting*

4.6.2 Padronização da PCR em Tempo Real para amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 (RT-LAMAL)

A reação de PCR em Tempo Real com os iniciadores desenhados para os alvos Pvr47 e Pfr364 foi padronizada em um *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da Plataforma de PCR em Tempo Real do Centro de Pesquisas René Rachou. Os reagentes foram avaliados em diferentes volumes na reação. Iniciadores foram testados em concentrações variando de 0,25µM a 1µM; presença de diferentes concentrações de MgCl₂; SYBR® Green PCR Master Mix nos volumes de 5µl a 10µl. As condições de volume e concentração dos reagentes estabelecidos foram diferentes para cada par de iniciador (*P. vivax* e *P. falciparum*). Diferentes temperaturas para anelamento dos iniciadores foram testadas na reação, sendo estas de 54°C a 60°C.

As reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos e as amostras foram feitas em duplicata. Como controles negativos foram utilizados todos os reagentes na ausência de DNA, sendo este substituído por água deionizada para PCR (SIGMA). Como controles positivos foram utilizados DNA de *P. falciparum* proveniente de cepa referência de cultivo contínuo estabelecido no Laboratório de Malária do CPqRR e DNA de indivíduos sabidamente infectados por *P. vivax* com parasitemias confirmadas pela microscopia óptica e outros protocolos de PCR. Amostras com resultado duvidoso foram submetidas a uma segunda reação.

4.7 Outros protocolos de PCR

4.7.1 Amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 por PCR convencional (PCR-Demas)

A técnica foi estabelecida em reações separadas, de acordo com o protocolo modificado de Demas *et al.* (2011), utilizando-se os iniciadores desenhados para os alvos Pvr47 e Pfr364 na reação de multiplex descrita (Tabela 6). Os volumes e concentrações dos reagentes, bem como as condições de amplificação da PCR, foram os mesmos para as duas reações (*P. vivax* e *P. falciparum*): 0,5µM de cada iniciador (IDT), 0,3µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 125µM de dNTP

(Invitrogen), 1,0µl de Tampão 10x (Invitrogen), 0,75mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 1,0µl de DNA, em um total de 10µl por reação.

Tabela 6: Resumo dos iniciadores utilizados para a reação de PCR Convencional (Demas *et al.*, 2011) e amplicons gerados.

Parasita alvo	Iniciador	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do amplicon
<i>P. vivax</i>	Pvr47 F	5' CTGATTTTCCGCGTAACAATG 3'	333 pb
	Pvr47 R	5' CAAATGTAGCATAAAAATCYAAG 3'	
<i>P. falciparum</i>	Pfr364 F	5' CCGGAAATTCGGGTTTTAGAC 3'	220 pb
	Pfr364 R	5'GCTTTGAAGTGCATGTGAATTGTGCAC3'	

As condições da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por amplificação com 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Uma extensão final consistiu de 72°C por 5 minutos. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100™, versão 7.0 (MJ Research) e os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Agargen), sendo esta dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), com adição de solução de a10mg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras foram misturadas em tampão de amostra Orange 5x (Alaranjado G VETEC e Ficoll SIGMA) e a corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal (Bio-Rad) a 110V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi posteriormente analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e a imagem obtida foi arquivada em sistema digital. Todas as reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos, conforme descrito no item 4.6.2.

4.7.2 Amplificação do gene 18S rRNA por PCR em Tempo Real (RT-Mangold)

As amostras foram avaliadas pela técnica de PCR em Tempo Real descrita por Mangold *et al.* (2005), realizada em placas de 96 poços vedadas com selos ópticos. Os iniciadores utilizados foram os previamente descritos pelos autores (P1 e P2), desenhados para o gene 18S rRNA, com as seguintes condições de volume e concentração dos reagentes: 0,5µM de cada iniciador (IDT), 10µl de SYBR® Green PCR Master Mix (SYBR Green 2x, AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTP com dUTP, referência passiva (ROX) e componentes do tampão otimizados – Applied

Biosystems), acrescido de 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 2µl de DNA, em um total de 20µl por reação. As amplificações foram realizadas nos equipamentos *ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, versão 1.2.3) e *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da Plataforma de PCR em Tempo Real do Centro de Pesquisas René Rachou.

As condições da reação consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por amplificação com 40 ciclos de 90°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de dissociação consistindo em 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos. As curvas de *melting* foram observadas na dissociação resultando de avaliação de fluorescência contínua (F) a 530nm enquanto a temperatura aumentava gradualmente de 60 para 95°C. Os gráficos de *melting* foram visualizados plotando a derivativa negativa de fluorescência pela temperatura (-dF/dT° vs. T°). O par de iniciadores e as condições estabelecidas nesta reação são especificados na Tabela 7.

Tabela 7: Resumo dos iniciadores utilizados para a reação de Real-Time PCR descrita por Mangold *et al.*, 2005.

Parasita alvo	Iniciador	Sequência	Tm*
<i>Plasmodium sp.</i>	Primer 1	5' TAACGAACGAGATCTTAA 3'	<i>P. vivax</i> : 79.0 a 81.0°C <i>P. falciparum</i> : 75.5 a 77.5°C <i>P. malariae</i> : 73.5 a 75.5°C <i>P. ovale</i> : 77.5 a 79.0°C
	Primer 2	5' GTTCCTCTAAGAAGCTTT 3'	

*Temperatura de *melting*

Todas as reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos, conforme descrito no item 4.6.2. DNA plasmidial de *P. malariae* Referência do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária – ATCC, USA) e DNA de indivíduo sabidamente infectado com *P. ovale* (proveniente do Centro de Saúde de Uberlândia/MG), com parasitemia confirmada pela microscopia óptica, também foram utilizados como controles.

4.7.3 Amplificação do gene 18S rRNA por Nested-PCR (Nested-Snounou)

As amostras foram submetidas também a uma nested-PCR, estabelecida por Snounou *et al.* (1993), utilizando-se os iniciadores rPLU5 e rPLU6 para a reação gênero-específica (referente à *Plasmodium*) e posteriormente os pares rFAL1-rFAL2, rVIV1-rVIV2, rMAL1-rMAL2 e rOVA1-rOVA2 foram utilizados para as reações espécie-específicas (referentes à *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, respectivamente) (Tabela 8). As condições de volume e concentração dos reagentes utilizados foram: 0,25µM de cada iniciador (IDT), 10µl de PCR Master Mix (Promega - 0,3U de Taq DNA Polimerase, 200µM de cada um dos dNTPs e 1,5mM MgCl₂) e 0,8µl de amostra de DNA, em um total de 20µl por reação. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100TM, versão 7.0 (MJ Research).

As condições da PCR para a primeira reação consistiram em desnaturação e extensão inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguida por amplificação com 24 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos. Ainda uma extensão final consistiu de 58°C por 2 minutos e 72°C por 5 minutos. Para a segunda reação, as condições de amplificação foram as mesmas da primeira, diferindo apenas no número de ciclos, que foram 29. Os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Agargen), sendo esta dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), com adição de solução de 10mg/ml de brometo de etídio (Invitrogen). As amostras foram misturadas em tampão de amostra Orange 5x (Alaranjado G VETEC e Ficoll SIGMA) e a corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal (Bio-Rad) a 110V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi posteriormente analisado em transluminador ultravioleta (UVP - Bio-Doc it System) e a imagem obtida foi arquivada em sistema digital. Todas as reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos, conforme descrito no item 4.7.2.

Tabela 8: Resumo dos iniciadores utilizados para a reação de Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993) e tamanho da sequência amplificada por cada um.

Parasita alvo	Iniciador	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do amplicon
<i>Plasmodium sp.</i>	rPLU 05	5' CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC 3'	1,2 Kb
	rPLU 06	5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG 3'	
<i>Plasmodium vivax</i>	rVIV 1	5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATA 3'	120 pb
	rVIV 2	5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3'	
<i>Plasmodium falciparum</i>	rFAL 1	5' TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3'	205 pb
	rFAL 2	5' ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC 3'	
<i>Plasmodium malariae</i>	rMAL 1	5' ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATACCGC 3'	144 pb
	rMAL 2	5' AAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA 3'	
<i>Plasmodium ovale</i>	rOVA 1	5' ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTAT T GGAGA 3'	800 pb
	rOVA 2	5' GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG 3'	

4.8 Titulação de amostras de DNA de *P. vivax* e *P. falciparum*

Visando determinar o limite de positividade dos diferentes protocolos de PCR, duas amostras de DNA, sabidamente infectadas por *P. vivax* e *P. falciparum*, foram tituladas. A amostra escolhida para *P. vivax* consistiu na parasitemia de 7620 p/μl de sangue, enquanto a de *P. falciparum* se caracterizava por 6415 p/μl de sangue. As diluições sucessivas foram realizadas em 5x, iniciando em 1:50 até 1:156250, e as quantidades de parasitos equivalentes a cada uma das diluições para cada amostra são relacionadas na Tabela 9. As diluições foram submetidas a quatro protocolos de PCR (Nested-Snounou, RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL), sendo realizadas duas repetições.

Tabela 9: Diluições de DNA sucessivas utilizadas para titulação de amostras sabidamente infectadas com *P. vivax* e *P. falciparum* e suas respectivas quantidades de parasitos.

