

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

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO MALÁRICA EM ALDEIAS
INDÍGENAS IANOMÂMIS**

por

Daniela Rocha Robortella

Belo Horizonte

2016

DISSERTAÇÃO MSC - CPqRR

D. R. ROBORTELLA

2016

DANIELA ROCHA ROBORTELLA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO MALÁRICA EM ALDEIAS
INDÍGENAS IANOMÂMIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências

Orientação: Dr^a. Luzia Helena Carvalho
Coorientação: Dr^a. Tais Nóbrega de Souza

Belo Horizonte

2016

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

R628d Robortella, Daniela Rocha.
2016

Diagnóstico molecular de infecção malárica em aldeias indígenas ianomâmis / Daniela Rocha Robortella. – Belo Horizonte, 2016.

xvi, 66 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 75 – 81.

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*/parasitologia
3. Reação em Cadeia da Polimerase/utilização I.
Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III.
Souza, Tais Nóbrega de (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.936 2

DANIELA ROCHA ROBORTELLA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO MALÁRICA EM ALDEIAS
INDÍGENAS IANOMÂMIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisa René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências

Banca examinadora:

Prof. Dr.^a Luzia Helena Carvalho (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Prof. Dr.^a Luiza Carvalho Mourão (UFMG) Titular
Prof. Dr. Armando de Menezes Neto (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Prof. Dr. Nilton Barnabé Rodrigues (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 25/02/2016

*Ao povo Yanomami, a quem dedico esta conquista e minha
admiração.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, afinal, por mais árdua que seja a luta e por mais difícil que seja a caminhada, existe sempre uma maneira de vencer, a fé.

Ao povo Yanomami, meu objeto de estudo, por serem o maior incentivo ao desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade de compartilhar parte desta cultura maravilhosa.

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida. Mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes, vocês estiveram presentes para me encorajar e orientar.

À Tati, minha querida irmã, maior laço neste mundo. Você é minha inspiração, obrigada por tudo.

Às minhas avós (as mais lindas), obrigada pelo carinho e dedicação. Amo vocês incondicionalmente!

À Bisa, agora meu anjo. Tenho certeza que você esta ao meu lado comemorando mais esta vitória.

À minha família, vocês são meu alicerce!

Ao meu amor, Antônio. Obrigada por ser meu ponto de equilíbrio, meu melhor amigo e melhor companheiro.

Aos meus amigos, por me fazerem compreender que amizades verdadeiras permanecem mesmo quando seguimos caminhos diferentes.

Ao Nick, meu eterno companheiro e exemplo de fidelidade.

As minhas amigas, meio bruxas, meio princesas (na medida certa), Babi, Jé e Lele, pelos inúmeros momentos de distração, tornando minha caminhada mais agradável,

compartilhando momentos de felicidades e aflições. Tenho certeza que independente da nossa trajetória, a gente é pra sempre.

Aos amigos, que são muito mais que colegas de profissão, particularmente, Gabi (saudades), Mica, Michelle, que extrapolaram a convivência para fora do trabalho. Gostaria de agradecer por tanto amor e carinho. Daniel, para você meu agradecimento é especial, não só pela convivência e descontração cotidiana, mas também por todo auxílio e paciência. Você é muito especial!

Aos integrantes do Laboratório de Malária que foram super importantes nesta jornada. Muito obrigada pelo apoio e aprendizado diário.

À Raianna, por ser uma aluna tão dedicada. Sem você eu definitivamente não teria chegado até aqui. Essa vitória é nossa!

À Dra. Luzia, pela oportunidade e confiança, sempre disposta a me ouvir. Muito obrigada por acreditar na minha capacidade e por me auxiliar em cada passo do meu amadurecimento profissional.

À Dra. Taís pela disposição, sempre por perto para me aconselhar, e, à Dr. Flora, pelo carinho de sempre, me acolhendo e auxiliando. Vocês foram fundamentais para esta conquista.

Aos demais professores do curso, pelos ensinamentos, os quais me motivaram a trilhar os caminhos da Parasitologia.

Aos colaboradores deste trabalho, em especial à Dra. Joseli de Oliveira, e ao Dr. Jordi Ribas, pela disponibilidade e cuidado na coleta e envio das amostras.

À plataforma de PCR em Tempo Real, pelo fornecimento da infraestrutura. Em especial, à querida Fê, pela disposição, sempre me ajudando a solucionar problemas com um sorriso amigo e agradável.

Ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, pela oportunidade.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Em especial, à CAPES pelo fornecimento da minha bolsa de mestrado e às demais agências CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do CPqRR/FIOCRUZ, pela infraestrutura e recursos.

*“Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o
que era antes”
(Martin Luther King)*

RESUMO

Nos últimos anos, a incidência de malária no Brasil vem reduzido significativamente, particularmente, em virtude das medidas de controle. Neste novo cenário, faz-se necessário identificar e tratar a malária submicroscópica, uma vez que estes indivíduos constituem fonte de infecção para o mosquito vetor. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem aprimorando o diagnóstico molecular de malária e, recentemente, padronizou uma reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), altamente sensível, para a detecção de alvos não ribossomais (Pvr47 e Pfr364) dos plasmódios. Baseado nestes achados, o objetivo do presente trabalho foi investigar a malária subpatente em tribos indígenas de povos Ianomâmis, onde as baixas parasitemias parecem ser frequentes. A população de estudo foi constituída de indivíduos pertencentes a cinco aldeias Ianomâmis do Polo Base Marari, estado do Amazonas. O estudo envolveu dois cortes transversais, sendo realizados nos meses de setembro (primeiro corte transversal) e novembro (segundo corte transversal) de 2014. Foram incluídos no estudo um total de 914 indígenas, com cerca de 1590 amostras de sangue coletadas em papel de filtro. Para o diagnóstico molecular de malária, quatro diferentes protocolos de PCR foram utilizados, sendo três baseados em alvos ribossomais (18S rRNA) e um em alvos não ribossomais (Pvr47/Pfr364) dos plasmódios. Os resultados aqui obtidos permitiram demonstrar que os alvos Pvr47/Pfr364 foram os mais sensíveis para o diagnóstico de malária submicroscópica, embora não se mostraram adequados para o diagnóstico de espécie. Dentre os protocolos baseados no gene 18S rRNA aqui utilizados (Nested-PCR, RT-Mangold e RT-Rougemont), a Nested-PCR (método molecular de referência) se mostrou mais apropriada para o diagnóstico específico das infecções maláricas submicroscópicas. Em conjunto, este estudo de infecção malárica em populações Ianomâmis permitiu demonstrar que: (i) enquanto 0,9% das amostras foram positivas pela microscopia ótica (MO), diagnóstico de rotina, os protocolos moleculares identificaram 7,8% de positividade; (ii) *P. vivax* foi a espécie predominante, seguido do *P. malariae* e *P. falciparum* em proporções similares; (iii) a positividade por malária diminuiu com a idade (crianças>adolescentes>adultos) e foi influenciada pelas variações sazonais (setembro>novembro); (iv) a prevalência de malária variou significativamente nas diferentes aldeias, sugerindo que a doença não está homogeneamente distribuída na área de estudo. Espera-se que os resultados aqui obtidos possam contribuir para o direcionamento e monitoração de medidas de controle em reservas indígenas, bem como estimar a real incidência de malária nas áreas sob vigilância epidemiológica.

ABSTRACT

In the last few years, considerable success in reducing malaria incidence has been achieved in Brazil mainly as result of global efforts to control disease. In this new scenario, the need to detect and treat submicroscopic infections is becoming increasingly important, as these individuals can be a source of infection for mosquito vectors. Aiming to improve molecular diagnosis of malaria, our research group has standardized a real-time PCR protocol (RT-PCR), highly sensitive, for the detection of non-ribosomal plasmodium targets. Based on these findings, the goal of the present work was to investigate subpatent malaria infection in Yanomâmis indigenous tribes, where low levels of parasitaemia seems to be common. The study population involved five Yanomâmis communities from the indigenous district of "Polo Base Marari", Amazon state. Two cross-sectional studies were carried-out by the research team, in september (first survey) and november (second survey) of 2014. A total of 914 indigenous were involved in the study, and 1590 blood samples were collected in filter paper. For molecular diagnosis of malaria, four different PCR protocols were tested, three based on ribosomal (18S rRNA) target and one non-ribosomal (Pvr47/Pfr364). The results obtained demonstrated that Pvr47/Pfr364 was the most sensitive protocol, however, these targets did not differentiate *Plasmodium* species. Among the protocols based on the 18S rRNA gene (Nested-PCR, RT-Mangold and RT-Rougemont), the Nested-PCR (reference molecular method) was more suitable for the specific diagnosis of submicroscopic infection. Taken together, this study of malaria infection in Yanomani population showed that: (i) while 0.9% of positivity was detected by the optical microscopy (MO), the conventional routine diagnosis, molecular diagnosis was able to detect 7,8%; (ii) *P. vivax* was the most prevalent specie in the area, followed by *P. malariae* and *P. falciparum* in similar proportions; (iii) malaria positivity decreased with age (children>teenagers>adults) and fluctuates according to seasonal variations (september>november); (iv) malaria prevalence varied according to the Yanomani tribe, which suggest that malaria is not homogeneous transmitted in the study area. The results presented here may account for strategic plans to control malaria in indigenous populations, and to estimate the real malaria incidence in areas under epidemiological vigilance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da endemicidade de malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	17
Figura 2. <i>Shabono</i> da comunidade de Taibrapa, evidenciando a formação circular, bem como a grande praça central.....	24
Figura 3. Visão interna do <i>shabono</i> da comunidade de Taibrapa, onde pode-se observar as estruturas em palha e madeira, assim como a ausência de repartições internas.....	24
Figura 4. Localização da área de estudo, demonstrando o Polo Base Marari ao norte do estado do Amazonas.....	34
Figura 5. Mapa da área de estudo, ressaltando os principais rios, as localidades que conformam os Polos Base e a Sede do Polo Base.....	35
Figura 6. Fluxograma referente ao desenho experimental utilizado para o diagnóstico molecular de malária nas amostras pertencentes as cinco comunidades da tribo indígena Yanomami.....	41
Figura 7. Positividade para malária por aldeia Yanomami. O gráfico ilustra o número de indivíduos positivos pela microscopia ótica (gota espessa) e protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold).....	52
Figura 8. Proporção de indivíduos positivos para malária de acordo com o gênero (feminino e masculino).....	53
Figura 9. Número de indivíduos positivos para malária de acordo com o grupo etário e método de diagnóstico, incluindo os protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold) e o exame parasitológico (MO).....	54
Figura 10. Número de indivíduos diagnosticados com malária de acordo com o período de coleta e método de diagnóstico, incluindo protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold) e o exame parasitológico (gota espessa - MO).....	55
Figura 11. Representação gráfica ilustrando a amplificação de DNA moldes obtida a partir do protocolo molecular RT-Rougemount.....	58
Figura 12. Positividade das amostras estudadas de acordo com a espécie de plasmódio amplificada por protocolos moleculares baseados no gene 18S rRNA dos plasmódios.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados do número de habitantes por sexo e faixa etária para cada uma das comunidades estudadas.....	35
Tabela 2. Esquematização das coletas realizadas em setembro e novembro e as amostras submetidas à extração de DNA.....	37
Tabela 3. Resumo das sequências de iniciadores da PCR convencional para amplificação dos genes do sistema ABO.....	42
Tabela 4. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para as reações de RT-PCR padronizadas no Laboratório de Malária do CPqRR (RT-PCR LAMAL).....	43
Tabela 5. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para a reação de RT-PCR para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Mangold).....	45
Tabela 6. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para a reação de Nested-PCR e tamanho da sequência amplificada por cada par de iniciador.....	46
Tabela 7. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para a reação de RT-PCR para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Rougemount).....	47
Tabela 8. Resultado da positividade dos ensaios moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold), com seus respectivos alvos moleculares, segundo a positividade na microscopia ótica (MO).....	50
Tabela 9. Distribuição de frequência das amostras positivas para malária de acordo com a espécie de plasmódio identificada protocolo molecular (RT-Mangold) e pela microscopia ótica (MO).....	51
Tabela 10. Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para a infecção malárica, referentes ao corte de setembro e novembro-2014 (n=1590), frente aos protocolos moleculares adicionais aplicados nas amostras previamente positivas (Nested-PCR e RT-Rougemount).....	59
Tabela 11. Índice kappa de concordância entre os três protocolos moleculares aplicados (RT-Mangold, Nested-PCR e RT-Rougemount).....	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CP – Controle positivo

CPqRR – Centro de Pesquisa René Rachou

DNA – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DSEI-Y – Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami

FTA – Whatman® FTA® Card Technology (Sigma-Aldrich)

LAMP-PCR – Loop-Mediated Isothermal PCR

mM – Milimolar

MO – Microscopia ótica

n – Número de indivíduos

neg. – Negativo

OMS – Organização Mundial de Saúde

pb – Pares de base

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

Pf – *Plasmodium falciparum*

PF – Papel de filtro

Pv – *Plasmodium vivax*

Pm – *Plasmodium malariae*

PNCM – Plano Nacional de Controle de Malária

RDT – Rapid Diagnostics Testes (Testes Rápidos para Diagnóstico)

RT – Real time

SSU rRNA – Subunidade menor do RNA ribossomal

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde

Tm – Temperatura de *melting* (dissociação)

µl – Microlitro

µM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Malária no mundo.....	17
1.2 Malária no Brasil.....	18
1.2.1 Panorama atual da malária no Brasil.....	20
1.3 Malária no território indígena Yanomami.....	22
1.3.1 Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y).....	22
1.3.2 Histórico da malária no DSEI-Y.....	25
1.4 Diagnóstico de malária.....	26
1.4.1 Diagnóstico parasitológico.....	26
1.4.2 Teste imunocromatográfico rápido.....	27
1.4.3 Diagnóstico molecular.....	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 PACIENTES E MÉTODOS	34
4.1 População de estudo.....	34
4.2 Cortes transversais e coleta de amostras.....	36
4.3 Diagnóstico de malária por microscopia ótica.....	37
4.4 Extração de DNA a partir de sangue em papel de filtro.....	38
4.4.1 Titulação de amostras de <i>P. falciparum</i> para avaliação do desempenho da PCR RT-LAMAL utilizando papel de filtro xaroposo e FTA card (Sigma-Aldrich).....	39
4.5 Painel de amostras.....	39
4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	40
4.6.1 PCR em tempo real para amplificação do sistema de grupo sanguíneo ABO.....	41
4.6.2 PCR em tempo real para amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 (RT-PCR LAMAL).....	42
4.6.3 PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Mangold).....	44
4.6.4 PCR convencional para amplificação do gene 18S rRNA (Nested-PCR Snounou).....	45
4.6.5 Padronização da PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Rougemount).....	46
4.7 Análise dos dados.....	47
5 RESULTADOS	49
5.1 Protocolos moleculares baseados em diferentes alvos plasmodiais (RT-LAMAL e RT-Mangold) para caracterizar as infecções maláricas na tribo indígena Yanomami.....	49
5.2 Fatores demográficos e epidemiológicos influenciando a positividade de malária nas aldeias ianomâmis.....	51
5.3 Amplificação pela Nested-PCR e RT-Rougemount das amostras	