Amostras	Parasitemia*	Diluições Seriadas (5x)					
		1:50	1:250	1:1250	1:6250	1:31250	1:156250
<i>Plasmodium vivax</i>	7620 p/μl	152,4	30,48	6,096	1,2192	0,24384	0,048768
<i>Plasmodium falciparum</i>	6415 p/μl	128,3	25,66	5,132	1,0264	0,20528	0,041056

*Determinada pelo exame microscópico de gota espessa.

4.9 Misturas artificiais de DNA de *P. vivax* e *P. falciparum*

Misturas artificiais de DNA de *P. falciparum* e *P. vivax* foram realizadas com o intuito de avaliar a capacidade dos diferentes protocolos de PCR para detectar ambas as infecções, mesmo em casos de um parasita estar em quantidade superior à do outro. As amostras utilizadas foram as tituladas anteriormente, sendo avaliadas em mistura nas mesmas condições de diluição da titulação.

Duas misturas de DNA foram realizadas. Na primeira, *P. falciparum* foi diluído serialmente (1:50 a 1:156250), enquanto *P. vivax* foi mantido na diluição de 1:50. Já na segunda mistura, *P. vivax* foi diluído serialmente a partir de 1:50, enquanto *P. falciparum* foi mantido em 1:50. As misturas foram submetidas aos quatro protocolos de PCR (Nested-Snounou, RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL).

Um segundo teste foi realizado, de modo a avaliar a detecção de DNA dos parasitos em situações de mesma parasitemia (determinadas pelo método de cruzes). Foram utilizadas 11 amostras sabidamente infectadas por *P. vivax* e 15 sabidamente infectadas por *P. falciparum*. Quantidades iguais de cada amostra foram utilizadas para confecção das misturas artificiais, sendo estas posteriormente submetidas aos quatro protocolos de PCR (Nested-Snounou, RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL). As amostras e respectivas parasitemias são descritas na Tabela 10.

Tabela 10: Misturas artificiais de DNA com suas respectivas parasitemias, utilizadas para avaliação da detecção de *P. vivax* e *P. falciparum* pelos quatro diferentes protocolos de PCR.

Mistura artificial (5 de cada parasitemia)	Parasitemia
<i>P_v</i> + <i>P_f</i>	½ +
<i>P_v</i> + <i>P_f</i>	+ / +
<i>P_v</i> + <i>P_f</i>	++ / ++
<i>P_v</i> + <i>P_f</i>	+++ / +++

P_v + *P_f* = infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*.

4.10 Análises estatísticas

Visando comparar diferentes proporções, foi utilizado o teste qui-quadrado, método não paramétrico para comparação das possíveis diferenças entre as

frequências observadas e esperadas para determinado evento. Este método busca um valor de dispersão para duas variáveis nominais, avaliando a associação entre elas. Neste caso, avaliou-se possíveis diferenças entre os resultados obtidos para os quatro diferentes protocolos moleculares e a microscopia, com nível de significância de $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas através do programa GraphPad InStat, versão 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

A validação de cada uma das técnicas moleculares utilizadas foi feita a partir dos índices estatísticos de sensibilidade e especificidade. A sensibilidade faz referência à probabilidade de um teste ser positivo dado que o indivíduo está realmente infectado, ou seja, quanto menor a proporção de falsos negativos, maior é a sensibilidade. Já a especificidade se refere à probabilidade de um teste ser negativo dado que o indivíduo não está infectado, ou seja, quanto menor a proporção de falsos positivos, maior é a especificidade (Figura 7). Para estas análises, foram considerados verdadeiros positivos ou verdadeiros negativos as amostras com resultado positivo ou negativo concordantes no exame microscópico e Nested-Snounou ($n=255$), já que o primeiro é estabelecido como padrão-ouro no diagnóstico de malária e o segundo é considerado referência no diagnóstico molecular.

		DOENÇA		Total
		PRESENTE	AUSENTE	
TESTE	POSITIVO	a verdadeiro positivo	b falso positivo	a + b
	NEGATIVO	c falso negativo	d verdadeiro negativo	c + d
Total		a + c	b + d	N (a+b+c+d)

Sensibilidade = $a / (a+c)$
 Especificidade = $d / (b+d)$

Figura 7: Desenho esquemático das análises estatísticas de sensibilidade e especificidade para um teste de diagnóstico. Foram considerados verdadeiros positivos ou verdadeiros negativos as amostras com resultado positivo ou negativo concordantes no exame microscópico e Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993).

Foram avaliados os valores preditivos dos testes aplicados, os quais fazem referência à extensão com que cada teste é capaz de prever a ocorrência da

doença. O *Valor de Predição Positivo* (VPP) determina a proporção de verdadeiros infectados entre os positivos pelo teste ($VPP=a/a+b$). Já o *Valor de Predição Negativo* (VPN), se refere à proporção de verdadeiros sadios entre os negativos ($VPN=d/c+d$). Também foi calculada a *Acurácia* (AC) de cada protocolo, que demonstra o grau em que determinado teste ou uma estimativa baseada neste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido, ou seja, a acurácia nos informa se os resultados obtidos representam a realidade ou o quanto estes se afastam dela ($AC=a+d/N$).

Para avaliar a concordância entre os diferentes protocolos de PCR e a referência (microscopia + nested PCR) foi utilizado o coeficiente estatístico *Kappa* (κ), que estabelece o grau de concordância em escalas nominais, revelando o quanto as proporções observadas se afastam das esperadas. Este coeficiente expressa a confiabilidade de um teste, levando em consideração a concordância fruto do acaso, e foi calculado a partir da proporção de concordâncias observadas diminuída da proporção de concordâncias esperadas, dividida por 1 menos a proporção de concordâncias esperadas ($\kappa=P_o-P_e/1-P_e$). Os valores de Kappa podem variar de 0 a 1, sendo 0 relativo à nenhum grau de concordância e 1 referente à concordância perfeita.

Para direcionar a escolha de um dos testes diagnósticos avaliados, foi utilizado o *Índice de Youden* (J), que sugere como melhor método aquele que apresentar a menor soma das proporções de erros de classificação (maior valor do índice, sendo o ideal igual a 1). A expressão algébrica deste índice é definida como $J=1-(\alpha+\beta)$, sendo α o erro de classificação obtido para a especificidade e β o erro de classificação obtido para a sensibilidade de cada protocolo.

5.1 Padronização da PCR em Tempo Real para os alvos Pvr47 e Pfr364

A reação da RT-LAMAL foi padronizada para os alvos de *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as condições dos reagentes estabelecidas de forma diferente para cada par de iniciador. Para amplificação da sequência de *P. vivax*, foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 0,25µM de cada iniciador (IDT), 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix (SYBR Green 2x, AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTP com dUTP, referência passiva (ROX) e componentes do tampão otimizados – Applied Biosystems), acrescido de 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 2µl de DNA, em um total de 20µl por reação. Já para amplificação da sequência de *P. falciparum*, foram estabelecidas as seguintes concentrações de reagentes: 1µM de cada iniciador (IDT), 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), acrescido de 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 2µl de DNA, em um total de 20µl por reação.

As condições da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por amplificação com 40 ciclos de 90°C por 20 segundos, 58°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundos, com aquisição de fluorescência ao final de cada passo de extensão. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de dissociação consistindo em 95°C por 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C por 15 segundos. As curvas de dissociação (*melting*) apresentaram temperatura de *melting* (T_m) variando entre 72,7°C e 74,1°C para *P. vivax* e entre 75,6°C e 77,7°C para *P. falciparum*, sendo estas observadas através da avaliação de fluorescência contínua (F) a 530nm enquanto a temperatura aumentava gradualmente de 60 para 95°C. Os gráficos de *melting* foram visualizados plotando a derivativa negativa de fluorescência pela temperatura (-dF/dT° vs. T°) (Figura 8).

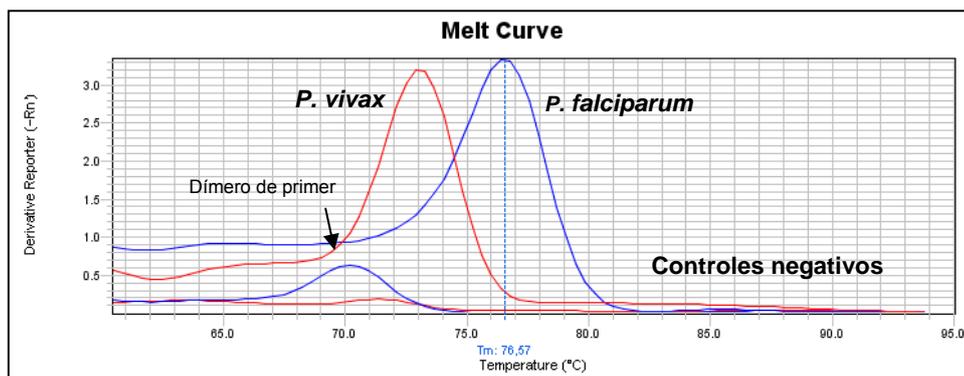


Figura 8: Curvas de dissociação da Real-Time PCR LAMAL para *P. vivax* (vermelho) e *P. falciparum* (azul), juntamente com os controles negativos. As curvas de *melting* foram observadas por avaliação da derivativa negativa de fluorescência pela temperatura ($-dF/dT^{\circ}$ vs. T°).