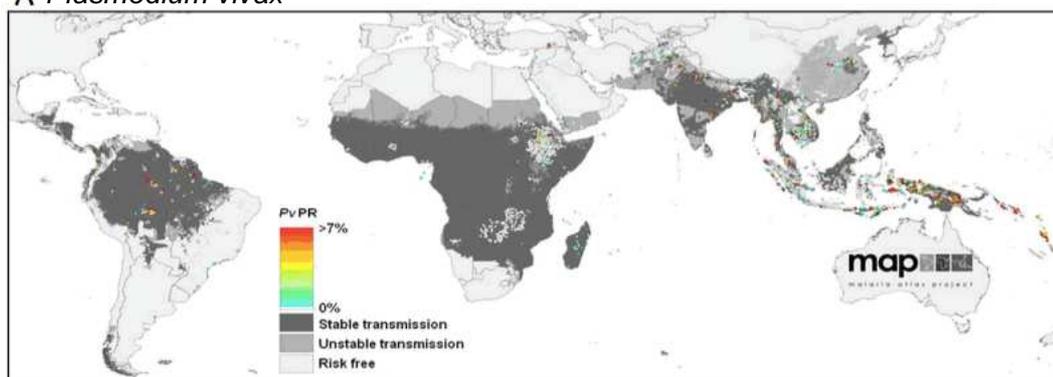
previamente identificadas como positivas por protocolos moleculares já estabelecidos.....	56
5.3.1 Padronização da PCR em tempo real RT-Rougemount para amplificação do gene 18S rRNA.....	56
5.3.2 Amplificação das amostras positivas pela Nested-PCR e RT-Rougemount.....	58
5.4 Desempenho da PCR em amostras de sangue estocadas em diferentes tipos de papel de filtro (xaroposo e FTA Card (Sigma-Aldrich)).....	62
6 DISCUSSÃO	63
6.1 Protocolos moleculares no diagnóstico de malária em ameríndios ianomâmis.....	64
6.1.1 Alvos ribossomais (18S rRNA) e não-ribossomais (Pvr47/Pfr364) para o diagnóstico de malária humana.....	64
6.1.2 Técnicas moleculares baseadas no gene 18sRNA dos plasmódios para o diagnóstico de espécie nas aldeias ianomâmis (Nested-PCR, RT-Mangold e RT-Rougemount).....	66
6.1.3 Avaliação do desempenho dos papeis de filtro (xaroposo e FTA Card (Sigma-Aldrich)) para a amplificação de plasmódio.....	68
6.2 Malária nas aldeias ianomâmis.....	69
7 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária no mundo

Considerada uma das principais doenças parasitárias que acometem o homem, a malária é caracterizada como relevante, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Neste contexto, o continente africano destaca-se em razão da intensificação dos acometimentos (WHO, 2014). Neste continente, a doença é ocasionada, principalmente, pela espécie *Plasmodium falciparum* (Figura 1), comumente responsável pela forma mais grave da doença e pelo agravo no número de casos associados à morte e intensa morbidade (HAY *et al.*, 2010; SNOW *et al.*, 2005).

A *Plasmodium vivax*



B *Plasmodium falciparum*

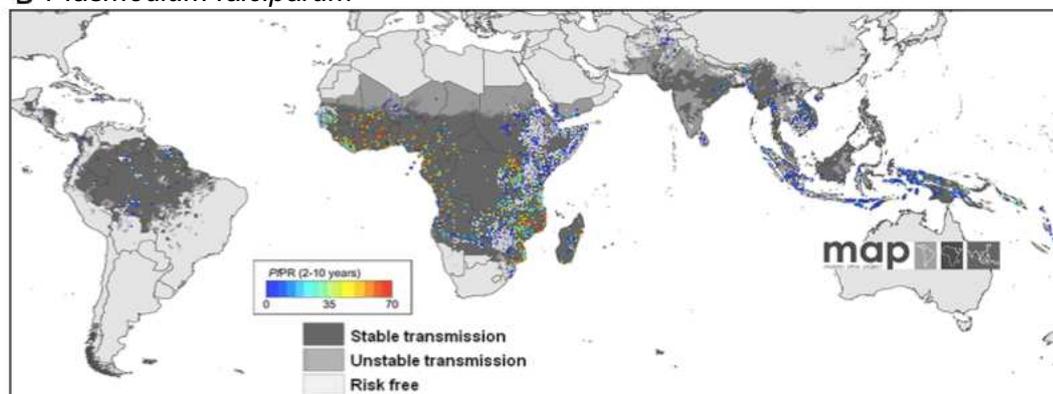


Figura 1. Distribuição mundial da endemicidade de malária por *Plasmodium vivax* (A) e *P. falciparum* (B). Áreas são definidas como estáveis (cinza-escuro), instáveis (cinza-médio) ou sem risco (cinza-claro). Os dados de parasitemia são apresentados

em um contínuo de azul a vermelho (0%-100%), sendo a parasitemia estimada aleatoriamente em uma população e definida por intermédio de exames parasitológicos ou teste rápido. Fonte: Adaptado de GETHING *et al.*, 2011 e GETHING *et al.*, 2012.

Dados recentes referentes a distribuição global da malária indicam que a transmissão desta doença transcorre ativamente em 97 países (WHO, 2014). Mundialmente são estimados que 3,2 bilhões de pessoas habitam áreas com risco de contrair a malária. Neste sentido, considera-se que em 2013, ocorreram, aproximadamente, 584 mil mortes em decorrência da doença em âmbito mundial, as quais se concentraram, principalmente, no continente africano. Neste mesmo período, apurou-se que 78% dos óbitos acometeram crianças menores de cinco anos (WHO, 2014).

Nos últimos anos, foram constatados inúmeros avanços em nível mundial nas pesquisas envolvendo o controle de malária, as quais proporcionaram uma redução significativa da morbimortalidade desta doença em muitas regiões endêmicas no mundo (TAUIL, 2011).

Entre os anos de 2000 e 2013 registrou-se uma redução de aproximadamente 47% na taxa de mortalidade em âmbito mundial. O mesmo cenário foi observado nos países da África, nos quais observou-se um decréscimo de 54% neste parâmetro (WHO, 2014). Já nas Américas verificou-se uma diminuição de aproximadamente 60% do número de casos de malária notificados entre os anos de 2001 e 2012 (REGUILLO *et al.*, 2015).

1.2 Malária no Brasil

Tratando-se do domínio nacional, três são as espécies causadoras da malária humana, sendo estas *P. vivax*, *P. falciparum* e *Plasmodium malariae*, com a maioria dos acometimentos decorrentes de infecção por *P. vivax*, responsável por cerca de 80% dos casos notificados. Neste cenário, aproximadamente 99% dos casos notificados de malária derivam da região da Amazônia Legal, área que corresponde a 59% do território brasileiro e engloba a totalidade de nove estados (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (GUERRA *et al.*, 2005). Neste contexto, a presença de locais apropriados

para a criação dos mosquitos vetores (grandes reservatórios de água, limpa, sombreada e sem correnteza), bem como as baixas condições socioeconômicas da população local, contribuem para a transmissão e manutenção da doença (WHO, 2014).

Na região extra-Amazônica, mais de 80% dos casos registrados são importados de estados brasileiros pertencentes às áreas endêmicas, bem como do continente africano e de outros países da América do Sul (SVS/MS, 2010a; SVS/MS, 2010b). Apesar de serem áreas consideradas não endêmicas, essas regiões detêm elevada importância epidemiológica, uma vez que possuem potencial para transmissão autóctone da doença; em razão da presença de mosquitos vetores, do constante fluxo migratório entre indivíduos residentes em áreas endêmicas e da gravidade clínica em indivíduos não imunes (LORENZ *et al.*, 2015). Soma-se a isto, a falta de conhecimento e a ausência de familiaridade dos profissionais de saúde com a abordagem diagnóstica e terapêutica, agravando o tratamento e controle da doença.

A diminuição da mortalidade associada à doença na Amazônia brasileira contrasta com a alta letalidade entre os casos diagnosticados de malária fora da área endêmica. De fato, apenas 19% dos casos notificados na região extra-Amazônica são diagnosticados e tratados precocemente, isto é, nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas. Por outro lado, na região Amazônica, 60% dos casos são tratados de forma prematura. Isto explica a alta proporção de casos graves e número de óbitos sucedidos na região extra-Amazônica (LORENZ *et al.*, 2015).

Em regiões de Mata Atlântica têm sido reportados casos de transmissão autóctone de malária, os quais são transmitidos, principalmente, pelo *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (FEACHEM, 2009). Neste cenário, os vetores optam pelas bromélias como criadouros preferenciais, e por esta razão, os indivíduos com estreito contato com as florestas tropicais são os mais sujeitos à picada do vetor anofelino. As infecções decorrentes desta exposição encontram-se frequentemente associadas às espécies *P. vivax* e *P. malariae*, presentes de forma significativa neste bioma. Soma-se, a este quadro, a existência das espécies *P. simium* e *P. brasilianum*, que são parasitos comumente encontrados em macacos do Novo Mundo (COLLINS & JEFFERY, 2007).

Aparentemente, os protozoários *P. malariae* e *P. brasilianum* são variantes da mesma espécie, submetidos ao processo de especiação em diferentes hospedeiros, uma vez que não possuem diferenças morfológicas ou genéticas descritas entre eles (LALREMRUATA *et al.*, 2015). O mesmo acontece com as espécies *P. vivax* e *P. simium* (ALVARENGA *et al.*, 2015). Logo, acredita-se que hospedeiros primatas não humanos possam estar atuando como reservatórios naturais, sugerindo que uma parte do ciclo da malária extra-Amazônica seja de caráter zoonótico (LALREMRUATA *et al.*, 2015). Estudos recentes realizados por Laporta *et al.*, (2015), detectaram a presença de *P. falciparum* em amostras de doadores de sangue no estado de São Paulo, bem como associaram este parasito à *Anopheles (Kerteszia) cruzii* coletados em regiões específicas da Mata Atlântica, questionando, assim, a complexidade epidemiológica da malária na região extra-Amazônica.

Dentre as espécies causadoras da malária, *P. malariae* é tido como pouco frequente na população humana. Contudo, estudos com limites de detecção otimizados correlacionam a presença deste parasito em várias regiões endêmicas de malária do mundo, incluindo no Brasil (AUTINO *et al.*, 2012). Estudo realizado em 2008 revelou, ainda, que aproximadamente metade dos casos positivos para malária na comunidade indígena Yanomami eram resultantes da presença de *P. malariae* (METZGER *et al.*, 2008).

1.2.1 Panorama atual da malária no Brasil

No decorrer do ano de 2014, foram notificados cerca de 145 mil casos de malária no Brasil, número significativamente reduzido, quando comparado aos anos anteriores (SVS/MS, 2015). Contudo, ainda existem grupos populacionais nos quais a atenuação não foi satisfatória, como é o caso das comunidades indígenas (REGUILLO *et al.*, 2015)

Neste sentido, o governo brasileiro instituiu o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) responsável pelas melhorias nas estruturas das Unidades de Saúde, bem como pelo incentivo à fiscalização em pontos de transmissão da doença, atuando diretamente no diagnóstico e tratamento precoce. Desta forma, em regiões de alta transmissão de malária, onde a população desenvolve um certo grau de imunidade contra a doença e os casos assintomáticos

são frequentes, como é o caso da área indígena Yanomami, seria ideal realizar o diagnóstico periodicamente, através de busca ativa, objetivando com isto abranger toda a população, independente da presença de sintomas (COURA *et al.*, 2006). Entretanto, os métodos de diagnóstico de rotina (microscopia e teste rápidos) não são suficientemente sensíveis na detecção de infecções subpatentes (HÄNSCHEID, 2003).

Embora tenha ocorrido uma queda do número de casos de malária ao longo dos últimos anos no Brasil, os focos de transmissão decorrentes da presença de *P. vivax* ainda persistem. Do ponto de vista do controle, *P. vivax* apresenta grandes desafios, já que está frequentemente associado a baixas parasitemias (algumas vezes submicroscópicas) e apresenta formas latentes no fígado (hipnozoítos), responsáveis pelas recaídas da doença meses após a infecção inicial (CHENG *et al.*, 2015). Neste contexto, o predomínio de *P. vivax* também encontra-se associado à implementação do diagnóstico precoce e tratamento da malária por *P. falciparum* com derivados de artemisinina (Coartem), droga consideravelmente eficiente.

De fato, o tratamento precoce, antes que os gametócitos de *P. falciparum* apareçam na circulação, demonstrou considerável impacto na transmissão desse parasito. Já o tratamento precoce contra *P. vivax* não apresentou muita eficácia, uma vez que os gametócitos se mantêm circulantes no sangue cerca de três dias após o início do ciclo eritrocítico (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010). Além disso, as infecções decorrentes da presença de *P. vivax* transcorrem, na maioria das vezes, em infecções preferencialmente benignas e muitas vezes assintomáticas, favorecendo a subnotificação desta espécie. Especialmente nas regiões extra-Amazônicas, a malária febril é frequentemente confundida com outras patologias, não sendo descrita corretamente e ofuscando o cenário real da malária nestas regiões (LORENZ *et al.*, 2015).

Com relação à *P. malariae*, espécie negligenciada em nosso meio, os dados oficiais sugerem que este agente etiológico seja pouco prevalente no Brasil (McKENZIE *et al.*, 2001). Contudo, este parasito possui formas capazes de permanecerem no sangue, em baixas parasitemias, por um período de tempo considerado, assumindo, desta forma, um caráter crônico. Associa-se a isto, a similaridade morfológica a outras espécies, dificultando a detecção deste parasito em exames parasitológicos de rotina. Além disso, são características desta espécie

o baixo número de merozoítos produzidos nos ciclos eritrocíticos, bem como o desenvolvimento dos ciclos sanguíneos com duração de, aproximadamente, 72 horas e a preferência do parasito em se desenvolver em hemácias maduras (COLLINS & JEFFERY, 2007). Devido a tais agravantes, associados à escassez de estudos vinculados a este parasito, as infecções decorrentes da presença de *P. malariae* necessitam de técnicas moleculares para o diagnóstico de certeza, reforçando a ideia de que os dados associados a este agente etiológico estejam subnotificados (McKENZIE *et al.*, 2001).

A grande redução do número de casos de malária na última década avança a possibilidade de interromper a transmissão da doença em algumas regiões do território nacional (TAUIL, 2011). Para tal, faz-se necessária a detecção de infecções submicroscópicas, uma vez que indivíduos pauciparasitados constituem reservatórios da doença, mesmo sem a manifestação clínica, podendo, desta forma, infectar mosquitos vetores. Logo, o diagnóstico precoce destes indivíduos auxilia no tratamento específico, e, conseqüentemente, interrompe o ciclo de transmissão da doença (TAUIL, 2011).

A sensibilidade limitada da microscopia ótica (MO), método de diagnóstico de rotina, bem como dos testes rápidos de imunocromatografia, comprometem a detecção do parasito em muitas infecções submicroscópicas (HÄNSCHEID, 2003). Isto é particularmente relevante no contexto dos programas de controle, uma vez que estes visam identificar, de forma precoce e coerente, os indivíduos infectados; a fim de mensurar a real prevalência da doença nas áreas sob vigilância epidemiológica.