5.2 Comparação entre a RT-LAMAL e outros protocolos moleculares

5.2.1 Limite de Detecção

Visando validar o protocolo de PCR aqui desenvolvido (RT-LAMAL), optou-se por compará-lo a três outros protocolos de PCR, comumente utilizados na rotina, mais especificamente a Nested-Snounou, RT-Mangold e PCR-Demas (descritos no item 4.7). Para tal, foram utilizadas duas amostras de DNA, uma positiva para *P. vivax* e outra positiva para *P. falciparum*, bem caracterizadas previamente pela microscopia óptica.

A titulação da amostra positiva para *P. vivax* (Tabela 11), com parasitemia inicial de 7620 parasitos por μl de sangue, revelou diferença nos limites de detecção entre as quatro técnicas de PCR avaliadas, sendo que os protocolos de PCR-Demas e RT-LAMAL foram os que detectaram parasitemias mais baixas (positivos até 1:31250, equivalente a 0,2 parasitos por μl de sangue). Em contrapartida, a RT-Mangold foi positiva até 1:6250, que equivale à aproximadamente 1 parasito por μl de sangue, e a Nested-Snounou até 1:1250, equivalente a 6 parasitos por μl de sangue.

Tabela 11: Titulação de amostra de campo sabidamente infectada por *P. vivax* em comparação a diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares.

<i>P. vivax</i> (7620 p/μl)*				
DNA molde Diluições	18S RNA ribossomal		Pvr47	
	Nested-PCR (Snounou)	Real-Time PCR (Mangold)	PCR (Demas)	Real-Time PCR (LAMAL)
1:50	+	+	+	+
1:250	+	+	+	+
1:1.250	+	+	+	+
1:6.250	-	+	+	+
1:31.250	-	-	+	+
1:156.250	-	-	-	-

*parasitemia estabelecida pela microscopia óptica.

(+) = resultado positivo; (-) = resultado negativo.

A titulação da amostra positiva para *P. falciparum*, com parasitemia inicial de 6415 parasitos por μl de sangue, revelou diferença nos limites de detecção entre as técnicas baseadas no gene 18S rRNA e as que possuem Pvr47 e Pfr364 como alvos (Tabela 12). A Nested-Snounou e a RT-Mangold foram capazes de detectar o DNA alvo até a diluição 1:6250, equivalente a 1 parasito por μl de sangue. Por outro lado, a PCR-Demas e a RT-LAMAL, assim como observado na titulação da amostra *P. vivax*, foram eficientes na detecção de até 0,2 parasitos por μl de sangue, referente à diluição 1:31250.

Tabela 12: Titulação de amostra de campo sabidamente infectada por *P. falciparum* em comparação a diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares.

<i>P. falciparum</i> (6415 p/μl)*				
DNA molde Diluições	18S RNA ribossomal		Pfr364	
	Nested-PCR (Snounou)	Real-Time PCR (Mangold)	PCR (Demas)	Real-Time PCR (LAMAL)
1:50	+	+	+	+
1:250	+	+	+	+
1:1.250	+	+	+	+
1:6.250	+	+	+	+
1:31.250	-	-	+	+
1:156.250	-	-	-	-

*parasitemia estabelecida pela microscopia óptica.

(+) = resultado positivo; (-) = resultado negativo.

Os resultados obtidos na titulação das amostras de *P. vivax* e *P. falciparum* sugerem que, entre os quatro protocolos de PCR avaliados, a PCR-Demas e a RT-LAMAL se mostraram mais eficientes na detecção de baixas parasitemias em casos de malária vivax e falciparum, alcançando limites mínimos em amostras de campo, abaixo de 1 parasito por μl de sangue.

5.2.2 Diagnóstico de infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*

Na próxima etapa, misturas artificiais com DNA de *P. vivax* e *P. falciparum* foram realizadas para avaliar os limites de detecção dos quatro protocolos de PCR em casos de infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*. Para tal, DNA de ambos parasitos foram utilizados em diferentes proporções, como mostrado nas Tabelas 13 e 14.

Os resultados do primeiro experimento (Tabela 13), onde a concentração de *P. vivax* foi fixa (1:50) e a de *P. falciparum* variou (1:50 à 1:156250), revelaram diferença nos limites de detecção entre os quatro protocolos avaliados. Novamente, os protocolos da PCR-Demas e da RT-LAMAL foram os mais apropriados para detecção de infecção mista, seguidos pelo protocolo de Nested-Snounou. O protocolo de RT-Mangold não foi capaz de detectar nenhuma infecção mista, apenas *P. vivax*.

A PCR-Demas e a RT-LAMAL foram capazes de detectar as duas espécies de *Plasmodium* até a concentração na qual a quantidade de *P. vivax* na amostra (152p/ μl) foi aproximadamente 750 vezes maior do que a quantidade de *P. falciparum* (0,2p/ μl). Na última diluição, porém, onde *P. vivax* se encontrava em 3800 vezes mais do que *P. falciparum*, os protocolos detectaram apenas *P. vivax*. Já a Nested-Snounou foi eficiente na detecção dos dois parasitos até o momento em que a quantidade de *P. vivax* (152p/ μl) superou em aproximadamente 150 vezes a quantidade de *P. falciparum* (1p/ μl). Em todas as diluições seguintes, esta técnica resultou em positividade somente para *P. vivax*.

Tabela 13: Diagnósticos de misturas artificiais de duas amostras de campo, sabidamente infectadas por *P. vivax* e *P. falciparum*, em comparação a diferentes protocolos de PCR (titulação de *P. falciparum*).

DNA alvo <i>Pv</i> <i>Pf</i>		18S RNA ribossomal		Pvr47/Pfr364	
		Nested-PCR (Snounou)	Real-Time PCR (Mangold)	PCR (Demas)	Real-Time PCR (LAMAL)
1:50	1:50	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>
	1:250	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>
	1:1.250	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>
	1:6.250	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>
	1:31.250	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>
	1:156.250	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>

Pv = detecção de *P. vivax*; *Pv+Pf* = detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*

O experimento onde foi mantida a concentração de *P. falciparum* (1:50) e variou-se a concentração de *P. vivax* (1:50 à 1:156250), também evidenciou diferenças nos limites de detecção dos quatro protocolos de PCR avaliados (Tabela 14). O protocolo de PCR-Demas e a RT-LAMAL apresentaram novamente resultados similares, sendo capazes de detectar as duas espécies em todas as misturas, mesmo quando a quantidade de *P. falciparum* (128p/μl) foi aproximadamente 2600 vezes maior do que a quantidade de *P. vivax* (última diluição de *P. vivax* – 0,048p/μl).

Por outro lado, a Nested-Snounou foi eficiente na detecção dos dois parasitos apenas quando as concentrações de *P. falciparum* e *P. vivax* foram similares. A partir da segunda diluição, na qual a quantidade de *P. falciparum* sobrepôs a de *P. vivax* em pouco mais de 4 vezes, o protocolo não foi capaz de detectar *P. vivax*, apresentando resultado positivo apenas para *P. falciparum*. Já a RT-Mangold, semelhantemente aos dados de misturas anteriores, não foi capaz de detectar as infecções mistas em nenhuma das diluições realizadas. As duas primeiras diluições resultaram em positividade apenas para *P. vivax*, sendo esta alterada para somente *P. falciparum* a partir da terceira diluição.

Tabela 14: Diagnósticos de misturas artificiais de duas amostras de campo, sabidamente infectadas por *P. vivax* e *P. falciparum*, em comparação a diferentes protocolos de PCR (titulação de *P. vivax*).

DNA alvo <i>Pf</i> <i>Pv</i>		18S RNA ribossomal		Pvr47/Pfr364	
		Nested-PCR (Snounou)	Real-Time PCR (Mangold)	PCR (Demas)	Real-Time PCR (LAMAL)
1:50	1:50	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	1:250	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	1:1.250	<i>Pf</i>	<i>Pf</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	1:6.250	<i>Pf</i>	<i>Pf</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	1:31.250	<i>Pf</i>	<i>Pf</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	1:156.250	<i>Pf</i>	<i>Pf</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>

Pv = detecção de *P. vivax*; *Pf* = detecção de *P. falciparum*; *Pv+Pf* = detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*

Adicionalmente, vinte amostras com parasitemias similares (determinadas pelo método de cruces) também foram utilizadas para avaliação da detecção de infecções mistas pelos quatro protocolos de PCR (Tabela 15). Os resultados demonstraram novamente que os protocolos de PCR-Demas e RT-LAMAL foram os mais adequados para detectar desde infecções mistas de baixa parasitemia (1/2+) à alta parasitemia (+++).

Em geral, o protocolo de Nested-Snounou detectou infecções mistas apenas em casos de altas parasitemias. Além disso, mais uma vez confirmou-se a ineficiência do protocolo de RT-Mangold em detectar infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*, mesmo em casos de altas parasitemias das duas espécies. Os resultados indicam que, nestes casos, os iniciadores utilizados amplificam preferencialmente o DNA de *P. vivax* (Tabela 15).