1.3 Malária no território indígena Yanomami

1.3.1 Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y)

O censo demográfico realizado pelo IBGE, em 2010, apontou que a população indígena brasileira corresponde a aproximadamente 896.917 pessoas. Estes grupos ameríndios concentram-se, principalmente, na Amazônia Legal e preservam ampla diversidade linguística e cultural. Embora 36,2% da população considerada indígena viva em áreas urbanas, a grande maioria (63,8%) reside em

áreas rurais, dentre as quais muitas são de difícil acesso na floresta Amazônica (IBGE, 2012).

Desde 1999, a população indígena brasileira foi organizada em unidades de responsabilidade sanitária federal (Lei Nº 9.836 de 24 de setembro de 1999) -- denominadas Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI) -- ficando a execução da atenção à saúde indígena sob a responsabilidade da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, braço executivo do Ministério da Saúde do Brasil. Cada DSEI corresponde a uma ou mais terras indígenas, sendo a DSEI dos grupos indígenas ianomâmis (DSEI-Y) uma das 34 DSEI criadas no Brasil (MS/FNS; 2010).

O território indígena Yanomami reflete 5% do total de indígenas em âmbito nacional, sendo, desta forma, considerada a ocupação indígena com maior número de habitantes. Logo, contemplam uma dimensão territorial de aproximadamente 192.000km², abrangendo o norte da Amazônia brasileira e áreas vizinhas da Venezuela (CARTER & MENDIS, 2002). Estes indivíduos integram uma sociedade formada basicamente por caçadores, coletores e agricultores; o que os torna dependentes dos recursos naturais (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Ressalva-se que o domínio da língua portuguesa é variável entre os membros das comunidades; oscilando de acordo com a intensidade e frequência do contato com populações não indígenas (KELLY *et al.*, 2007).

Os grupos indígenas ianomâmis são geralmente organizados em casas plurifamiliares, denominadas *shabonos* (Figura 2). Estes sistemas consistem basicamente em grandes estruturas circulares que convergem em praças centrais destinadas a vários tipos de atividades. Estas construções são feitas, sobretudo, de madeira, barro, palhas e folhas de palmeira (Figura 3). Dentro dos *shabonos*, cada família se organiza ao redor de uma fogueira, não havendo paredes ou estruturas internas que separam uma família da outra. À noite, as redes são dispostas próximas ao fogo que é nutrido durante todo o período, a fim de manter a temperatura agradável (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015).



Figura 2. *Shabono* da comunidade de Taibrapa, evidenciando a formação circular, bem como a grande praça central. Fonte: Tese Doutorado Jordi Ribas, 2015.



Figura 3. Visão interna do *shabono* da comunidade de Taibrapa, onde pode-se observar as estruturas em palha e madeira, assim como a ausência de repartições internas. Fonte: Tese Doutorado Jordi Ribas, 2015.

A mobilidade é uma característica muito relevante na cultura deste povo seminômade. Os deslocamentos durante longos períodos são praticados na busca de novas residências (onde passam parte do ano), ou, ainda, para visitar comunidades vizinhas. Ressalva-se que o contato com ameríndios derivados da Venezuela são constantes. Neste contexto, os frequentes deslocamentos, bem

como a proximidade de possíveis criadouros de vetores anofelinos influenciam na transmissão de malária e na aplicabilidade das intervenções de controle (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015).

O deslocamento para as diversas comunidades do estudo encontra-se diretamente vinculado aos períodos de chuvas e estiagem. Já a sede do Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y) consolida-se em Boa Vista (Roraima), sendo o acesso aos Polos Base do distrito Yanomami realizado por pequenas aeronaves que partem da matriz. Com relação à comunicação, esta é realizada, primordialmente, por intermédio da radiofonia (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015).

1.3.2 Histórico da malária no Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y)

Até a década de 1960, os ianomâmis residentes no Brasil viviam praticamente isolados, sendo que os primeiros relatos de casos de malária na comunidade ocorreram em razão do contato inicial com grupos não indígenas. Por tal motivo, até a década de 1980, a malária era restrita às áreas periféricas da reserva Yanomami. Contudo, a partir de 1987, ocorreu uma invasão significativa de garimpeiros na localidade, resultando na transmissão autóctone da malária (MS/FNS, 2006). A partir deste episódio, a doença se disseminou, atingindo, inclusive, as comunidades mais isoladas e sem recursos.

A assistência à saúde dos ianomâmis encontra-se diretamente relacionada ao conceito singular que estas comunidades indígenas detêm sobre doenças (embora em algumas localidades exista uma boa compreensão dos diferentes elementos necessários e responsáveis pela transmissão de doenças, como por exemplo, a malária) (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Geralmente, esta sociedade desfruta de crenças que associam as patologias a origens mágicas ou sobrenaturais (KELLY *et al.*, 2007). Felizmente, ocorre certa diferenciação entre as epidemias derivada dos “brancos”, das demais doenças, facilitando, assim, a aceitação ao tratamento.

Em território nacional, as epidemias maláricas concentram-se na Amazônia Legal brasileira, preferencialmente, em comunidades indígenas. A título de exemplo, no decorrer dos anos 2003 a 2009 o número de ameríndios infectados

creceu mais de 300% (REGUILLO *et al.*, 2015). Mais especificamente, em 2011, aproximadamente 10,6% dos casos de malária na Amazônia foram registrados em comunidades ameríndias, destacando o estado do Amazonas para a maioria dos acometimentos (MS/SVS, 2000-2011). Portanto, faz-se necessário conhecer o risco potencial da malária nas populações indígenas, particularmente, entre os povos ianomâmis que tem estado sob risco constante de doenças devido à invasão de garimpeiros e extrativistas; agravando o número de casos.

1.4 Diagnóstico de malária

O desenvolvimento de um método de diagnóstico para malária que seja eficiente, rápido e de fácil execução tem motivado pesquisas em todo o mundo; isto é relevante já que o tratamento adequado está diretamente relacionado à identificação correta e precoce da espécie de plasmódio. Desta forma, é essencial que o método de detecção atenda alguns parâmetros, por exemplo, altos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia; além de almejar um melhor custo benefício e de apresentar um rápido desempenho em sua execução. No caso da malária, faz-se necessário suprir estas exigências, uma vez que o diagnóstico desta doença é um dos pilares dos atuais programas de prevenção e controle em âmbito mundial (WHO, 2013). Nesse sentido, vários são os métodos utilizados, atualmente, para o diagnóstico de malária, incluindo técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares (HANSCHEID, 1999; SVS, 2010b).

1.4.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico de rotina para a malária humana é, historicamente, baseado na detecção do parasito no sangue, possibilitando, assim, a identificação das diferentes espécies causadores da doença, em diferentes estágios biológicos (ERDMAN & KAIN, 2008).

Estabelecido como método padrão-ouro, a técnica parasitológica consiste na análise da gota espessa corada com Giemsa. Em virtude do baixo custo associado ao ensaio, bem como a capacidade de quantificação da densidade parasitária e monitoramento da resposta quimioterápica (acompanhamento de cura), este diagnóstico é considerado acessível. Contudo, apesar de ocupar posição de

destaque entre as outras técnicas, estudos recentes têm demonstrado que o exame microscópico também possui muitas limitações. Além da boa qualidade do material de preparo para leitura e interpretação do resultado; a técnica requer tempo, microscopistas experientes e equipamentos de boa qualidade (MANGOLD *et al.*, 2005).

Estudos prévios demonstram, ainda, que mesmo em diagnósticos realizados por microscopistas capacitados, há ocorrência de erros ou resultados inconclusivos, causados, principalmente, pela semelhança morfológica entre as espécies, baixo número de parasitos por campo no microscópio, ou ainda, infecções mistas, o que dificulta a precisão no diagnóstico do profissional (HANSCHEID, 2003; PROUX *et al.*, 2011). Tais desvantagens, aliadas à baixa sensibilidade do ensaio parasitológico (20-100 parasitos/ μ l de sangue) incentivam a busca de novos métodos diagnósticos, a fim de aprimorar e otimizar o diagnóstico da malária humana.

1.4.2 Teste imunocromatográfico rápido

Diversos testes diagnósticos rápidos (RDT, Rapid Diagnostic Tests) foram desenvolvidos para o diagnóstico de malária humana, sendo estes ensaios baseados na captura de antígenos do parasito na circulação sanguínea (MENS *et al.*, 2007). Disponível no mercado através de kits, este método não requer treinamento ou equipamento específico para a interpretação dos resultados. Associa-se a isto o fácil manuseio e transporte, alcançando regiões de difícil acesso. Logo, este método diagnóstico tem se mostrado de grande utilidade para triagens e confirmação de diagnósticos, principalmente para turistas que visitam áreas endêmicas, pacientes hospitalizados e eventuais surtos de malária (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007; ERDMAN & KAIN, 2008; MURRAY & BENNETT, 2009).

O princípio desta técnica é baseado em imunocromatografia em membrana de nitrocelulose, na qual a captura de antígenos circulantes do parasito é realizada por meio de anticorpos monoclonais, sendo a presença do antígeno indicada por uma alteração de coloração na fita (MOODY & CHIODINI, 2002).

Apesar de ser considerada uma técnica simples e acessível, a maior limitação dos testes rápidos é a baixa sensibilidade que, em geral, permite detectar

de 100 a 200 parasitos por microlitros de sangue (malERA, 2011).

1.4.3 Diagnóstico molecular

As ferramentas moleculares têm revolucionado a detecção e identificação de patógenos desde a década de 80, aprimorando as perspectivas para o diagnóstico de doenças infectoparasitárias. Neste contexto, o ensaio denominado PCR (reação em cadeia da polimerase) possui como princípio o uso de dois pares de iniciadores (responsáveis por flanquear uma sequência específica do DNA) que, juntamente com uma enzima (Taq polimerase), são empregados em sucessivos ciclos de desnaturação e extensão do material genético, com a finalidade de gerar milhares de cópias da sequência alvo (LORENZ, 2012)

As técnicas moleculares como ferramentas auxiliares aos métodos diagnósticos de malária, foram inicialmente descritas por Waters & McCutchan, em 1989, baseando-se em sequências gênero e espécie-específicas inseridas na região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal 18S dos plasmódios (18S rRNA). Desde então, uma variedade de protocolos vem sendo descritos baseados neste alvo (SNOUNOU *et al.*, 1993; MANGOLD, 2005; ROUGEMOUNT *et al.*, 2004).

Para o diagnóstico molecular de malária, algumas adequações da PCR convencional vêm sendo relatadas. Dentre essas, destaca-se a variante da reação em cadeia da polimerase, a PCR em tempo real, uma vez que esta possui a capacidade de realizar análises quantitativas de ácidos nucléicos presentes em determinadas amostras, além de dispensar a manipulação pós amplificação; fator este que diminui o tempo e risco de contaminação da técnica (KUBISTA *et al.*, 2006).

Recentemente, uma nova técnica molecular isotérmica, (LAMP PCR-Loop-mediated isothermal amplification) tem sido validada para testes diagnósticos (PARIDA, *et al.*, 2008). A LAMP consiste em uma técnica simples, de baixo custo e acessível, uma vez que possui o potencial de realizar análises em condições precárias de campo. Esta ferramenta, assim como a PCR em tempo real, dispensa a manipulação pós amplificação, em razão do produto ser visualizado através de turbidez ou fluorescência (PARIS *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2010).

Sabe-se que o gene 18S rRNA é um bom alvo para a diferenciação de plasmódios, pois apresenta regiões polimórficas flanqueadas por regiões

conservadas, facilitando o desenho dos iniciadores (LAL *et al.*, 1989; SNOUNOU *et al.*, 1993; DAS, 1995). Entretanto, algumas lacunas vinculadas ao baixo número (~8 cópias) de sequências deste gene no genoma das espécies de *Plasmodium*, associado ao fato de não serem idênticas e se mostrarem variavelmente expressas durante o ciclo de vida do parasito, comprometem a sensibilidade do protocolo.

Na busca de alvos potencialmente promissores para o diagnóstico molecular de malária, a estudante Lara Cotta Amaral, do Laboratório de Malária do CPqRR, descreveu em sua dissertação de mestrado, em 2014, um protocolo de PCR em tempo real capaz de amplificar as sequências Pvr47 e Pfr364, presentes em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, ainda sem funções conhecidas (DEMAS *et al.*, 2011). Neste contexto, a sequência Pfr364 encontra-se presente em 41 cópias no genoma de *P. falciparum*, cada uma delas localizada na região de repetição subtelomérica SB2. Por outro lado, Pvr47 se encontra em 14 cópias no genoma de *P. vivax*, sendo dois membros dessa família localizados próximos aos genes *vir*, enquanto um terceiro se encontra próximo à proteína transmembrana subtelomérica *Pvstp1* (DEMAS *et al.*, 2011).

Embora a aplicação dos métodos baseados em ferramentas moleculares para o diagnóstico de rotina da malária continue sendo um desafio, os protocolos baseados na PCR têm se mostrado uma das ferramentas mais promissoras na detecção de *Plasmodium*, por possuir alta sensibilidade e especificidade, detectando até mesmo infecções subclínicas (DEMAS *et al.*, 2011). Logo, as técnicas moleculares têm grande aplicabilidade em estudos epidemiológicos e quimioterápicos; bem como na triagem de bancos de sangue. Apesar da Organização Mundial de Saúde recomendar que os bancos de sangue sejam submetidos à triagem com o intuito de descartar a malária, a maior parte dos bancos de áreas endêmicas não utiliza nenhum método diagnóstico para triar potenciais doadores (NANSSEU *et al.*, 2013). A Amazônia brasileira não está em situação diferente, uma vez que a malária transfusional tem sido negligenciada na região (FREITAS & DUARTE 2014). Conseqüentemente, episódios de malária em decorrência deste agravante têm ocorrido em vários países, incluindo no Brasil (SCURACCHIO *et al.*, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

No contexto de baixos níveis de transmissão malárica, como verifica-se, atualmente, em grande parte do Brasil, muitas infecções são subpatentes e assintomáticas, não podendo ser diagnosticadas por intermédio de exames parasitológicos de rotina. Neste contexto, a vigilância epidemiológica precisa monitorar não apenas os casos clínicos e óbitos por malária, mas também direcionar para a detecção eficiente das infecções maláricas subpatentes, objetivando-se, com isto, identificar as áreas com risco de transmissão, as quais devem ser alvos de medidas de controle mais eficientes.

Desta forma, o emprego de um método diagnóstico eficaz propiciaria a identificação precoce do parasito e permitiria a caracterização da espécie; etapas fundamentais para a definição do esquema terapêutico. Para tal fim, os protocolos moleculares são consideravelmente mais sensíveis (OKELL *et al.*, 2011). Contudo, trabalhos anteriores, incluindo um estudo do nosso grupo de pesquisa, demonstraram baixa reprodutibilidade dos ensaios moleculares, atualmente disponíveis, particularmente nos casos de indivíduos pauciparasitados (CAMARGOS *et al.*, 2014). A utilização de técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico diferencial de malária humana tem sido descrita por vários autores, sendo especialmente utilizada para estudos epidemiológicos (MARCANO *et al.*, 2004; GRENFELL *et al.*, 2008; LASERSON *et al.*, 1999; METZGER *et al.*, 2008). Além disto, os protocolos de PCR podem ser muito úteis para esclarecer resultados duvidosos ou inconclusivos, dado que o diagnóstico de rotina, além de baixa sensibilidade, requer microscopista experiente.