Tabela 15: Resultados de diagnóstico de misturas artificiais de 26 amostras de campo, sabidamente infectadas por *P. vivax* (Pv) ou *P. falciparum* (Pf) e com parasitemias semelhantes determinadas pelo método de cruzes, em comparação a diferentes protocolos de PCR.

DNA molde		18S RNA ribossomal		Pvr47/Pfr364	
		Nested-PCR (Snounou)	Real-Time PCR (Mangold)	PCR (Demas)	Real-Time PCR (LAMAL)
<i>Pv-Pf</i> (1/2+)*	1	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	2	-	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	3	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	4	-	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	5	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
<i>Pv-Pf</i> (+)	6	-	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	7	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	8	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	9	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	10	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
<i>Pv-Pf</i> (++)	11	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	12	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	13	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	14	<i>Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	15	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
<i>Pv-Pf</i> (+++)	16	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	17	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	18	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	19	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>
	20	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>	<i>Pf+Pv</i>

*Classificação pelo método de cruzes, conforme Tabela 1, p. 25 (SVS/MS, 2009)
Pv = detecção de *P. vivax*; *Pf* = detecção de *P. falciparum*; *Pv+Pf* = detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*; - = resultado negativo.

5.3 Comparação dos protocolos de PCR com amostras de campo

As amostras dos 280 indivíduos incluídos neste estudo, discriminadas na seção 4.3, foram utilizadas para avaliação dos quatro protocolos de PCR para diagnóstico de malária em indivíduos naturalmente infectados. Os protocolos analisados incluem a Nested-Snounou, RT-Mangold, PCR-Demas e a RT-LAMAL, desenvolvida pelo nosso grupo. Todas as amostras, provenientes de áreas endêmicas (AM, MT e RO) e não endêmicas (MG) para malária no Brasil, foram previamente caracterizadas pelo exame microscópico (Seção 4.4).

5.3.1 Diagnóstico molecular em amostras de área não endêmica

Os resultados obtidos pela utilização dos quatro protocolos de PCR em amostras de área não endêmica para malária não revelaram diferenças estatísticas na detecção de amostras positivas ou negativas para cada protocolo ($p>0,05$), apresentando estes o mesmo desempenho observado para o exame microscópico (Tabela 16). Também não foram obtidas correlações entre a positividade e as diferentes parasitemias (Tabela 17). Como esperado, foram observados diagnósticos divergentes para algumas amostras consideradas negativas pela microscopia, sendo estas positivas pelos protocolos de Nested-PCR ($n=2$), RT-Mangold ($n=1$), PCR-Demas ($n=3$) e RT-LAMAL ($n=3$). Por outro lado, os diferentes protocolos de PCR não confirmaram a maior parte das infecções mistas identificadas pela microscopia óptica.

Tabela 16: Resultados positivos / negativos para malária dos 117 indivíduos de área não endêmica*.

Amostras	MO (%)	Protocolos Moleculares (%)*			
		Nested-Snounou	RT-Mangold	PCR-Demas	RT-LAMAL
Positivas	42 (36)	44 (38)	37 (32)	45 (38)	42 (36)
Negativas	75 (64)	73 (62)	80 (68)	72 (62)	75 (64)
Total	117	117	117	117	117

* $p>0,05$ para todas as proporções comparadas pelo teste qui-quadrado.

Tabela 17: Resultados positivos para malária dos 117 indivíduos de área não endêmica, de acordo com a parasitemia microscópica e espécie causadora da doença.

Amostras	MO*	Protocolos Moleculares (n° de positivos)			
	Parasitas/ μ l (n)	Nested-Snounou	RT-Mangold	PCR-Demas	RT-LAMAL
Positivos (n=42)	Infecção Única				
	1-300 p/ μ l (6Pv, 7Pf)	6 Pv 7 Pf	6 Pv 5 Pf	6 Pv 7 Pf	6 Pv 7 Pf
	301-10.000 p/ μ l (15Pv, 6Pf)	14 Pv 6 Pf 1 Pv+Pf	12 Pv 6 Pf	13 Pv 7 Pf 1 Pv+Pf	10 Pv 6 Pf 2 Pv+Pf
	Infecção Mista				
	≥ 1 p/ μ l (8)	2 Pv+Pf 6 Pv	6 Pv 1 Pf	1 Pv+Pf 6 Pv 1 Pf	2 Pv+Pf 5 Pv 1 Pf
	Negativos (n=75)		2 Pv	1 Pv	1 Pv 2 Pf
Total	1-10.000 p/ μ l (42)	44	37	45	42

*Parasitas/ μ l de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO), através do método semiquantitativo. Pv = monoinfecção por *P. vivax*; Pf = monoinfecção por *P. falciparum*; Pv+Pf = infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*.

As espécies de parasitos identificadas nas amostras positivas de área não endêmica por todos os protocolos de PCR revelaram predomínio de infecção por *P. vivax*, esta em aproximadamente o dobro da quantidade de infecções por *P. falciparum* (Figura 9). Como esperado, todos os protocolos detectaram algum caso de co-infecção *P. vivax* / *P. falciparum*, exceto o protocolo de RT-Mangold.

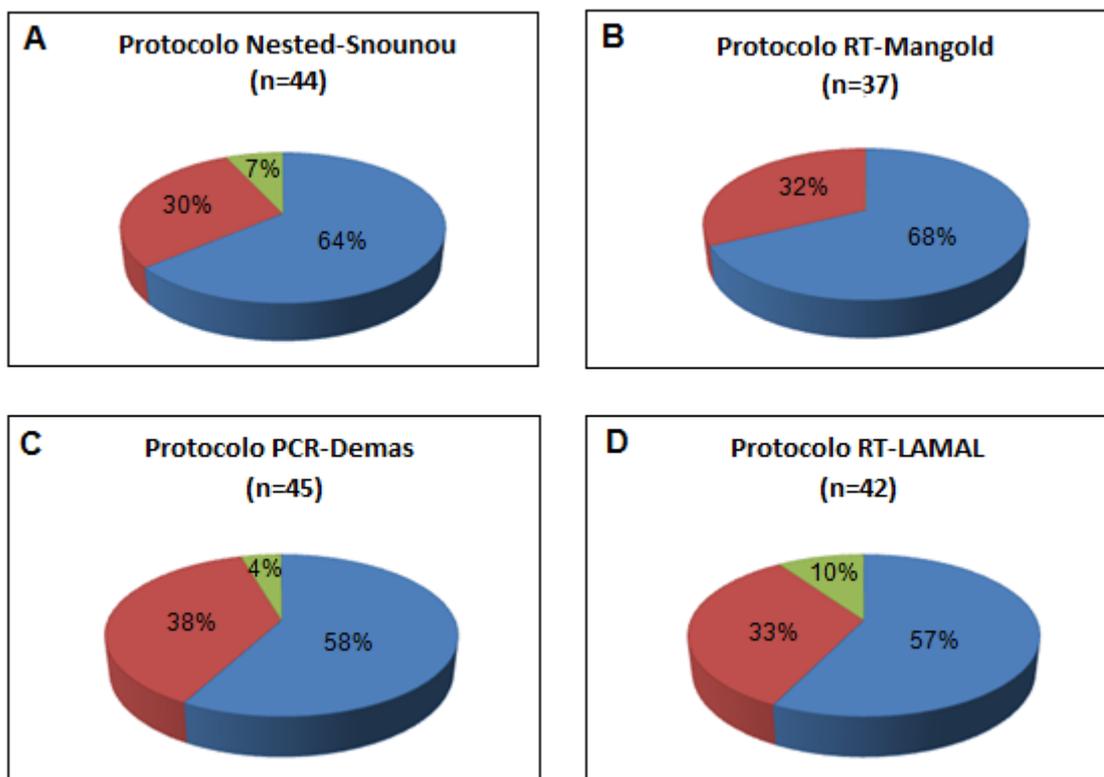


Figura 9: Frequência de amostras positivas (%) para as diferentes técnicas avaliadas para o diagnóstico de malária dos 117 indivíduos de área não endêmica. Resultados positivos pelos protocolos de (A) Nested-Snounou; (B) RT-Mangold; (C) PCR-Demas; (D) RT-LAMAL. Os dados são expressos por espécie de *Plasmodium* responsável pela doença, sendo *P. vivax* em azul, *P. falciparum* em vermelho e infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum* em verde.

5.3.2 Diagnóstico molecular em amostras de área endêmica

Os resultados obtidos com a utilização dos quatro protocolos de PCR em amostras de área endêmica para malária revelaram diferenças de positividade entre os protocolos (Tabela 18). O protocolo de Nested-Snounou apresentou desempenho semelhante ao da microscopia, sendo este significativamente inferior ao dos protocolos de PCR-Demas ($p < 0,05$), RT-Mangold ($p < 0,0002$) e RT-LAMAL ($p < 0,0001$), segundo o teste qui-quadrado. Entretanto, não foi observada diferença entre estes três protocolos, que apresentaram alta positividade, incluindo grande número de amostras consideradas negativas pela microscopia de rotina (48 para RT-Mangold, 31 para PCR-Demas e 49 para RT-LAMAL). Este fato foi relevante, pois alterou o perfil original das amostras, revelando infecções não detectadas pelo método padrão. A Tabela 19 ilustra os resultados obtidos, conforme as parasitemias e espécies encontradas.

Tabela 18: Resultados positivos / negativos para malária dos 163 indivíduos de área endêmica.

Amostras	MO (%)	Protocolos Moleculares (%)			
		Nested-Snounou	RT-Mangold	PCR-Demas	RT-LAMAL
Positivas	34 (21) ^a	25 (15) ^a	66 (40) ^b	52 (32) ^b	67 (41) ^b
Negativas	129 (79)	138 (85)	97 (60)	111 (68)	96 (59)
Total	163	163	163	163	163

^{a,b} Diferentes letras significam proporções estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), segundo o teste qui-quadrado.

Tabela 19: Resultados positivos para malária dos 163 indivíduos de área endêmica, de acordo com a parasitemia microscópica e espécies encontradas.

Amostras	MO* Parasitas/μl (n)	Protocolos Moleculares (n° de positivos)			
		Nested-Snounou	RT-Mangold	PCR-Demas	RT-LAMAL
Infecção Única					
Positivos (n=34)	1-300 p/μl (13Pv, 1Pf)	4 Pv 1 Pf	4 Pv	5 Pv 1 Pf 1 Pv+Pf	1 Pv 2 Pf 1 Pv+Pf
	301-10.000 p/μl (11Pv, 9Pf)	4 Pv 9 Pf	6 Pv 8 Pf	5 Pv 9 Pf	5 Pv 9 Pf
Negativos (n=129)		7 Pv	44 Pv 4 Pf	22 Pv 7 Pf 2 Pv+Pf	38 Pv 8 Pf 3 Pv+Pf
Total	1-10.000 p/μl (34)	25	66	52	67

*Parasitas/μl de sangue detectados pela Microscopia Óptica (MO), através do método semiquantitativo. Pv = monoinfecção por *P. vivax*; Pf = monoinfecção por *P. falciparum*; Pv+Pf = infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*.

Embora o objetivo deste estudo não tenha sido comparar a microscopia óptica e a PCR, observou-se que 10 amostras positivas para *P. vivax* pelo exame microscópico não amplificaram por nenhuma das PCRs (dado não mostrado). Como nosso grupo de pesquisa não teve acesso às lâminas de campo, não foi possível concluir se este resultado se deve a falso-positivos da microscopia ou a falso-negativos dos protocolos moleculares.

Como esperado, a infecção por *P. vivax* também predominou nas amostras de área endêmica para malária (Figura 10), incluindo as amostras anteriormente negativas pela microscopia e positivas pelos protocolos moleculares.

Com relação à identificação de infecções mistas, somente os protocolos de RT-LAMAL e PCR-Demas foram capazes de detectá-las entre as amostras, sendo estas em 6% da positividade de cada protocolo. Os protocolos de Nested-Snounou e RT-Mangold não detectaram nenhum caso de co-infecção *P. vivax* / *P. falciparum* (Figura 10).

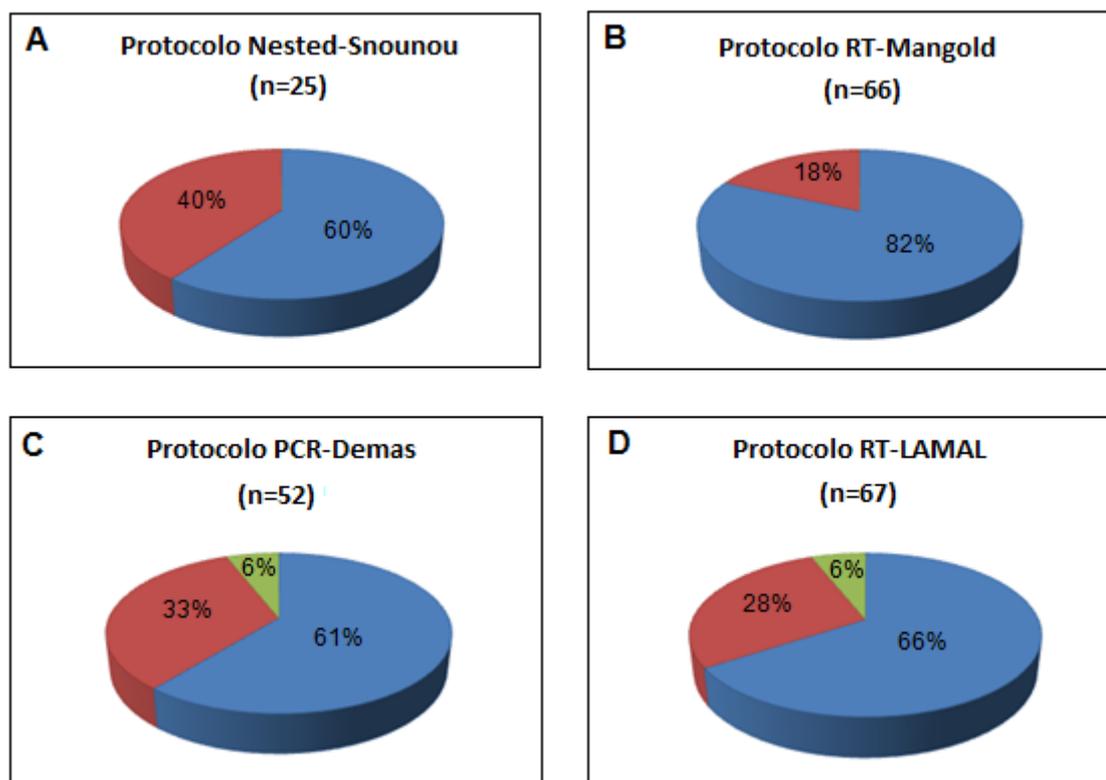


Figura 10: Frequência de amostras positivas (%) para as diferentes técnicas avaliadas para o diagnóstico de malária dos 163 indivíduos de área endêmica. Resultados positivos pelos protocolos de (A) Nested-Snounou; (B) RT-Mangold; (C) PCR-Demas; (D) RT-LAMAL. Os dados são expressos por espécie responsável pela doença, sendo *P. vivax* em azul, *P. falciparum* em vermelho e infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum* em verde.

5.4 Desempenho dos protocolos de PCR para diagnóstico de malária

Na ausência de um método padrão-ouro para o diagnóstico de certeza de malária, os índices de validade foram calculados considerando-se como “padrão-ouro” a microscopia óptica, método referência no diagnóstico de malária, e a Nested-Snounou, referência molecular (diagnóstico de consenso). Desta forma, as amostras foram consideradas positivas ou negativas de acordo com a concordância nestas duas técnicas. Para tal, os diagnósticos realizados pelos protocolos moleculares de RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL foram comparados aos resultados obtidos

pelo “padrão-ouro” escolhido. Um total de 255 amostras de campo foi incluído nas análises (Tabela 20), sendo estas de área endêmica e não endêmica para malária. Na Tabela 21 são apresentados os valores referentes à sensibilidade, especificidade, valor de predição positivo e negativo, acurácia, coeficiente Kappa e índice Youden para cada protocolo.

Tabela 20: Amostras consideradas nas análises estatísticas dos protocolos RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL. Foram considerados verdadeiros positivos ou verdadeiros negativos as amostras com resultado positivo ou negativo concordantes no exame microscópico e Nested-Snounou.

Diagnóstico	Amostras		Total
	Positivas	Negativas	
Referência (M+N)*	60	195	255
RT-Mangold	91	164	255
PCR-Demas	86	169	255
RT-LAMAL	101	154	255

*M+N = microscopia óptica e Nested-Snounou.

Tabela 21: Análises estatísticas das três técnicas de PCR avaliadas, sendo considerados verdadeiros positivos ou verdadeiros negativos as amostras com resultado positivo ou negativo concordantes no exame microscópico e Nested-Snounou.

Parâmetro	Protocolo de Diagnóstico Molecular		
	Real-Time PCR (Mangold)	PCR (Demas)	Real-Time PCR LAMAL
Sensibilidade	0,85	0,98	0,90
Especificidade	0,79	0,86	0,76
Valor de Predição Positivo	0,56	0,69	0,53
Valor de Predição Negativo	0,95	0,99	0,96
Acurácia	0,81	0,89	0,79
Coeficiente <i>Kappa</i>	0,55	0,73	0,53
Índice Youden	0,51	0,68	0,49

De acordo com os parâmetros obtidos, o protocolo que apresentou melhor desempenho para diagnóstico de malária vivax e falciparum foi a PCR-Demas, que apresentou resultados mais próximos daqueles obtidos pelo método de referência. É necessário ressaltar que as análises estatísticas consideraram como resultado “falso positivo” as amostras detectadas pelos protocolos de RT-Mangold e da RT-LAMAL

que não coincidiram com os resultados negativos pelo método padrão de diagnóstico. Além disso, as análises realizadas não contemplam as diferenças entre infecções simples e mistas, apenas a positividade. Desta forma, apesar de os resultados do protocolo de RT-Mangold terem se mostrado mais parecidos aos da RT-LAMAL nos dados estatísticos, destaca-se novamente a ineficiência daquele em identificar co-infecções.