No Brasil, das três espécies de plasmódio circulantes, *P. malariae* é a que apresenta menor frequência nas populações humanas; entretanto, apesar disto, encontra-se amplamente distribuído e seu diagnóstico diferencial com as outras espécies de plasmódios tem sido dificultado, particularmente, porque (i) esta espécie encontra-se frequentemente associada à baixas parasitemias, assumindo um caráter crônico; (ii) apresenta-se morfológicamente semelhante a outras espécies de *Plasmodium*, resultando em diagnóstico de incerteza. Além disso, os estudos envolvendo *P. malariae* ainda são pouco frequentes. A combinação destes fatores, associada à baixa patogenicidade do parasito e baixa sensibilidade dos protocolos

moleculares, contribuem para a subnotificação desta espécie de *Plasmodium*. Logo, faz-se necessário conhecer a real prevalência desta espécie em áreas endêmicas de malária, particularmente, em populações isoladas, como os ameríndios da Amazônia brasileira, onde os casos notificados de malária têm progredido (REGUILLO *et al.*, 2015)

A maior parte das metodologias atuais que visam o diagnóstico molecular específico de malária recorrem às sequências gênero e espécie-específicas, na região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal dos plasmódios, gene 18S (18S rRNA), caracterizada por regiões polimórficas flanqueadas por regiões conservadas, e expressas durante o ciclo de vida do parasito. Apesar disto, outros alvos têm sido descritos, principalmente para *P. vivax* e *P. falciparum* (DEMAS *et al.*, 2011); entretanto os novos alvos potencialmente promissores classificam as espécies, até o momento, apenas em nível de gênero. No entanto, este aspecto está sendo esclarecido e os resultados moleculares espécie-específicos serão re-estabelecidos.

Desta forma, o presente estudo pretende empregar diferentes protocolos moleculares, incluindo a técnica recém descrita pelo nosso grupo de pesquisa (AMARAL, 2014), visando, com isto, identificar as infecções maláricas subpatentes e assintomáticas. Neste contexto, o foco do trabalho são comunidades ameríndias isoladas, mais especificamente, índios ianomâmis da Amazônia brasileira.

A atual situação de saúde dos índios ianomâmis encontra-se debilitada em virtude da carência de cuidados, ausência de saneamento básico associada à baixa renda e desnutrição, particularmente comum entre os grupos indígenas. O agravo destes fatores os torna susceptíveis ao acometimento de doenças infecciosas, tais como malária, tuberculose e HIV, ocasionando elevada morbidade e mortalidade (GRENFELL *et al.*, 2008). Em suma, as comunidades indígenas amazônicas podem ser consideradas reservatórios residuais de malária, representado, assim, um grande desafio para a aplicabilidade de medidas de controle (REGUILLO *et al.*, 2015).

Neste contexto, objetiva-se estimar a real prevalência da malária em comunidades indígenas ianomâmis, com ênfase nas infecções decorrentes do *P. malariae*, já que este parasito parece ser frequente em populações isoladas (LALREMRUATA *et al.*, 2015). Para tal, pretende-se utilizar diferentes protocolos de PCR, visando, com isto, aumentar a sensibilidade para detecção de infecção

malária subpatente. Espera-se, assim, contribuir para o direcionamento e monitoração de medidas de controle em reservas indígenas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e distinguir infecções maláricas causadas por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* em indivíduos ianomâmis da Amazônia brasileira utilizando diferentes protocolos moleculares.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Padronizar e otimizar o protocolo de PCR em tempo real descrito por Rougemount, 2004, que se baseia na amplificação do gene RNA ribossomal 18S dos plasmódios (18S rRNA);

3.2.2 Caracterizar a prevalência de infecção malárica, através de protocolos que utilizam diferentes alvos moleculares (18S rRNA e Pvr47/Pfr364) em indivíduos provenientes da tribo indígena Yanomami;

3.2.3 Identificar os fatores demográficos e epidemiológicos que influenciam a positividade de malária em aldeias ianomâmis;

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 População de estudo

A assistência sanitária na Terra Indígena Yanomami no Brasil é operacionalizada através de 37 unidades de referência sanitária denominadas Polo Base de Saúde, os quais foram definidos a partir do agrupamento de comunidades próximas geograficamente, com maiores afinidades e laços de convivência sociocultural (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Os Polos Base encontram-se estruturados como unidades básicas de saúde e contam com atuação de equipe multidisciplinar de saúde indígena, composta por um enfermeiro, um número variável de técnicos de enfermagem e guardas de endemias. Estes últimos são responsáveis por realizar os diferentes programas de saúde, atuando, por exemplo, no combate à malária. O presente estudo foi realizado em um Polo Base Yanomami -- denominado Marari -- localizado na parte mais setentrional do estado do Amazonas (Figura 4).

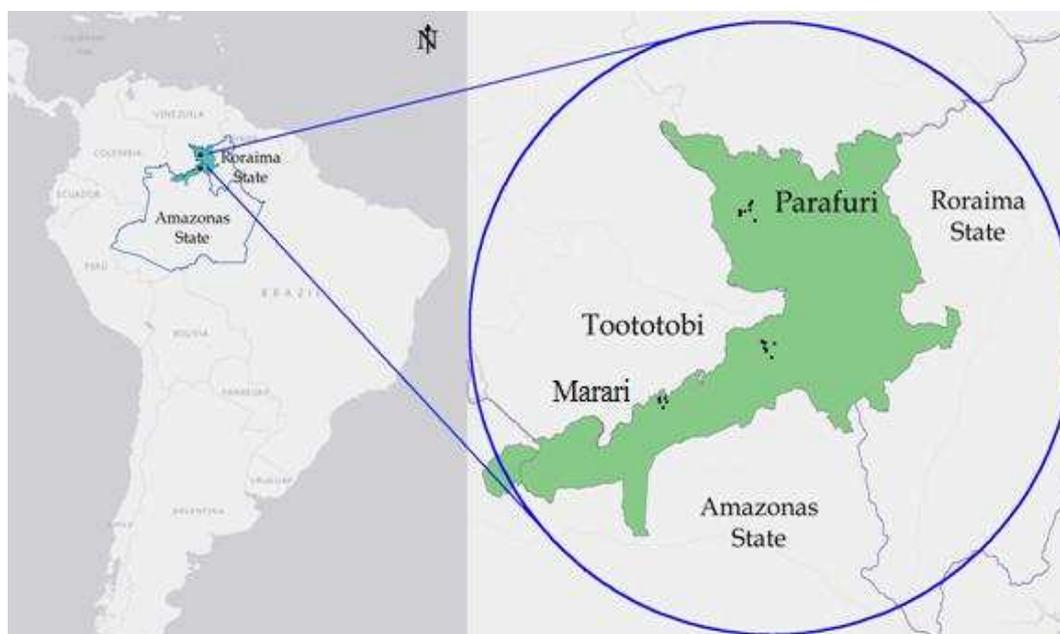


Figura 4. Localização da área de estudo, demonstrando o Polo Base Marari ao norte do estado do Amazonas. Fonte: Tese Doutorado Jordi Ribas, 2015.

O Polo Base Marari é composto por 1.012 indígenas que habitam cinco aldeias denominadas Castanha, Gasolina, Taibrapa, Alapusi e Ahima (Mamapi)

(Figura 5). Este Polo Base caracteriza-se por ter malocas com alta densidade populacional, denominadas *shabonos*. Vale ressaltar que todas as comunidades mencionadas foram incluídas no estudo.



Figura 5. Mapa da área de estudo, ressaltando os principais rios, as localidades que conformam os Polos Base e a Sede do Polo Base. Adaptado de: Tese Doutorado Jordi Ribas, 2015.

Nas populações estudadas existe um leve predomínio do sexo masculino (52,9-58,2%) e, na maior parte, de adultos jovens (Tabela 1).

Tabela 1. Dados do número de habitantes por sexo e faixa etária para cada uma das comunidades estudadas.

Características				
Polo Base Marari Comunidades (n)	Gênero (%)		Faixa etária (%)	
	Feminino	Masculino	<5 anos	<20 anos
Taibrapa (260)	45,3	54,7	19,7	56,4
Gasolina (256)	45,3	54,7	18,6	57,6
Castanha (264)	41,8	58,2	18,6	56,1
Alapusi (169)	47,1	52,9	17,4	54,8
Ahima (Mamapi) (63)	44,6	55,4	11	32

*SIVEP Malária, 2009 a 2014.

Entre 2009 a 2014, no Polo Base Marari foram registrados 9.104 casos de malária, sendo 6.683 (73,4%) atribuídos ao *P. vivax* e 2.421 (26,6%) ao *P.*

falciparum (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Nas comunidades do Polo Base de Marari, os números de casos de malária registrados corresponderam às buscas sistemática de casos (ativa e passiva). Os dados epidemiológicos de malária são gerados na sede do DSEI-Y em Boa Vista (RR), a partir de fichas de atividade dos microscopistas e relatórios enviados de campo. Desta forma, ocorre o delineamento dos sistemas de informação em saúde, bem como do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP).

4.2 Cortes transversais e coleta de amostras

As comunidades estudadas fazem parte de um projeto de pesquisa em rede, coordenado pela Dr^a. Joseli de Oliveria Ferreira, Laboratório de Imunoparasitologia, IOC-FIOCRUZ, que visa avaliar a prevalência das doenças parasitárias e virais entre povos ianomâmis no Brasil. Todos os aspectos éticos e metodológicos relacionados à pesquisa de populações vulneráveis foram aprovados pelos respectivos órgãos competentes, incluindo a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, protocolo # 16907) e o comitê de Ética do CPqRR (Protocolo CEP CPqRR N°358.698/2013). A todos os indivíduos participantes foram prestados esclarecimentos sobre os objetivos e procedimentos do projeto, sendo a participação voluntária, confirmada através do termo de consentimento e assentimento livre esclarecido. Vale salientar que toda a parte de campo, incluindo entrevistas e coleta de amostra de sangue em papel de filtro (FTA Card Technology (Sigma-Aldrich), foi realizada pela equipe da Dr^a. Joseli (IOC/Fiocruz).

O desenho experimental detalhado do estudo foi descrito previamente (RIBAS, Dissertação de Mestrado, 2015). Resumidamente, o estudo inclui quatro cortes transversais, com intervalo de dois meses; especificamente, setembro e novembro de 2014 (início da época seca), janeiro e março de 2015 (fim da época seca) (Tabela 2). Entretanto, o presente estudo aborda apenas as coletas realizadas em setembro e novembro de 2014. Em cada corte transversal foram realizadas entrevistas através de questionário e coleta de sangue em papel de filtro (polpa digital) dos voluntários residentes nas comunidades do Polo Base de Marari, incluindo as comunidades de Taibrapa, Gasolina, Alapusi, Castanha e Ahima (Mamapi).

Tabela 2. Esquematização das coletas realizadas em setembro e novembro de 2014 e o número de amostras submetidas à extração de DNA.

Polo Base Marari (n)	Coletas		Procedimento
	set/14	nov/14	Extração de DNA
Taibrapa (260)	202	216	418
Gasolina (256)	172	233	405
Castanha (264)	185	223	408
Alapusi (169)	103	145	248
Ahima (Mamapi) (63)	64	47	111
Total (1.012)	726	864	1590 amostras

Os papéis de filtro, depois de secos, foram acondicionados em sacos plásticos, envoltos em papel alumínio com sílica, e enviados ao Laboratório de Malária do CPqRR, onde foram acondicionados (temperatura ambiente) até a extração (item 4.4 Extração de DNA a partir de sangue em papel de filtro). O sangue coletado em papel de filtro correspondeu ao excesso (cerca de 30 microlitros) resultante da perfusão da polpa digital que é rotineiramente feita para a busca ativa de casos de malária.

4.3 Diagnóstico de malária por microscopia ótica

Uma vez coletada a amostra de sangue, por intermédio de punção da polpa digital, as mesmas foram submetidas à diagnóstico microscópico, utilizando a técnica de gota espessa corada com Giemsa. As lâminas foram preparadas e examinadas por microscopistas capacitados no local, conforme protocolo estabelecido pelo Ministério da Saúde (SVS/MS, 2009). Saliencia-se que os pacientes positivos para malária foram tratados de acordo com protocolos, já bem estabelecidos, pelo Ministério da Saúde (Guia Prático de Tratamento da Malária no Brasil (SVS/MS, 2010).

4.4 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. Ressalva-se que este procedimento já demonstrou grande eficiência na extração de DNA para este tipo específico de estocagem de amostra (COSTA, Dissertação de mestrado, 2010).

Resumidamente, círculos de papel de filtro contendo sangue (aproximadamente 30µL de sangue/papel) foram cortados e colocados em microtubos (eppendorf) de 1,5mL. Posteriormente, adicionou-se 180µL de tampão de lise celular ao tubo, sendo este incubado a 85°C durante 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 20µL da solução de proteinase K, sendo esta mistura homogeneizada por 30 segundos em agitador (vórtex) e, imediatamente incubada a 56°C, durante o intervalo de uma hora. Logo após, foram adicionados 200µL de tampão de lise, sendo os tubos posteriormente homogeneizados por 30 segundos em agitador (vórtex) e prontamente incubados a 70°C, por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200µL de etanol P.A (Merck), sendo o produto homogeneizado. Adiante, todo o material (\pm 500µL de eluato) foi adicionado em coluna *QIAamp spin* (associadas ao tubo de coleta de 2mL). Os tubos foram então, centrifugados a 800xg, no intervalo de 1 minuto, a 25°C. Em seguida, os recipientes contendo o filtrado foram descartados e as colunas foram colocadas em um novo tubo de 2mL. Posteriormente, foram adicionados 500µL de tampão para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado a 800xg, no decorrer de 1 minuto, a 25°C. Assim, a coluna foi introduzida em um novo tubo de 2mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500µL de tampão para uma segunda lavagem do material, sendo os tubos centrifugados a 1500xg, durante 4 minutos, a 25°C. Cada coluna foi colocada em novos microtubos do tipo eppendorf 1,5mL e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Finalmente, foram acrescentados 150µL de água destilada, a fim de eluir o material. Em seguida o complexo foi incubado a temperatura ambiente, por 5 minutos e centrifugado a 800xg, durante 1 minuto, a 25°C. Ao final, as colunas foram descartadas e o DNA foi armazenado a -20°C até seu uso.

4.4.1 Titulação de amostra de *P. falciparum* para avaliação do desempenho da PCR RT-LAMAL utilizando papel de filtro xaroposo e FTA Card (Sigma-Aldrich)

Com o intuito de apurar a eficiência do método de extração de DNA utilizando o DNA Mini Kit QIAamp® (QIAGEN) foi realizada a comparação do desempenho de ensaio molecular (utilizando a técnica denominada RT-LAMAL), a partir de papel de filtro (tipo xaroposo) e Whatman® FTA® Card Technology (Sigma-Aldrich). A comparação entre os dois tipos de coleta foi realizada através das análises de limite de positividade por intermédio do processamento das amostras em protocolo molecular (AMARAL, 2014). Neste contexto, amostras de *P. falciparum*, proveniente de cepa referência de cultivo contínuo do Laboratório de Malária (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007), com parasitemia estimada de 5%, foram diluídas em sangue de indivíduo normal, e, em seguida, tituladas.

Inicialmente, foi realizada uma diluição de 5x, a fim de se estabelecer uma parasitemia inicial de 1% (em um volume total de 500µl). Em seguida, foram feitas 5 diluições seriadas em um padrão de diluição de 3x (em um volume final de 300µl), iniciando em 1:5 até 1:1215, obtendo-se uma parasitemia final de 0,004%.