O diagnóstico de malária, como um dos pilares dos programas de prevenção e controle da doença no Brasil e no mundo, fornece a identificação dos casos e permite a caracterização da espécie infectante, essencial no direcionamento de um esquema terapêutico adequado (WHO, 2013). Além disso, como parte do esforço internacional para reduzir a incidência global da doença, tem-se ressaltado a importância do tratamento de portadores com parasitemia submicroscópica com o objetivo de interromper o ciclo de transmissão em alguns locais (Ogutu *et al.*, 2010). Tendo em vista, então, a importância de um diagnóstico correto de malária e levando-se em consideração as lacunas apresentadas pelo diagnóstico microscópico de rotina, vários métodos tem sido propostos a fim de auxiliar esta ferramenta, principalmente em casos de baixas parasitemias e infecções mistas.

Atualmente, a maioria dos protocolos baseados em PCR para diagnóstico de malária tem recorrido ao gene da subunidade menor do RNA ribossomal (18S rRNA) dos parasitos como alvo, já bem caracterizado na literatura (Gardner *et al.*, 2002; Carlton *et al.*, 2008). Entretanto, embora esteja descrito que os protocolos baseados na amplificação do 18S rRNA sejam capazes de detectar níveis muito baixos de parasitemia, um estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou baixa reprodutibilidade de métodos moleculares, incluindo a referência no diagnóstico de malária, a Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993), quando aplicados para amplificar o gene 18S rRNA em amostras de campo com parasitemias submicroscópicas (Camargos-Costa *et al.*, 2014; Anexo 8.2).

Diante disso, este trabalho buscou desenvolver um protocolo de Real-Time PCR baseado em alvos não ribossomais, que foram recentemente descritos como promissores para o diagnóstico de malária vivax (Pvr47) e falciparum (Pfr364). Ainda sem funções conhecidas, estes alvos são promissores, pois estão presentes em várias cópias, distribuídas em vários cromossomos no genoma destes parasitos. Baseando-se, então, nas sequências obtidas pelo trabalho de Demas *et al.* (2011), a Real-Time LAMAL foi padronizada com o objetivo de diagnosticar casos de malária com baixas parasitemias e infecções mistas pelas duas espécies de plasmódio mais prevalentes em todo o mundo, *P. falciparum* e *P. vivax* (malERA, 2011).

6.1 Real-Time PCR LAMAL em comparação com diferentes protocolos moleculares: limites de detecção e infecções mistas

O protocolo de Real-Time PCR desenvolvido pelo nosso grupo demonstrou boa sensibilidade na detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*, semelhante ao protocolo de PCR-Demas. Os resultados revelaram detecção de quantidades mínimas de parasitos, da ordem de 0,2 parasitos por microlitro de sangue, cinco vezes menos do que o limite obtido para o atual protocolo molecular de referência no diagnóstico de malária, a Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993). Entretanto, a Nested-PCR, em nossas condições, se mostrou ainda menos sensível para detecção de *P. vivax*, com limite de cerca de 6 parasitos/ μ l de sangue. O mesmo foi observado para o protocolo de RT-Mangold, que se mostrou menos sensível do que os protocolos de RT-LAMAL e PCR-Demas na detecção de infecções únicas, com limite semelhante ao da Nested-PCR, em torno de 1 parasito/ μ l de sangue. Contudo, na detecção de infecções únicas por *P. vivax*, o protocolo de RT-Mangold se mostrou mais eficiente do que a Nested-PCR, que se limitou a 6 parasitos/ μ l de sangue.

Entre os protocolos de PCR atuais, a técnica de PCR Real-Time é descrita na literatura científica como altamente sensível, capaz de detectar e quantificar ácidos nucléicos de forma precisa, mesmo quando estes se encontram em quantidade mínimas (França *et al.*, 2013). Entretanto, a sensibilidade de uma técnica pode ser muito variável, dependendo dos protocolos estabelecidos, do material utilizado e da população que é submetida ao exame (Berry *et al.*, 2005). É necessário ressaltar ainda que esta sensibilidade depende diretamente da escolha dos alvos, que são essenciais para o sucesso da amplificação do DNA e consequente detecção do patógeno (Lucchi *et al.*, 2013). Desta forma, quanto maior o número de cópias apresentadas por determinada sequência em um organismo, maiores serão as chances de sucesso na detecção deste.

De fato, os dados aqui apresentados revelaram grandes diferenças de sensibilidade entre os protocolos de PCR, principalmente no que se refere aos alvos amplificados. Baseadas no gene do 18S rRNA, presente em torno de 4-8 cópias por genoma dos plasmódios (Carlton *et al.*, 2008), a Nested-PCR e a RT-Mangold se encontram em desvantagem em comparação à PCR-Demas e RT-LAMAL, com 14 cópias de Pvr47 (*P. vivax*) e 41 cópias de Pfr364 (*P. falciparum*) disponíveis (Demas *et al.*, 2011). Este fato pode explicar a maior sensibilidade destes protocolos, o que permitiu a amplificação de quantidades menores de DNA alvo (Lucchi *et al.*, 2013).

Em relação à detecção de infecções mistas, os protocolos de RT-LAMAL e PCR-Demas foram os mais eficientes na detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo esta observada em praticamente todos os níveis de parasitemia (“+/2” a “+++”). Já a Nested-PCR demonstrou detecção de infecções mistas apenas em casos de altas parasitemias, revelando melhor detecção de *P. falciparum*, sendo capaz de amplificar seu DNA mesmo em baixas quantidades. Por outro lado, a RT-Mangold demonstrou amplificação preferencial de *P. vivax* nos casos de co-infecção, sendo incapaz de detectar *P. falciparum* quando este se encontra em concentrações iguais ou menores do que *P. vivax*.

No caso da RT-Mangold, o fato de possuir apenas um par de iniciadores para detectar as quatro principais espécies de *Plasmodium* causadoras de malária humana (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*) pode ter sido determinante no insucesso da detecção de infecções mistas por esta técnica. Mais especificamente, os iniciadores parecem competir pelo DNA alvo, dando preferência à amplificação do DNA de *P. vivax* quando este se encontra junto à *P. falciparum*. Esta é uma grande limitação da técnica, já que, em casos de não detecção de infecções mistas, o tratamento do paciente seria direcionado apenas para *P. vivax*, negligenciando *P. falciparum* e permitindo o desenvolvimento desta espécie patogênica no hospedeiro. Além disso, o indivíduo poderia permanecer como fonte de infecção para vetores e, conseqüentemente, contribuir para a manutenção do ciclo de vida dos parasitos (Okell *et al.*, 2012; Cunningham & Bosman, 2013).

Estudos recentes tem demonstrado possíveis lacunas entre os dados epidemiológicos e as reais prevalências dos casos de malária em determinadas regiões, muitas vezes subestimadas devido às baixas parasitemias e conseqüente não detecção pelas técnicas rotineiras de diagnóstico (Ebrahimzadeh *et al.*, 2007; Proux *et al.*, 2011; Golassa *et al.*, 2013). Do mesmo modo, protocolos moleculares poucos sensíveis podem ocultar parasitemias subpatentes e co-infecções, contribuindo para manutenção da doença em certos locais. É necessário ressaltar que a maioria dos casos de infecções subclínicas são observadas em áreas endêmicas através de buscas ativas, realizadas esporadicamente (Alves *et al.*, 2002; Coura *et al.*, 2006; Cotter *et al.*, 2013). Nesse sentido, indivíduos parcialmente imunes são capazes de controlar as infecções, não desenvolvendo a doença, mas atuando como reservatório de parasitos (Bousema & Drakeley, 2011). Tendo em vista estas informações, o protocolo aqui desenvolvido parece adequado a estudos que visam diagnosticar infecções subpatentes e mistas.

6.2 Comparação dos protocolos de PCR em amostras de campo

Os dados obtidos para diagnóstico de malária em amostras de campo de área não endêmica (serviços de referência no diagnóstico de malária em Minas Gerais) não revelaram diferenças entre os protocolos moleculares analisados, sendo obtidos desempenhos similares entre si e em comparação aos resultados do exame microscópico. É necessário ressaltar que os casos obtidos em área não endêmica foram resultado de busca passiva, onde os próprios indivíduos recorrem aos centros de saúde e, portanto, já apresentam sintomas. Isto demonstra, nos casos positivos, que já houve a manifestação da doença e, desta forma, não se trata de parasitemias subpatentes.

Por outro lado, dentre as oito amostras consideradas mistas pela microscopia, apenas duas foram confirmadas pela PCR, sendo as restantes positivas para *P. vivax*. Essa discordância observada entre a microscopia e os protocolos moleculares pode ser explicada por possíveis equívocos na análise das lâminas, já que se trata de um exame de detalhada preparação e difícil leitura. Estudos recentes tem ressaltado o fato de que mesmo microscopistas experientes podem confundir diferentes espécies de plasmódios, sendo estes morfologicamente semelhantes em algumas fases do seu ciclo de vida, principalmente nos estágios mais jovens (Noedl et al., 2006; Oliveira-Ferreira et al., 2010).