Uma vez realizada as diluições, foram dispensadas duas gotas de aproximadamente 20µl em paralelo no papel de filtro convencional e no FTA. Finalmente, as amostras foram submetidas à extração de DNA, conforme o item 4.4 e, posteriormente, processadas em protocolo molecular.

4.5 Painel de controles

Todos os ensaios de PCR foram realizados na presença de controles positivos e negativos. Como controles negativos foram utilizados amostras de indivíduos de área livre de transmissão, sabidamente negativos para malária. Além disto, em cada ensaio foi utilizado um controle negativo da reação, isto é, todos os reagentes na ausência de DNA, sendo este substituído por água para PCR.

Como controles positivos foram utilizados (i) DNA de *P. falciparum*, proveniente de isolados de referência mantidos em cultivo contínuo estabelecido no Laboratório de Malária do CPqRR; (ii) DNA de indivíduos sabidamente infectados por *P. vivax*, precisamente da região de Porto Velho, com parasitemias variadas, confirmadas pela microscopia óptica e protocolos moleculares; (iii) DNA plasmidial

de referência do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária-ATCC, USA), especificamente o plasmídeo MRA-179, para a detecção de *P. malariae*/*P. brasilianum*; (iv) amostras bem caracterizadas de *P. malariae*, gentilmente cedida pela Dra. Karin Kirchgatter (SUCEN - São Paulo).

Amostras com resultados duvidosos foram submetidas a uma segunda série de PCR em tempo real, a fim de evitar resultados falsos positivos.

4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Figura 6 ilustra o fluxograma geral utilizado neste estudo para processar as amostras estudadas. Resumidamente, visando um controle da qualidade do DNA extraído em papel de filtro, cerca de 10% das amostras foram amplificadas para um gene controle do hospedeiro vertebrado (sistema ABO, item 4.6.1). Vale ressaltar, que todas as amostras avaliadas para esta técnica amplificaram o gene alvo (sistema ABO), assegurando a integridade do DNA recém extraído.

Para a amplificação de alvos do parasito todas as amostras (n=1590) foram amplificadas através de dois ensaios moleculares que amplificam alvos diferentes, gene 18S rRNA dos plasmódios (RT-PCR MANGOLD, item 4.6.3) e alvos não ribossomais do *P. vivax* e *P. falciparum* (RT-PCR LAMAL, item 4.6.2). Em caso de positividade em algum dos protocolos anteriores, as amostras positivas foram submetidas a dois protocolos adicionais, sendo um de referência molecular (Nested-PCR, item 4.6.4) e outro recém padronizado (RT-PCR ROUGEMONT, item 4.6.5).

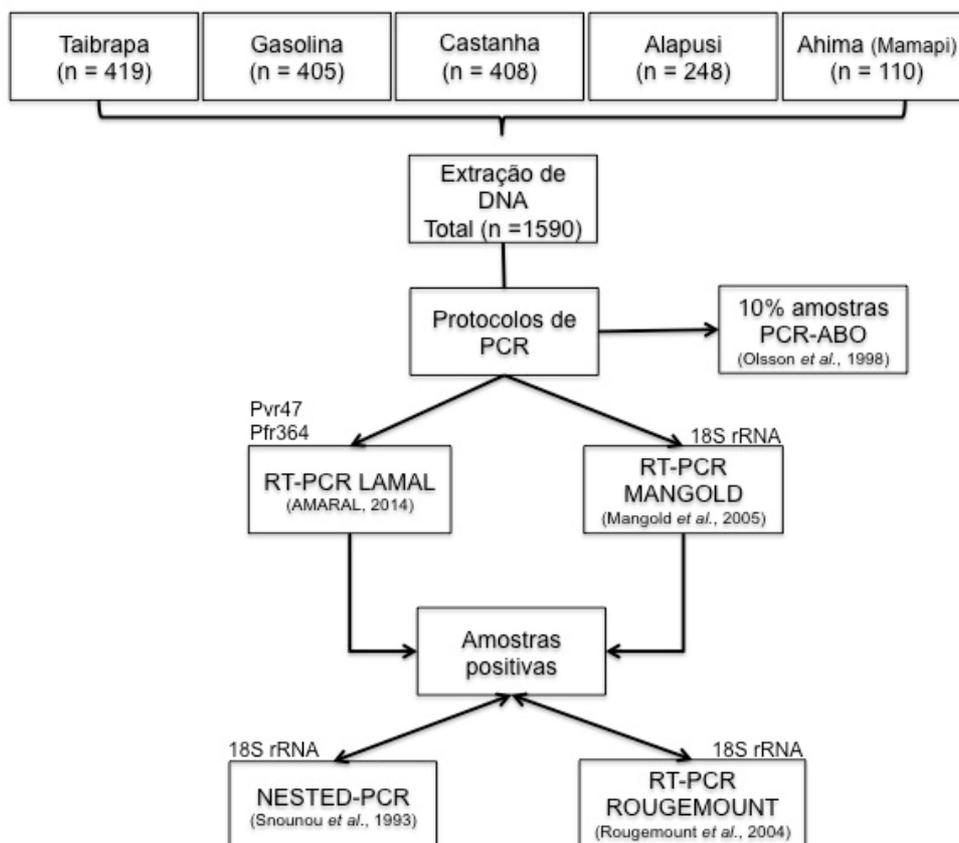


Figura 6. Fluxograma referente ao desenho experimental utilizado para o diagnóstico molecular de malária nas amostras pertencentes as cinco comunidades da tribo indígena Yanomami (amostras referentes aos cortes-transversais de setembro e novembro de 2014).

4.6.1 PCR em tempo real para amplificação do sistema de grupo sanguíneo ABO

Como forma de averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso e se os DNAs obtidos são de qualidade satisfatória para as técnicas moleculares 10% do total das amostras de DNA foram submetidas a um ensaio de PCR em tempo real. Esta técnica possui como alvo o gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO. O protocolo descrito por Olsson *et al.*, (1998) foi modificado, visando a adaptação para PCR em tempo real. Neste contexto, alterou-se o volume final da reação, a temperatura de anelamento e a ciclagem, com a finalidade de otimizar o tempo de execução da técnica.

O ensaio incorpora iniciadores dirigidos contra sequências no exon 7 do gene do grupo sanguíneo ABO, especificados na Tabela 3. A reação amplifica um fragmento de 419 pares de bases, dispondo das seguintes condições: 0,5µl de cada um dos iniciadores (a 10 µM cada), 5µl de Sybr Green (Applied Biosystems) e 1µl de DNA, para um volume total de 10µl.

As reações foram padronizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da Plataforma de PCR em Tempo Real do CPqRR, de acordo com as condições de amplificação: 95°C iniciais durante 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de amplificação, consistindo em 95°C por 30 segundos, 68°C em um intervalo de 30 segundos e 72°C durante um minuto final. A amplificação foi seguida por um programa de dissociação consistindo em 95°C durante 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C ao longo de 15 segundos. Posteriormente, as curvas de dissociação foram observadas através da avaliação da fluorescência por temperatura.

Tabela 3. Resumo das sequências de iniciadores da PCR convencional para amplificação dos genes do sistema ABO.

Alvo	Iniciadores*	Sequência
Sistema ABO	516S	5'GCTGGAGGTGCGCGCTAC3'
	96 AS	5'ACGAATTCTACTTGTTCAGGTGGCTGT GCGTC3'

*PCR ABO (Olsson *et al.*, 1998).

4.6.2 PCR em tempo real para amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 (RT-PCR LAMAL)

As amostras de DNA foram avaliadas pelo ensaio de PCR em tempo real, denominado LAMAL, descrito durante o mestrado da estudante Lara Cotta, em 2014 (AMARAL, 2014). Este protocolo utiliza dois pares de iniciadores para a detecção dos alvos recentemente descritos, Pvr47 e Pfr364, presentes em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (DEMAS *et al.*, 2011). Ressalva-se que este protocolo propõe condições diversas para cada par de iniciador, sendo o resumo dos iniciadores demonstrado na Tabela 4. Desta forma, a fim de assegurar a amplificação de *P. vivax* foram utilizados 0,25µM 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 volume de 20µl por reação. Já para amplificação da sequência de *P. falciparum*, foi estabelecido 1µM de cada iniciador (IDT), 5µl de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), sucedido de 2,5mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 2µl de DNA, totalizando 20µl finais.

As condições do ensaio fundamentaram-se em um aquecimento inicial de 95°C por 10 minutos, seguida por amplificação com 40 ciclos de 90°C por 20 segundos, 58°C durante 30 segundos e 60°C no decorrer de 30 segundos; com aquisição de fluorescência no final de cada passo de extensão. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de dissociação, que consiste em 95°C durante 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C ao longo de 15 segundos finais. Os gráficos de *melting* foram visualizados plotando a derivativa negativa de fluorescência pela temperatura (- dF/dT° vs. T°). A técnica foi executada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da Plataforma de PCR em Tempo Real do CPqRR.

Devido a conflitos de concordâncias entre protocolos moleculares, mais precisamente entre a técnica recém descrita (RT-LAMAL) e a Nested-PCR (dados não mostrados) optamos por classificar as amostras diagnosticadas por este ensaio apenas em nível de gênero. Posteriormente, pretendemos sequenciar as amostras conflitantes para esclarecer este quadro.

Tabela 4. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para as reações de RT-PCR padronizadas no Laboratório de Malária do CPqRR (RT-PCR LAMAL).

Alvo	Iniciadores*	Sequência	Tm(°C)**
<i>P. vivax</i>	PvDig F	5'CATTGCTGGTGCTTGTACTTA3'	72.7 -
	PvDig R	5'ATGATTTGCTGGAGATGTTAAA3'	74.1.°C
<i>P. falciparum</i>	PfDig F	5'ACTAATTTTCCCCTTGCACTTT3'	75.6 -
	PfDig R	5'TGCAAAGTTATAGTAATTAGAT3'	77.7°C

*Dissertação Lara Cotta, 2014.

**Temperatura de *melting*.

4.6.3 PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Mangold)

As amostras foram processadas mediante a técnica de PCR em tempo real descrita por Mangold *et al.*, (2005). A técnica reproduzida se fundamenta na detecção das quatro espécies de plasmódios humanos (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*) com a utilização de apenas um par de iniciadores consenso, delineado para a região espécie-específica, 18S rRNA. Os iniciadores utilizados são designados P1 e P2 e exemplificados na Tabela 5. Tais iniciadores amplificam fragmentos que variam no tamanho e constituição do fragmento, tornando possível a discriminação das espécies por meio de curvas de dissociação. A reação dispõe de 0,5µM de cada iniciador (IDT), acrescido de 1µl MgCl₂ (2,5mM) (Invitrogen), 10µl de Sybr Green (Applied Biosystems) e 2µl de DNA, resultando em 20µl por reação.

A PCR foi conduzida no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da Plataforma de PCR em Tempo Real do CPqRR. Neste contexto, as condições do ensaio consistiram um ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por amplificação com 40 séries de 90°C durante 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C em intervalo determinado de 30 segundos. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de dissociação consistindo em 95°C durante 15 segundos, 60°C ao longo de 20 segundos, e, 95°C por 15 segundos finais. As curvas de *melting* foram observadas na dissociação resultante da avaliação da fluorescência, visualizada plotando a derivativa negativa de fluorescência pela temperatura ($-dF/dT^{\circ}$ vs. T°), fator este que gera picos com amplitudes distintas, tornando possível distinguir as espécies.

Tabela 5. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para a reação de RT-PCR para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Mangold).

Alvo	Iniciadores*	Sequência	Tm°C **
<i>Plasmodium</i> <i>sp.</i>	P1	5' TAACGAACGAGATCTTAA 3'	<i>P. malariae</i> : 73.5 a 75.5°C
	P2	5' GTTCCTCTAAGAAGCTTT 3'	<i>P. falciparum</i> : 75.5 a 77.5°C <i>P. ovale</i> : 77.5 a 79.0°C <i>P. vivax</i> : 79.0 a 81.0°C

*RT-PCR (Mangold *et al.*, 2005).

**Temperatura de *melting*.

4.6.4 PCR convencional para amplificação do gene 18S rRNA (Nested-PCR Snounou)

As amostras de DNA foram submetidas a nested-PCR, estabelecida por Snounou *et al.*, (1993), utilizando-se os iniciadores rPLU5 e rPLU6 para a reação gênero específica referente à amplificação do *Plasmodium*. Posteriormente os pares de iniciadores rFAL1-rFAL2, rVIV1-rVIV2 e rMAL1-rMAL2 foram utilizados para as reações espécie-específicas, referentes à *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* respectivamente (Tabela 6). As concentrações dos reagentes utilizados para as reações de amplificação foram 0,25µM de cada iniciador (IDT), 10µl de PCR Master Mix (Promega) e 0,8µl de amostra de DNA, totalizando 20µl de produto final. 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 durante 2 minutos; seguida por amplificação com 24 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C no decorrer de 2 minutos. Ainda uma extensão final consistiu em 58°C por 2 minutos e 72°C ao longo de 5 minutos. Para a segunda reação, as condições de amplificação foram as mesmas da primeira, distinguindo apenas no número de ciclos, acrescido para um total de 29 ciclos. Os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Agargen), sendo este dissolvido em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), com adição de solução 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 15 minutos. O gel foi posteriormente analisado em transluminador ultravioleta e arquivado em sistema digital.

Tabela 6. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para a reação de Nested-PCR e tamanho da sequência amplificada por cada par de iniciador.

Alvo	Iniciadores*	Sequência	Amplicon
<i>Plasmodium sp.</i>	rPLU5	5' CCTGTTGTTGCCTTAACTTC 3'	1,2Kb
	rPLU6	5' TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG 3'	
<i>P. vivax</i>	rVIV1	5' CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC 3'	120pb
	rVIV2	5' ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA 3'	
<i>P. falciparum</i>	rFAL1	5' TTAACACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT 3'	205pb
	rFAL2	5' ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC 3'	
<i>P. malariae</i>	rMAL1	5' ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC 3'	144pb
	rMAL2	5' AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA 3'	

*Nested-PCR (Snounou *et al.*, 1993).

4.6.5 Padronização da PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR ROUGEMOUNT)

Com o intuito de identificar e distinguir os parasitos causadores da malária humana foi realizada a padronização/otimização do ensaio de PCR em tempo real com os iniciadores descritos por Rougemount *et al.*, (2004), conforme demonstrado na Tabela 7. Inicialmente foram utilizadas amostras de DNA controles, conforme descrito no item 4.5 e, em seguida, amostras de indivíduos naturalmente infectados provenientes da tribo indígena Yanomami. Neste sentido, a técnica foi padronizada no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da Plataforma de PCR em Tempo Real do CPqRR.

Tabela 7. Resumo das sequências dos iniciadores utilizados para a reação de RT-PCR para amplificação do gene 18S rRNA (RT-PCR Rougemount).

Alvo	Iniciadores/sondas	Sequência
<i>Plasmodium</i> <i>sp.</i>	plasmo1-F*	5' GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAG 3'
	plasmo2-R*	5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA 3'
<i>P. vivax</i>	viv-F**	5' CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTTTA 3'
	vivprobe*	5'VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-MGBNFQ3'
<i>P. falciparum</i>	fal-F**	5'CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTTAA 3'
	falcprobe*	5'FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-MGBNFQ-3'
<i>P. malariae</i>	mal-F**	5'CCGACTAGGTGTTGGATGATAGAGTAAA-3'
	malaprobe*	5'-FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-MGBNFQ-3'

*RT-PCR (Rougemount *et al.*, 2004).

**RT-PCR (Shokoples *et al.*, 2009).

4.7 Análise dos dados

Visando comparar diferentes proporções, foi utilizado o teste qui-quadrado. Este teste compara as diferenças entre as frequências observadas e esperadas para determinado evento, buscando 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 diferentes protocolos moleculares e a microscopia, com nível de significância de $p < 0,05$. Para os valores menores que cinco, utilizamos o Teste de Fisher ($p < 0,05$). Além disso, aplicamos o teste chi-quadrado de tendência com a finalidade de observar a inclinação da positividade de infecções maláricas em função da idade. Estas análises foram realizadas através do programa GraphPad InStat, versão 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Finalmente, a fim de estimar a concordância entre os métodos moleculares, foi realizada análise por intermédio do teste estatístico Kappa. Este coeficiente estabelece o grau de concordância em escalas nominais, fornecendo uma ideia do quanto as observações se afastam daquelas esperadas (concordância

observada (P_o) diminuída da concordância esperada (P_e), dividido por 1 menos a concordância esperada).

5 RESULTADOS

5.1 Protocolos moleculares baseados em diferentes alvos plasmodiais (RT-LAMAL e RT-Mangold) para caracterizar as infecções maláricas na tribo indígena Yanomami

As amostras provenientes da tribo indígena Yanomami, referentes aos cortes transversais de setembro (n=726) e novembro (n=864), totalizando 1590 amostras foram submetidas a diferentes protocolos moleculares com a finalidade de aumentar a sensibilidade na detecção de infecção malárica subpatente. Desta forma, os protocolos intitulados RT-LAMAL (alvos Pvr47 e Pfr364) e RT-Mangold (18S rRNA) foram utilizados para amplificar o DNA do *Plasmodium* em todas as amostras estudadas. Em caso de positividade, as amostras foram submetidas a duas técnicas adicionais, sendo a Nested-PCR (método de referência molecular) e o RT-Rougemount (item 5.3.1).

Conforme demonstrado na Tabela 8, o exame parasitológico realizado através de gota espessa corado com Giemsa (método padrão-ouro) foi capaz de diagnosticar 15 (0,9%) infecções maláricas nas 1590 amostras analisadas, as quais representavam 914 indivíduos coletados em momentos distintos. De relevância, o protocolo RT-LAMAL detectou como positivas todas as amostras previamente identificadas pela microscopia ótica (MO) e, adicionalmente, mais 95 (6%) amostras previamente negativas pelo método padrão-ouro (MO), totalizando 110 amostras positivas (6,9%).

Já com relação ao RT-Mangold, este ensaio se mostrou significativamente inferior ao RT-LAMAL, pois detectou apenas 4 (0,3%) das amostras diagnosticadas pela MO e confirmadas pela RT-LAMAL ($p < 0,001$). Apesar disto, foi capaz de amplificar outras 24 (1,5%) amostras previamente negativas pela MO, das quais 13 foram também amplificadas pelo RT-LAMAL.

Tabela 8. Resultado da positividade dos ensaios moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold), com seus respectivos alvos moleculares, segundo a positividade na microscopia ótica (MO).

Malária aguda ¹	n° positivo pelos protocolos moleculares (%)		
	RT-LAMAL	RT-Mangold	TP ²
	Pvr47/Pfr364	18S rRNA	
Positivo MO (n=15)	15 (0,9)	4 (0,3)	15 (0,9)
Negativo MO (n=1575)	95 (6,0)	24 (1,5)	110 (6,9)
Total (n = 1590)³	110 (6,9)^a	28 (1,8)^b	125 (7,8)

¹Diagnóstico realizado através de gota espessa (método parasitológico padrão-ouro);

²TP = total de amostras positivas pelos métodos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold);

³O total de amostras corresponde aos dois cortes transversais, setembro e novembro, 2014;

^{a,b}porcentagem positivo para cada PCR, sendo a diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 49,7$, $p < 0,0001$).

Em relação a positividade por espécie de plasmódio, observou-se uma maior frequência de infecções por *P. vivax*, tanto pela MO (87%), quanto pela RT-Mangold (68%) (Tabela 9). Como era de se esperar, o *P. falciparum* foi menos prevalente (13 a 18%). De interesse, a RT-Mangold permitiu identificar o *P. malariae* em 4 amostras (14%). Considerando que o RT-LAMAL utiliza alvos que, no momento, não podem diferenciar espécies como o *P. falciparum* e *P. malariae* (dados não mostrados), optou-se aqui por considerar, apenas para esta PCR, a positividade em nível de gênero, isto é, positivo ou negativo para malária.

Tabela 9. Distribuição de frequência das amostras positivas para malária de acordo com a espécie de plasmódio identificada pelo protocolo molecular (RT-Mangold) e pela microscopia ótica (MO).

Espécie	Protocolos (%)		
	MO	RT-Mangold	Total ¹
<i>P. vivax</i>	13 (87)	19 (68)	29 (75)
<i>P. falciparum</i>	2 (13)	5 (18)	6 (15)
<i>P. malariae</i>	-	4 (14)	4 (10)
Total	15 (100)	28 (100)	39 (100)

¹total de positivos referentes aos cortes-transversais de setembro e novembro-2014 (n=1590).

5.2 Fatores demográficos e epidemiológicos influenciando a positividade de malária nas aldeias ianomâmis

Com relação à positividade por aldeia, observou-se que os protocolos moleculares confirmaram uma diferença estatística entre estas, sendo o maior número de indivíduos positivos (RT-LAMAL e RT-Mangold) na aldeia de Taibrapa (14,8%), seguida de Gasolina e Alapusi (6%-7,2%), e por último, as aldeias Castanha e Ahima-Mamapi (3,4%-4,5%).

Por outro lado, a positividade por MO, embora baixa, foi similar entre as aldeias Taibrapa (1%), Gasolina (1,2%), Alapusi (2%) e Castanha (0,2%); não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as aldeias analisadas para este método de diagnóstico (Figura 7). Neste contexto, vale ressaltar que apenas através da técnica RT-LAMAL foi possível detectar episódios maláricos na aldeia de Ahima (Mamapi).

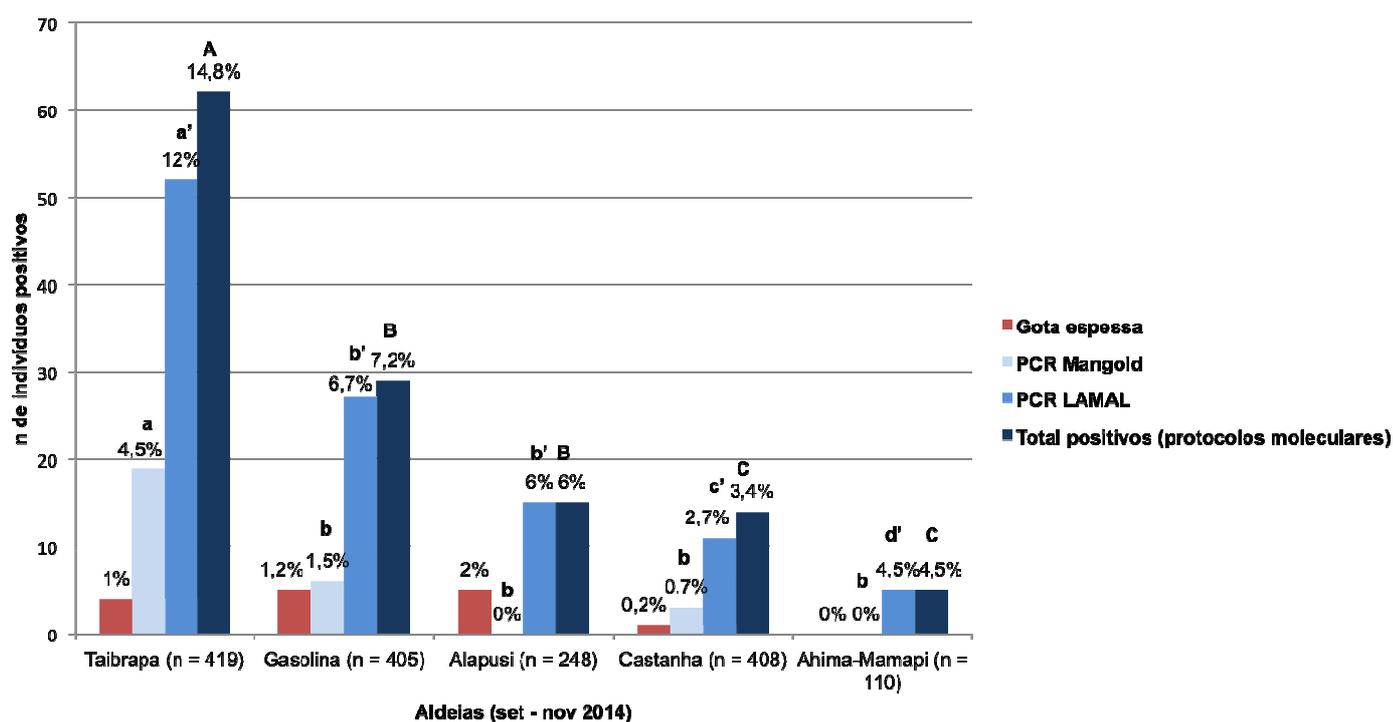


Figura 7. Positividade para malária por aldeia Yanomami. O gráfico ilustra o número de indivíduos positivos pela microscopia ótica (gota espessa) e protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold). Os resultados se referem as coletas realizadas em setembro e novembro de 2014. Os números no topo de cada barra correspondem a porcentagem de positivos por método de diagnóstico. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre a positividade por aldeia (Chi-quadrado ou teste Fisher, $p < 0,05$), sendo PCR-Mangold (a-c); PCR-LAMAL (a'-d'); total de positivos pelos protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold) (A-C). A positividade mediante gota espessa, não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

Em relação à positividade por sexo, nenhuma diferença significativa foi observada (Figura 8), tanto para os diagnósticos moleculares (Figura 8A), quanto para a detecção por intermédio de exame parasitológico de rotina (MO) (Figura 8B).

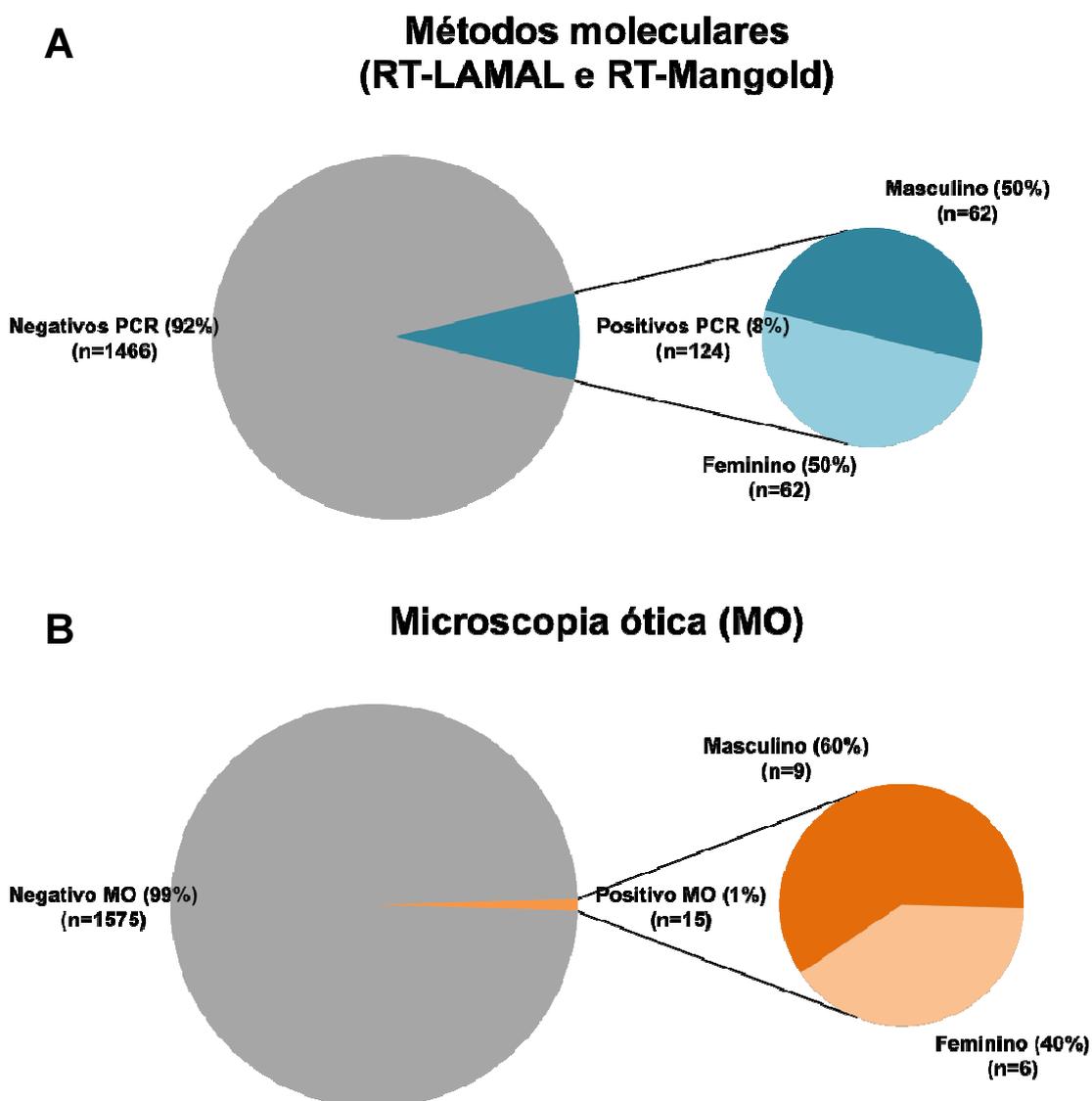


Figura 8. Proporção de indivíduos positivos para malária de acordo com o gênero (feminino e masculino); **(A)** referente as indivíduos diagnosticados através de métodos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold) e **(B)** pacientes positivos mediante exame parasitológico de rotina (MO).

Já com relação à faixa etária dos indivíduos, observou-se que a positividade da MO, bem como dos protocolos moleculares, diminuíram em função do grupo etário; sendo mais prevalente na infância. A Figura 9 ilustra a porcentagem de indivíduos infectados em função da idade, sendo crianças na faixa etária de 0-12 anos as mais positivas, tanto pela MO quanto para os protocolos moleculares. Neste contexto, o método parasitológico (MO) identificou, exclusivamente, os indivíduos de grupos etários mais baixos, caracterizados por maiores parasitemias, ao passo que

os protocolos moleculares detectaram indivíduos positivos em todas as faixas etárias, provavelmente em função da maior sensibilidade de detecção dessas técnicas.