Os diagnósticos de amostras de áreas endêmicas revelaram grande discordância entre o protocolo de Nested-PCR e todos os outros, sendo este o menos sensível na detecção de amostras com parasitemias subpatentes (negativas pela microscopia). Os protocolos de RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL foram significativamente melhores na detecção de casos submicroscópicos, alterando o perfil original de positividade e revelando casos de infecções mistas antes não diagnosticados (PCR-Demas e RT-LAMAL). Estes dados podem ser explicados novamente pelos eficientes alvos multicópias da PCR-Demas e RT-LAMAL, que permitem a identificação de DNA, mesmo em baixas quantidades. Por outro lado, a RT-Mangold se mostrou igualmente sensível apenas nos casos de infecção única por *P. vivax*. Não foi observada, porém, correlação entre os resultados dos diagnósticos e as cargas parasitárias das amostras. Entretanto, o presente estudo não foi desenhado para avaliar níveis de parasitemia em amostras de campo, já que, neste caso, seria necessário um número maior de amostras bem caracterizadas.

Os resultados de diagnóstico obtidos para as amostras de área endêmica também revelaram que, dez amostras apresentadas como positivas para *P. vivax* pelo exame microscópico, não foram detectados por nenhum dos protocolos de PCR aplicados. Estas amostras não foram correlacionadas à baixas parasitemias, já que possuíam densidades parasitárias variando entre menos de meia cruz (<+/2) e quatro cruces (++++) pelo método semiquantitativo. Devido ao fato de não ser possível o acesso do nosso grupo de pesquisa às lâminas avaliadas no diagnóstico microscópico, não é possível concluir se os resultados se devem à falso-positivos desta técnica ou falso-negativos dos métodos moleculares. Entretanto, acredita-se que seja pouco provável a ocorrência de falso-negativos por parte das PCRs, já que os resultados foram concordantes em todos os protocolos, sendo estes baseados em diferentes alvos, além de que os experimentos de titulação revelaram limites mínimos de detecção do DNA destes parasitos. Por outro lado, a qualidade atual dos microscopistas de campo tem sido questionada, especialmente porque o treinamento atual consiste em apenas três meses e as substituições são frequentes. De fato, durante o estudo realizado pelo nosso grupo na área endêmica (12 meses), microscopistas foram substituídos (C.J.F.F., informação pessoal).

6.3 Índices de validade para diagnóstico molecular de malária

Apesar das limitações para calcular os índices de validade, tais como sensibilidade e especificidade, os resultados aqui apresentados permitem demonstrar que os protocolos de RT-LAMAL, RT-Mangold e PCR-Demas foram os que apresentaram maior sensibilidade entre as 280 amostras de campo analisadas para diagnosticar malária vivax e falciparum. Entretanto, observou-se que grande parte do sucesso atribuído à RT-Mangold deveu-se à grande quantidade de amostras positivas para *P. vivax*, espécie favorecida na amplificação por este protocolo, sendo este incapaz de detectar qualquer co-infecção. Por outro lado, os protocolos de RT-LAMAL e PCR-Demas se destacaram nos diagnósticos tanto de infecções únicas quanto mistas.

Em conjunto, as análises estatísticas realizadas revelaram valores de sensibilidade, especificidade, valores de predição positivo e negativo, acurácia, coeficiente kappa e índice Youden mais favoráveis aos diagnósticos obtidos pela PCR-Demas, que apresentou resultados mais próximos da referência utilizada (microscopia + Nested-Snounou). É necessário ressaltar que estas análises

consideraram como falso-positivas todas as amostras de área endêmica negativas pela microscopia e posteriormente positivadas pelos protocolos de RT-Mangold, PCR-Demas e RT-LAMAL. Isto não significa que os protocolos sejam pouco específicos, apenas que foram capazes de detectar mais infecções do que o diagnóstico padrão-ouro.

De fato, quando avaliadas apenas pelos índices de validade, a baixa performance dos protocolos de PCR pode ser justificada pela baixa sensibilidade do exame microscópico, que detecta parasitemias variando entre 20-100 parasitos/ μ l de sangue (Okell *et al.*, 2012), e da PCR referência. Por outro lado, a RT-LAMAL aqui descrita demonstrou limites baixíssimos de detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*, em torno de 0,2 de parasitos/ μ l de sangue, sendo este muito inferior ao do método molecular de referência, a Nested-Snounou (1 parasito/ μ l de sangue). Tomados em conjunto, estes dados reforçam a ideia de que os alvos Pvr47 e Pfr364 sejam realmente promissores no diagnóstico de malária vivax e falciparum, incluindo casos de baixas parasitemias e/ou infecções mistas. Contudo, a RT-LAMAL tem vantagens sobre a PCR-Demas na medida em que se baseia na técnica de Real-Time PCR, com maior rapidez na obtenção de resultados, dispensando a revelação em gel de agarose e uso de brometo de etídeo, além de diminuir a possibilidade de erro nos volumes e contaminação de reagentes e amostras (Mangold *et al.*, 2005). Portanto, considera-se que a RT-LAMAL possui grande potencial para o diagnóstico molecular de certeza de pacientes com infecções mistas e baixas parasitemias.

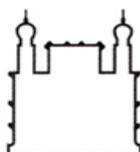
Como perspectivas deste estudo, pretende-se ainda realizar uma comparação entre laboratórios, visando avaliar o desempenho da RT-LAMAL frente a outras técnicas moleculares adotadas para o diagnóstico de malária. Para tal, serão preparadas amostras codificadas, sabidamente negativas ou positivas para *P. vivax*, *P. falciparum* e mistas, que consistirão em diferentes parasitemias. Este estudo multicêntrico contará com pelo menos cinco laboratórios brasileiros e poderá contribuir para validar o protocolo aqui descrito.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo foi possível concluir que:

- 1) O protocolo de PCR em Tempo Real aqui desenvolvido (RT-LAMAL) foi padronizado;
- 2) Os protocolos de PCR RT-LAMAL e PCR-Demas apresentaram os menores limites de detecção em infecções únicas e mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*, se mostrando também mais eficientes na detecção destes parasitos em amostras de campo com co-infecções;
- 3) A RT-LAMAL, a PCR-Demas e a RT-Mangold foram os protocolos mais eficientes na detecção de *P. vivax* em amostras de campo de área endêmica para malária, principalmente em amostras com baixas parasitemias.
- 4) A Nested-Snounou apresentou desempenho semelhante ao do exame microscópico em amostras de campo de área endêmica para malária, sendo este inferior ao dos outros protocolos moleculares avaliados;
- 5) Os alvos Pvr47 e Pfr364 se mostraram mais adequados para o diagnóstico molecular de malária vivax e falciparum do que o gene da subunidade menor do RNA ribossomal (18S rRNA), mesmo considerando-se o risco de falso-negativos.

8.1 Documentos de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Protocolos CEP CPqRR Nº 24/2008 e 358.698/2013)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

CARTA DE APROVAÇÃO Nº 01/2009 – CEPESH- CPqRR

Protocolo CEP - CPqRR nº: 24/2008

Projeto de Pesquisa: “Padronização e Validação da Nested e Real Time PCR para o diagnóstico de malária humana a partir de amostras extraídas em papel de filtro”

Pesquisador Responsável: Luzia Helena Carvalho

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ

Data de entrada no CEP: 24/10/2008

CAAE: 0021.0.245.000-08 / Grupo III.

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, constatou-se que o projeto atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto, bem como do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação: **PROJETO APROVADO**

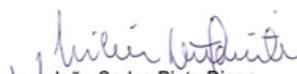
Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

- Parcial : Novembro 2009;

- Final: Julho 2010.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 12 de Janeiro de 2009.


João Carlos Pinto Dias
Coordenador do CEPESH-CPqRR

DRA. LILÉIA GONÇALVES DIOTAIUTI
Vice-coordenadora
Comitê de Ética - CPqRR/FIOCRUZ

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de novos alvos moleculares para o diagnóstico de malária por *P. falciparum* e *P. vivax* pela PCR em Tempo Real

Pesquisador: Luzia Helena Carvalho

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 19823113.1.0000.5091

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 358.698

Data da Relatoria: 05/08/2013

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa a utilização de técnicas de biologia molecular para detectar infecções com baixa parasitemias por *P. vivax* e *P. falciparum*, com diagnóstico diferencial.

Objetivo da Pesquisa:

Existe grande dificuldade para a detecção de malária em pacientes com baixas cargas parasitárias que muitas vezes são assintomáticos. O PCR em tempo real será feito com o uso de novos alvos moleculares para o diagnóstico da malária por *P. falciparum* e *P. vivax*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pacientes serão submetidos a punção digital para coleta de sangue e coleta de sangue com vacutainer que não causam grandes incômodos a estes. O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para detecção de infecções com baixas parasitemias será de grande importância clínica e epidemiológica.

Benefícios:

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 358.698

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um trabalho de investigação de grande importância em saúde pública e poderá resultar em novos métodos de diagnóstico úteis na elucidação de casos de malária em pacientes com baixas parasitemias ou mesmo assintomáticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE explicita claramente os procedimentos da pesquisa e não necessita de correções.

Recomendações:

O projeto está bem apresentado e não necessita de recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências ou modificações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Colocado em discussão o parecer do relator, o Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas, decidiu pela Aprovação deste projeto.

BELO HORIZONTE, 13 de Agosto de 2013

Assinador por:
Naftale Katz
(Coordenador)

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715
Bairro: Barro Preto **CEP:** 30.190-002
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

8.2 Trabalho realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Malária do CPqRR, aceito para publicação na revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, em 2014.

Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods?

Daniela Camargos Costa¹, Ana Paula Madureira², Lara Cotta Amaral¹,
Bruno Antônio Marinho Sanchez³, Luciano Teixeira Gomes³, Cor Jésus Fernandes Fontes³,
Jean Ezequiel Limongi⁴, Cristiana Ferreira Alves de Brito¹, Luzia Helena Carvalho^{3/4}

¹Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Belo Horizonte, MG, Brasil ²Departamento de Bioengenharia, Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rey, MG, Brasil ³Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil ⁴Centro de Controle de Zoonoses de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

The polymerase chain reaction (PCR)-based methods for the diagnosis of malaria infection are expected to accurately identify submicroscopic parasite carriers. Although a significant number of PCR protocols have been described, few studies have addressed the performance of PCR amplification in cases of field samples with submicroscopic malaria infection. Here, the reproducibility of two well-established PCR protocols (nested-PCR and real-time PCR for the Plasmodium 18 small subunit rRNA gene) were evaluated in a panel of 34 blood field samples from individuals that are potential reservoirs of malaria infection, but were negative for malaria by optical microscopy. Regardless of the PCR protocol, a large variation between the PCR replicates was observed, leading to alternating positive and negative results in 38% (13 out of 34) of the samples. These findings were quite different from those obtained from the microscopy-positive patients or the unexposed individuals; the diagnosis of these individuals could be confirmed based on the high reproducibility and specificity of the PCR-based protocols. The limitation of PCR amplification was restricted to the field samples with very low levels of parasitaemia because titrations of the DNA templates were able to detect < 3 parasites/μL in the blood. In conclusion, conventional PCR protocols require careful interpretation in cases of submicroscopic malaria infection, as inconsistent and false-negative results can occur.

Key words: malaria - PCR - reproducibility - submicroscopic infection

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam MS, Mohon AN, Mustafa S, Khan WA, Islam N, Karim MJ, et al. Real-time PCR assay and rapid diagnostic tests for the diagnosis of clinically suspected malaria patients in Bangladesh. *Malar J.* 2011 Jun 26; 10:175.

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 Jun;66(6):641-8.

Amino R, Thiberge S, Martin B, Celli S, Shorte S, Frischknecht F, et al. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* 2006 Feb; 12(2):220-4.

Bailey JW, Williams J, Bain BJ, Parker-Williams J, Chiodini PL; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guideline: the laboratory diagnosis of malaria. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2013.

Berry A, Fabre R, Benoit-Vical F, Cassaing S, Magnaval JF. Contribution of PCR-based methods to diagnosis and management of imported malaria. *Med Trop (Mars).* 2005; 65(2):176-83.

Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Apr; 24(2):377-410.

Brasil P, Costa AP, Longo CL, da Silva S, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT. Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microscopic parasitaemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. *Malar J.* 2013 Nov 7; 12(1):402.

Camargos-Costa D, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BAM, Gomes LT, Fontes CJF, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? Mem Inst Oswaldo Cruz. In Press 2014:1-8.

Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, et al. Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Nature. 2008 Oct 9; 455(7214):757-63.

Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, et al. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. Malar J. 2006 Dec 14; 5:121.

Cordray MS, Richards-Kortum RR. Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. Am J Trop Med Hyg. 2012 Aug; 87(2):223-30.

Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, et al. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. Lancet. 2013 Sep 7; 382(9895):900-11.

Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 May; 101(3):229-37.

Cunningham J, Bosman A. Proposal for an Evidence Review Group (ERG) on diagnosis of *Plasmodium falciparum* in low transmission areas. World Health Organization/GMP, Malaria Policy Advisory Committee Meeting 2013 Sep 11-13, Geneva.

Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. J Clin Microbiol. 2011 Jul; 49(7):2411-8.

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 Mar; 56(1):61-4.

Erdman LK, Kain KC. Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med Infect Dis.* 2008 Jan-Mar; 6(1-2):82-99.

França RF, da Silva CC, De Paula SO. Recent advances in molecular medicine techniques for the diagnosis, prevention, and control of infectious diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Jun; 32(6):723-8.

Gama BE, Silva-Pires Fdo E, Lopes MN, Cardoso MA, Britto C, Torres KL, et al. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007 Aug; 116(4):427-32.

Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002 Oct 3; 419(6906):498-511.

Gething PW, Elyazar IR, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(9):e1814.

Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IR, Johnston GL, et al. A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J.* 2011 Dec 20; 10:378.

Golassa L, Enweji N, Erko B, Aseffa A, Swedberg G. Detection of a substantial number of sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia. *Malar J.* 2013 Oct 3; 12:352.

Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug; 45(8):2521-8.

Hänscheid T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. Clin Microbiol Infect. 2003 Jun; 9(6):497-504.

Hänscheid T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. Clin Lab Haematol. 1999 Aug; 21(4):235-45.

Hänscheid T, Grobusch MP. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? Trends Parasitol. 2002 Sep; 18(9):395-8.

Hawkes M, Kain KC. Advances in malaria diagnosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007 Jun; 5(3):485-95.

Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. PLoS One. 2013 Aug 29; 8(8):e71539.

Kano FS, Sanchez BA, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. Trop Med Int Health. 2012 Aug; 17(8):989-1000.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006 Apr-Jun; 27(2-3):95-125.

Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp. 2012 May 22; (63):e3998.

Lucchi NW, Oberstaller J, Kissinger JC, Udhayakumar V. Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era. Public Health Genomics. 2013; 16(1-2):37-43.

malERA - Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics 2011. A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. PLoS Med 8: e1000396.

Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J Clin Microbiol. 2005 May; 43(5):2435-40.

Ménard R, Tavares J, Cockburn I, Markus M, Zavala F, Amino R. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. Nat Rev Microbiol. 2013 Oct; 11(10):701-12.

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, et al. Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. Science. 2001 Jan 5; 291(5501):141-4.

Mouatcho JC, Goldring JP. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. J Med Microbiol. 2013 Oct; 62(Pt 10):1491-505.

Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage Plasmodium falciparum infections in malaria human challenge trials. Am J Trop Med Hyg. 2012 Mar; 86(3):383-94.

Noedl H, Yingyuen K, Laoboonchai A, Fukuda M, Sirichaisinthop J, Miller RS. Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria diagnosis. Am J Trop Med Hyg. 2006 Dec; 75(6):1205-8.

Ogutu B, Tiono AB, Makanga M, Premji Z, Gbadoé AD, Ubben D, et al. Treatment of asymptomatic carriers with artemether-lumefantrine: an opportunity to reduce the burden of malaria? Malar J. 2010 Jan 22; 9:30.

Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. Nat Commun. 2012; 3:1237.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010 Apr 30; 9:115.

Osungbade KO, Oladunjoye OO. Prevention of congenital transmission of malaria in sub-saharan african countries: challenges and implications for health system strengthening. J Trop Med. 2012; 2012:648456.

Paglia MG, Vairo F, Bevilacqua N, Ghirga P, Narciso P, Severini C, et al. Molecular diagnosis and species identification of imported malaria in returning travellers in Italy. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 Feb; 72(2):175-80.

Pallavi P, Ganesh CK, Jayashree K, Manjunath GV. Seroprevalence and trends in transfusion transmitted infections among blood donors in a university hospital blood bank: a 5 year study. Indian J Hematol Blood Transfus. 2011 Mar; 27(1):1-6.

Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, DeBarry JD, Srinivasamoorthy G, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*. PLoS One. 2013; 8(1):e54986.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, et al. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. J Clin Microbiol. 2004 Mar; 42(3):1214-9.

Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. J Infect Dis. 2013 Aug 15; 208(4):637-44.

Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M, et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. Malar J. 2011 Oct 28; 10:323.

Qi Q, Guerra CA, Moyes CL, Elyazar IR, Gething PW, Hay SI, et al. The effects of urbanization on global *Plasmodium vivax* malaria transmission. Malar J. 2012 Dec 5; 11:403.

Rafael ME, Taylor T, Magill A, Lim YW, Girosi F, Allan R. Reducing the burden of childhood malaria in Africa: the role of improved. *Nature*. 2006 Nov 23; 444. Suppl 1:39-48.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS): Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed, Brasília, 2010a.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS): Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias. 8ª ed, Brasília, 2010b.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS): Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2ª ed, Brasília, 2009.

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS): Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico - Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2000 a 2011. Brasília, 2013.

Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Apr; 26(2):165-84.

Singh R, Savargaonkar D, Bhatt R, Valecha N. Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *J Infect*. 2013 Sep; 67(3):245-7.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do 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.

Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006 Sep 1; 313(5791):1287-90.

Vliegenthart-Jongbloed K, de Mendonça Melo M, van Wolfswinkel ME, Koelewijn R, van Hellemond JJ, van Genderen PJ. Severity of imported malaria: protective effect of taking malaria chemoprophylaxis. *Malar J*. 2013 Jul 31; 12:265.

Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* 2007 May; 9(5):1215-22.

Waters AP, McCutchan TF. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet.* 1989 Jun 17; 1(8651):1343-6.

White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. *Lancet.* 2013 Aug 15.

WHO. World Malaria Report 2012, Geneva, World Health Organization.

WHO. World Malaria Report 2013, Geneva, World Health Organization.