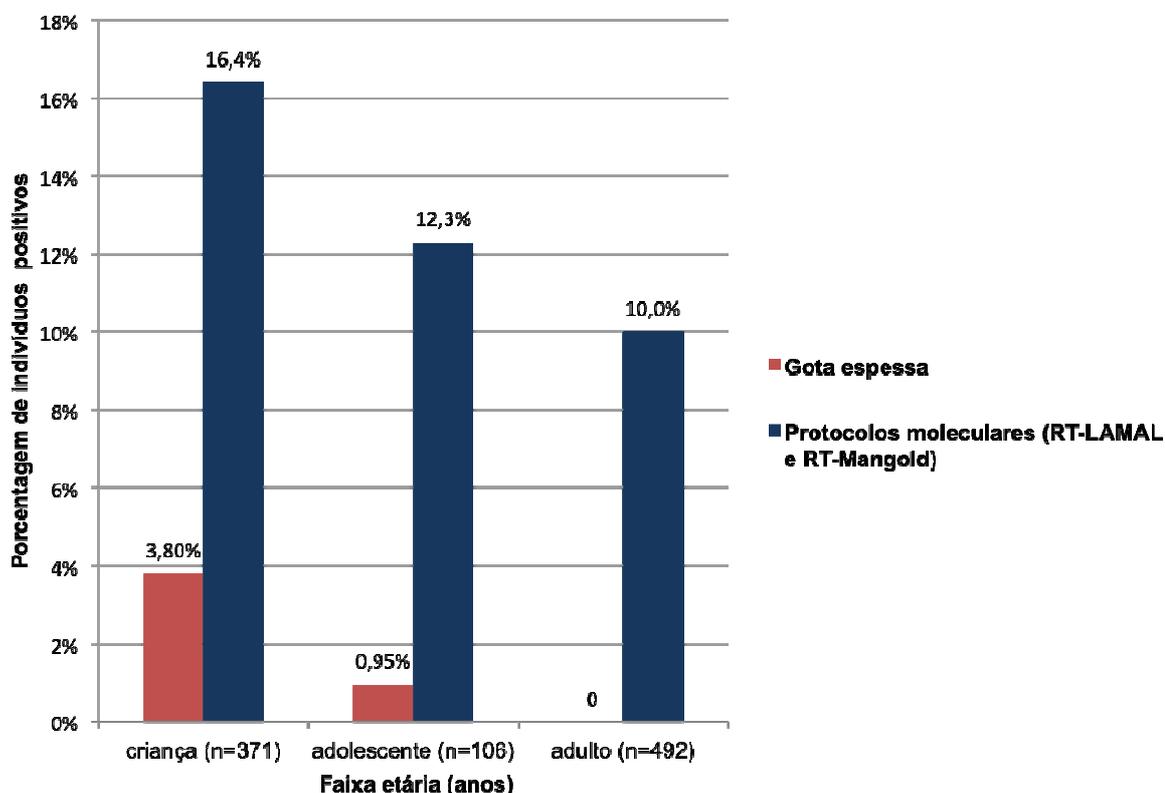


Figura 9. Frequência de indivíduos positivos para a malária de acordo com o grupo etário e método de diagnóstico. Considerou-se as seguintes faixas etárias: 0-12 (crianças), 13 a 17 (adolescentes) e >18 (adultos). Houve tendência estatisticamente significativa na diminuição da positividade em função do aumento da idade, tanto para a gota espessa (χ^2 tendência= 7,34, $p=0,0067$) quanto para os protocolos moleculares (χ^2 tendência= 19,90, $p<0,0001$).

Com relação à flutuação da positividade para malária em função do período de coleta da amostra de sangue (setembro e novembro 2014), embora tenha sido observada uma maior frequência de positivos no mês de setembro, tanto pelo protocolo molecular RT-LAMAL quanto pelo exame parasitológico (MO), esta diferença foi estatisticamente significativa apenas para o método molecular RT-LAMAL. Mais especificamente, pelo RT-LAMAL foram diagnosticados 9,1% de infecções maláricas no mês de setembro e 5,1% para o mês de novembro (χ^2 9,18,

$p < 0,01$) (Figura 10). Neste contexto, a MO detectou 1,4% de infecções maláricas no mês de setembro e apenas 0,6% de ocorrências durante o mês de novembro. De relevância, não foram observadas diferenças com relação a positividade entre os cortes transversais pela técnica RT-Mangold (Figura 10).

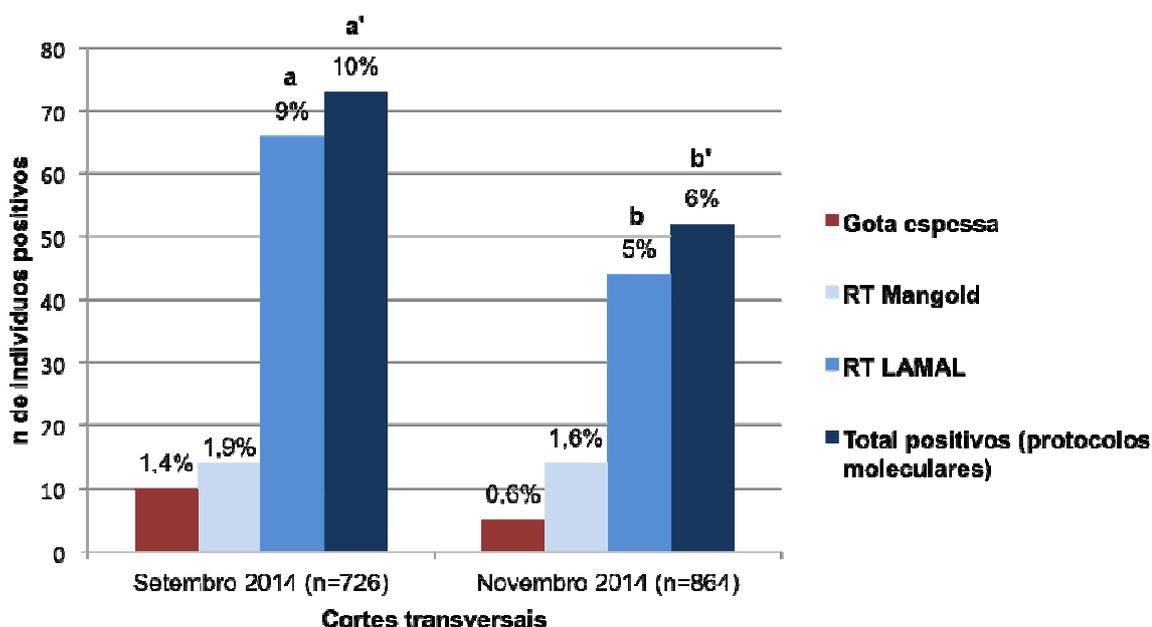


Figura 10. Número de indivíduos diagnosticados com malária de acordo com o período de coleta e método de diagnóstico, incluindo protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold) e o exame parasitológico (gota espessa - MO). Diferentes letras significam diferenças estatisticamente significativas, sendo RT-LAMAL (a-b) ($\chi^2 9,18$, $p < 0,01$); total de positivos por protocolos moleculares (RT-LAMAL e RT-Mangold) (a'-b') ($\chi^2 8,88$, $p < 0,01$). Para o exame parasitológico (gota espessa) e para o método molecular RT-Mangold, não foram observadas diferenças significativamente significativas entre os cortes transversais analisados (setembro e novembro de 2014).

5.3 Amplificação pela Nested-PCR e RT-Rougemount das amostras previamente identificadas como positivas por protocolos moleculares já estabelecidos

5.3.1 Padronização da PCR em tempo real RT-Rougemount para amplificação do gene 18S rRNA

Com o intuito de utilizar mais de um protocolo de PCR em tempo real (RT-PCR) para amplificar o gene 18S rRNA dos plasmódios, optou-se por utilizar, primeiramente, a técnica descrita por Shokoples *et al.*, (2009). Neste sentido, as concentrações testadas dos iniciadores descritos na Tabela 7 (métodos, item 4.6.5) foram distintas para cada espécie, sendo, (i) *P. vivax*, 200nM do iniciador senso, 400nM do iniciador anti-senso e 200nM da sonda vivprobe, específica para esta espécie; (ii) *P. falciparum*, 400nM do iniciador senso, 400nM do iniciador anti-senso e 150nM da sonda falciprobe; (iii) *P. malariae*, 200nM de iniciador senso, anti-senso e da sonda específica (malaprobe). Para o ensaio de PCR em tempo real foram testados 20 μ L de volume total, sendo 10 μ L de TaqMan universal (Applied Biosystems), 3,2 μ L de um complexo de iniciadores/sondas (10 μ M para os iniciadores e 2 μ M para as sondas) e 1 μ L de DNA. Com relação à ciclagem, foram inicialmente testadas as condições universais, com 40 ciclos; sendo 50°C por 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, 95°C por 15 segundos e 60°C no intervalo de 1 minuto final. Apesar de detectar com sucesso as amostras controle, as condições iniciais do ensaio não permitiram detectar amostras de campo, provavelmente em virtude da baixa parasitemia associada.

A fim de garantir melhores resultados, optou-se por dobrar a concentração inicial do DNA molde (2 μ L); apesar disto, os resultados continuaram insatisfatórios, particularmente, com as amostras de campo de baixa positividade (pauciparasitados) cuja positividade oscilava de ensaio para ensaio (dados não mostrados).

Com o intuito de aumentar o rendimento da reação, optou-se por adaptar a técnica originalmente descrita por Shokoples *et al.*, (2004). Para tal, o ensaio foi realizado através de duas reações de PCR, a primeira gênero específica e a segunda, espécie-específica, onde utilizou-se o amplicon gerado na primeira reação como produto final da segunda. Nesta nova etapa, a reação foi realizada,

incorporando-se os iniciadores e sondas nas, condições previamente estabelecidas, descritas acima. Contudo, estas modificações na técnica não demonstram resultados satisfatórios, já que amplificações inespecíficas passaram a ser detectadas. Além disto, modificações na temperatura de anelamento (63 e 65°C) também não resultaram em maior especificidade dos iniciadores.

Finalmente, optou-se por adotar o protocolo original descrito por Rougemont *et al.*, (2004), com algumas modificações. Neste ensaio, as espécies de *Plasmodium* presentes nas amostras são distinguidas via iniciadores senso (plasmo1) e anti-senso conservados (plasmo2), associado às sondas espécie-específicas, sendo estas vivprobe, falciprobe e malaprobe, capazes de detectar *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, respectivamente, conforme listado na Tabela 7 (ver métodos 4.6.5).

Assim, o protocolo foi padronizado com sucesso nas seguintes condições de reação, volume final 12,5µL, distribuídos entre 2µL de DNA, 6,25µL de TaqMan universal (Applied Biosystems) e 1,0µL de um complexo de iniciadores e sondas, utilizando as concentrações inicialmente estabelecidas por Rougemont *et al.*, (2004), sendo 200nM para cada par de iniciador e 80nM para as respectivas sondas. Para o ensaio de PCR em tempo real foram acertadas os seguintes ciclos da reação, 50°C durante 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C no intervalo de 15 segundos e 60°C por 1 minuto resultando em uma constante final de 45 ciclos (Figura 11). Uma vez padronizada a reação, a mesma foi utilizada para processar todas as amostras positivas identificadas pelos protocolos RT-LAMAL e RT-Mangold, previamente estabelecidos no Laboratório de Malária do CPqRR.

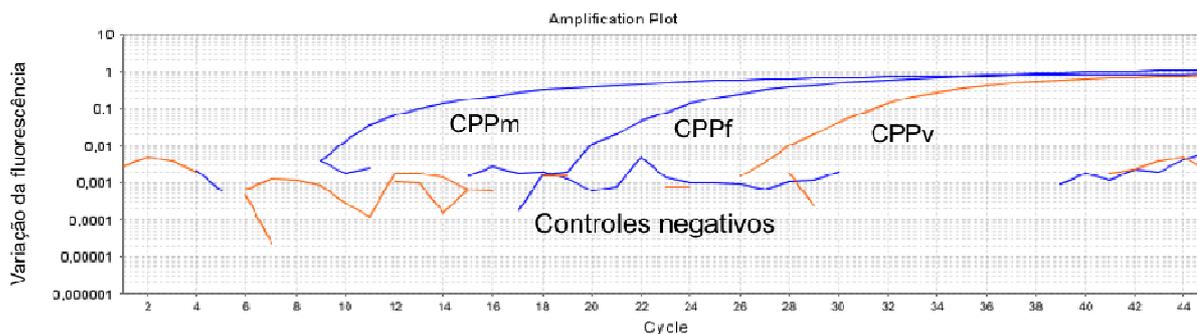


Figura 11. Representação gráfica ilustrando a amplificação de DNAs moldes obtida a partir do protocolo molecular RT-Rougemount, sendo CPPm (DNA controle positivo de *P. malariae*), CPPf (DNA controle de *P. falciparum*) e CPPv (DNA controle de *P. vivax*), conforme descrito no item 4.5. Cada curva representa o número de amplicon (variação da fluorescência) por ciclo.

5.3.2 Amplificação das amostras positivas pela Nested-PCR e RT-Rougemount

Após realizar os protocolos RT-LAMAL e RT-Mangold em toda a população estudada (item 5.2), optou-se por reavaliar as amostras positivas através de dois métodos adicionais, ambos baseados no alvo 18S rRNA dos plasmódios, que permitem o diagnóstico específico, incluindo amplificação para as espécies *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Assim, das 138 amostras previamente positivas pela RT-LAMAL e/ou RT-Mangold, 13 foram detectadas simultaneamente por ambos os protocolos (Tabela 8); logo, 125 amostras foram submetidas à Nested-PCR e RT-Rougemount.

Os resultados obtidos confirmaram a Nested-PCR como mais sensível que o recém padronizado RT-Rougemount, já que identificou 36% das amostras previamente positivas contra 18% do RT-Rougemount, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_{8,91}$, $p > 0,01$). Conforme demonstrado na Tabela 10, os protocolos moleculares baseados no gene 18sRNA foram capazes de identificar apenas 50 (40%) das 125 amostras previamente positivas pelo RT-LAMAL, dentre as quais 18 amostras foram detectadas por ambos os protocolos.

Tabela 10. Distribuição de frequência das amostras positivas e negativas para a infecção malárica, referentes ao corte de setembro e novembro-2014 (n=1590), frente aos protocolos moleculares adicionais aplicados nas amostras previamente positivas (Nested-PCR e RT-Rougemount).

Amostras	Protocolos moleculares (%)		
	Nested-PCR	RT-Rougemount	TP ¹
Positivo	45 (36) ^a	23 (18,4) ^b	50 (40)
Negativo	80 (64)	102 (81,6)	75 (60)
Total	125 (100)	125 (100)	125 (100)

¹TP = total de amostras positivas pelos métodos moleculares (Nested-PCR e RT-Rougemount);

^{a,b}=diferença estatisticamente significativa (χ^2 8,91, $p < 0,01$).

Considerando a concordância geral dos três protocolos, baseados no gene 18S rRNA (RT-Mangold, Nested-PCR e RT-Rougemount), avaliado aqui, através do índice Kappa, os resultados mostraram, em geral, baixa concordância entre os métodos (Tabela 11). De fato, apenas os resultados obtidos com a Nested-PCR e o RT-Rougemount apresentaram uma concordância considerada moderada (Kappa em torno de 0,40) (Tabela 11).

Tabela 11. Índice kappa de concordância entre os três protocolos moleculares aplicados (RT-Mangold, Nested-PCR e RT-Rougemount).

Metodologias	Kappa	IC 95% ¹
RT-Mangold X Nested PCR	0,11	-0,06 - 0,28
RT-Mangold X RT-Rougemount	0,19	0,015 - 0,36
Nested PCR X RT-Rougemount	0,38	0,22 - 0,54

¹IC = Intervalo de confiança de 95%.

Apesar da baixa concordância entre os métodos de PCR baseados no gene 18S rRNA, optou-se em analisar os resultados de consenso por espécie de plasmódio (Figura 12). Os resultados aqui obtidos demonstram que dentre as 62 amostras positivas para um dos três protocolos moleculares aplicados (RT-Mangold, Nested-PCR e RT-Rougemount) apenas 33,9% tiveram resultados concordantes por espécie (em pelo menos duas das técnicas). Neste sentido, 51,6% das amostras foram identificadas em apenas um dos protocolos empregados e, 14,5% foram

consideradas como inconclusivas para o diagnóstico de espécie de plasmódio, (Figura 12).

Conforme esperado, os ensaios moleculares, particularmente a técnica Nested-PCR, diagnosticou algumas infecções mistas e decorrentes da presença do *P. malariae* (Figura 12), provavelmente negligenciadas na técnica de gota espessa, em virtude da similaridade morfológica e baixa parasitemia, fatores que dificultam a precisão do diagnóstico parasitológico.

I					II						
1º corte					2º corte						
	MO	A	B	C		MO	A	B	C		
101 TAI	V	V	V	V	Concordantes 31,4% (n=11)	21 GAS	F	F	F	Concordantes 37% (n=10)	
201 TAI	V	V	V	V		168 TAI		F	F		F
73 GAS	V	V	V	V		131 ALA	V		V		V
28 GAS	V		V	V		133 ALA	V		V		V
165 CAS	V		V	V		67 CAS			V		V
94 GAS		V		V		184 CAS			V		V
24 TAI			M	M		64 TAI		V			V
15 TAI			M	M		26 GAS		V			V
32 TAI		M	M			77 GAS			F		F
39 TAI		M	M			27 GAS	F		F		
25 GAS	V		V								
62 TAI		V			Identificada em apenas um protocolo 57,1% (n=20)	105 TAI			V	Identificada em apenas um protocolo 44,4% (n=12)	
76 CAS		V				1 GAS			V		
177 CAS		V				18 AHI			V		
183 CAS		V				13 TAI		V			
5 TAI			F			54 TAI		V			
52 TAI			F			159 TAI		V			
174 TAI			F			188 TAI		V			
29 CAS			F			43 GAS		V			
154 TAI		F				93 GAS			F		
22 TAI			M			153 GAS					F
36 TAI			M			178 TAI		M			
57 TAI			M			118 CAS			VM		
185 TAI			M								
148 TAI			M								
15 AHI			M								
23 TAI				M							
130 TAI		M									
83 TAI			FM								
1 TAI			VFM								
137 TAI			VM								
26 GAS		F	V	M	Inconclusivos 11,4% (n=4)	223 CAS			M	V	Inconclusivo 18,5% (n=5)
14 TAI			VM	M		7 TAI		V	M		
81 TAI	V		V	F		31 TAI		V	M		
115 TAI		F	VM			23 TAI		V	F		
Total (n=35)	7	14	27	12		138 TAI		V	VM		
					Total (n=27)	4	14	18	11		

Figura 12. Positividade das amostras estudadas de acordo com a espécie de plasmódio amplificada por protocolos moleculares baseados no gene 18S rRNA dos plasmódios. Cada linha representa o código de um indivíduo, sendo cada coluna correspondente aos resultados de um método, sendo: exame parasitológico de gota espessa (**MO**), RT-Mangold (**A**), Nested-PCR (**B**) e RT-Rougemount (**C**). Com relação as espécies, considerou-se *P. vivax* (**V**), *P. falciparum* (**F**), *P. malariae* (**M**) e infecções mistas por *P. vivax/P. malariae* (**VM**) *P. falciparum/P. malariae*, (**FM**) *P. vivax/P. falciparum/P. malariae* (**VFM**); os quadrados não preenchidos (em branco) correspondem as amostras diagnosticadas como negativas. Neste sentido, o primeiro quadro (I) representa o primeiro corte transversal (setembro de 2014) e o segundo (II), o corte transversal de novembro de 2014.

5.4 Desempenho da PCR em amostras de sangue estocadas em diferentes tipos de papel de filtro (xaroposo e FTA Card (Sigma-Aldrich))

Com o objetivo de avaliar se o tipo de papel de filtro utilizado para estocar o sangue influenciava nos resultados da PCR, foram realizados experimentos adicionais para comparar o papel de filtro do tipo xaroposo (sem marca) com os cartões Whatman® FTA®. Para tal, optou-se pelo protocolo RT-LAMAL já que foi o protocolo mais sensível para a amplificação de plasmódio.

Visando o diagnóstico de certeza em diferentes níveis de parasitemia, curvas de titulação de *P. falciparum* foram realizadas, sendo o DNA molde obtido a partir da cultura de formas sanguíneas deste parasito, mantidas na rotina no CPqRR.

Os resultados demonstram que os picos das curvas de dissociação, referente as amostras amplificadas a partir da extração de DNA estocado em papel de filtro xaroposo (PF) foram maiores quando comparados aos picos referentes ao FTA (Apêndice I). Em algumas titulações esta diferença foi menor, como é averiguado na parasitemia de 0,3%. Contudo, nas demais diluições seriadas, particularmente em parasitemias mais baixas, a sensibilidade do papel de filtro xaroposo foi aparentemente superior. Em suma, estes resultados confirmaram a eficiência da extração de DNA a partir de papel de filtro convencional (xaroposo) para amplificar plasmódio em protocolos moleculares.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a prevalência de malária tem reduzido significativamente no Brasil, principalmente em virtude do diagnóstico e tratamento precoce. Neste contexto, ressalta-se a importância da detecção e tratamento de portadores assintomáticos com parasitemias submicroscópicas, uma vez que estes indivíduos podem ser fonte de infecção para mosquitos vetores, mesmo sem as manifestações clínicas da doença (ALVES *et al.*, 2005). Em suma, é essencial identificar indivíduos que integram este cenário, a fim de interromper o ciclo de transmissão e mensurar a real prevalência da doença nas áreas sobre vigilância epidemiológica.

Tendo em vista a importância de um diagnóstico correto de malária e, considerando as lacunas do diagnóstico microscópico de rotina (MO), vários métodos têm sido propostos a fim de auxiliar esta ferramenta. Neste sentido, os métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para fins de pesquisa em malária, particularmente para identificar infecções assintomáticas (GAMA *et al.*, 2007), infecções mistas (SHOKOPLES *et al.*, 2009) e espécies morfologicamente similares na microscopia, como é o caso de *P. malariae* e *P. vivax* (RAHMAN *et al.*, 2010). Logo, grande parte dos protocolos baseados em PCR para diagnóstico de malária tem recorrido ao gene da subunidade menor do RNA ribossomal (18S rRNA) dos parasitos, já bem caracterizado na literatura (GARDNER *et al.*, 2002; CARLTON *et al.*, 2008).

Com o objetivo de identificar malária subpatente em populações indígenas, o presente estudo utilizou diferentes protocolos moleculares, incluindo aqueles baseados na detecção do alvo 18S rRNA dos plasmódios, gene de referência para o diagnóstico molecular da malária (MANGOLD *et al.*, 2005; SNOUNOU *et al.*, 1993; ROUGEMOUNT *et al.*, 2004). Adicionalmente, optou-se, aqui, por utilizar alvos não ribossomais, em protocolo previamente padronizado e validado pelo nosso grupo de pesquisa em malária (AMARAL, Dissertação de Mestrado, 2014). Esta abordagem permitiu caracterizar não só a prevalência de malária em tribos indígenas ianomâmis, bem como comprovar a maior sensibilidade dos alvos não ribossomais para o diagnóstico de malária subpatente.

6.1 Protocolos moleculares no diagnóstico de malária em ameríndios ianomâmis

6.1.1 Alvos ribossomais (18S rRNA) e não-ribossomais (Pvr47/Pfr364) para o diagnóstico de malária humana

Como era esperado, os resultados permitiram comprovar a baixa sensibilidade do exame parasitológico, microscopia ótica (MO), realizado através de gota espessa corada com Giemsa (método padrão-ouro). Atualmente, já existe um certo consenso que o método tradicional de microscopia apresenta uma série de limitações (HANSCHIED, 2003; PROUX *et al.*, 2011). De fato, os resultados aqui apresentados demonstram que, enquanto a gota espessa identificou 0.9% de positividade nas amostras estudadas, os protocolos moleculares identificaram cerca de 9x mais amostras positivas (7,8%). Além disto, a MO ótica não identificou nenhum caso de *P. malariae* nas amostras estudadas, sendo que este parasito foi identificando e confirmado por mais de um protocolo molecular. Atribui-se isto à dificuldade na distinção entre as diferentes espécies, em virtude da similaridade morfológica, bem como devido à complexidade em diagnosticar coinfeções pela MO. Vale ressaltar que malária por *P. malariae* já foi descrita em populações ianomâmis (METZGER *et al.*, 2008; LALREMRUATA *et al.*, 2015; AUTINO *et al.*, 2012), intensificando a necessidade de métodos moleculares para um diagnóstico mais apropriado. Infelizmente, o grupo de pesquisa não teve acesso às lâminas de MO, portanto, a qualidade do diagnóstico parasitológico que está sendo realizado atualmente nas tribos indígenas brasileiras não pôde ser avaliada.

Apesar de não dispormos dos dados referentes as parasitemias dos pacientes, sabe-se que em regiões de transmissão de malária, onde a população exposta é nativa, os indivíduos sujeitos desenvolvem um certo grau de imunidade contra a doença, sendo os quadros de infecção assintomática frequentes (MARCANO *et al.*, 2004; LASERSON *et al.*, 1999). Casos de malária assintomática têm sido descrito em populações isoladas, como é o caso de índios ianomâmis, particularmente, da Amazônia venezuelana, onde a maior parte dos estudos tem sido realizada (LALREMRUATA *et al.*, 2015; PÉREZ, 1998). Portanto, nestas populações, é mais apropriado estimar a prevalência da malária por protocolos moleculares.

Embora o objetivo principal deste estudo não foi comparar protocolos moleculares; observou-se uma superioridade na detecção pela técnica RT-LAMAL (AMARAL, 2014), quando comparada ao protocolo RT-Mangold (MANGOLD *et al.*, 2005). O protocolo RT-LAMAL difere dos demais ensaios por fundamentar-se em alvos não ribossomais (Pvr47 e Pfr364) presentes em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente; ainda sem funções conhecidas. Estes alvos estão presentes em várias cópias e encontram-se distribuídos em vários cromossomos no genoma dos parasitos (DEMAS *et al.*, 2011). Como o protocolo originalmente descrito por Demas e colaboradores (2011) utilizava a amplificação por PCR convencional, em gel de agarose, o nosso grupo de pesquisa desenhou iniciadores específicos e padronizou a técnica para ser utilizada em protocolo de PCR em tempo real (RT-LAMAL) (AMARAL, Dissertação de mestrado, 2014). Para tal, foram utilizadas amostras referência de *P. falciparum* e *P. vivax*, as quais foram tituladas a partir de misturas artificiais contendo diferentes quantidades dos parasitos. Os resultados obtidos mostram que o protocolo RT-LAMAL teve um desempenho semelhante ao protocolo original (DEMAS *et al.*, 2011), sendo ambos os protocolos com limite de detecção superior aos demais protocolos moleculares avaliados. A vantagem do protocolo descrito pelo nosso grupo (RT-LAMAL) sobre o de Demas e colaboradores (2011) foi a metodologia de PCR em tempo real, permitindo obter os resultados com maior rapidez, dispensando a revelação em gel de agarose e uso de brometo de etídio, bem como reduzindo a chance de contaminação da técnica. Baseado nestes estudos anteriores do grupo, com amostras conhecidas, pode-se concluir, aqui, a superioridade do RT-LAMAL para avaliar infecção malárica na população estudada.

Em conjunto, os dados aqui obtidos demonstraram que os alvos Pvr47/Pfr364 foram mais adequados para o diagnóstico molecular de malária do que o gene 18S rRNA. Isto pode ser explicado porque o gene 18S rRNA encontra-se presente em 4 a 8 cópias por genoma dos plasmódios (CARLTON *et al.*, 2008), ao passo que a técnica RT-LAMAL sustenta-se em 14 cópias de Pvr47 e 41 cópias de Pfr364 (DEMAS *et al.*, 2011). De fato, espera-se que um maior número de cópias presentes no genoma favoreça a amplificação de menores quantidades de DNA alvo (LUCCHI *et al.*, 2013).

Embora o RT-LAMAL possua grande potencial para o diagnóstico molecular de certeza de pacientes com malária, optou-se aqui por não considerar a amplificação por espécie. Isto porque como ainda não existe o genoma disponível do

P. malariae, não se pode excluir que as sequências amplificadas pelo Pvr47 e Pfr364 também estejam presentes no *P. malariae* (KISSINGER J, UGA, Atlanta, Informação pessoal). De fato, resultados preliminares do nosso grupo demonstram que os iniciadores de *P. falciparum* são capazes de amplificar o *P. malariae*, incluindo a amostra estudada (dados não mostrados); os mesmos iniciadores amplificam ainda amostras de *P. malariae* de referência (gentilmente cedida por KIRCHGATTER, K, USP, SP, Brasil). Estudos futuros de sequenciamento dos produtos amplificados, bem como as informações sobre o genoma do *P. malariae*, poderão ajudar a resolver esta questão. Neste contexto estudos de sequenciamentos se encontram em andamento pelo nosso grupo de pesquisa. Por último, vale ressaltar que informações recentes sobre a origem do *P. vivax* na África parecem indicar que novas espécies de *Plasmodium* possam existir (LIU *et al.*, 2014). Portanto, neste momento, não podemos descartar que espécies de plasmódios, ainda não descritas, estejam circulando nas populações indígenas aqui estudadas, incluindo plasmódios de primatas infectando humanos.

6.1.2 Técnicas moleculares baseadas no gene 18sRNA dos plasmódios para o diagnóstico de espécie nas aldeias ianomâmis (Nested-PCR, RT-Mangold e RT-Rougemount)

Visando identificar as espécies de plasmódio nas amostras estudadas optou-se aqui por utilizar protocolos baseados no gene 18sRNA dos plasmódios, já que os iniciadores específicos para este gene permitem diferenciar *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Além disto, para processar o grande número de amostras estudadas (n=1590) foi necessário a utilização de um protocolo de real-time PCR, já que a Nested-PCR (SNOUNOU *et al.*, 1993), protocolo molecular de referência, requer duas reações diferentes de PCR para cada amostra (gênero e espécie) e revelação em gel de agarose. Para tal, escolheu-se o RT-Mangold (MANGOLD *et al.*, 2005) que já se encontrava padronizado no Laboratório (CAMARGO-COSTA *et al.*, 2014). Em geral, os resultados da primeira rodada de PCR (n=1590) mostram uma baixa positividade no RT-Mangold (1.8%) quando comparado ao RT-LAMAL (6.9%). Na segunda fase dos experimentos, isto é, re-amplificação das amostras inicialmente positivas (n=125), das quais 28 foram detectadas por intermédio do protocolo RT-Mangold; a Nested-PCR foi capaz de detectar 45 amostras positivas. O

fato do RT-Mangold utilizar apenas um par de iniciadores para detectar as quatro principais espécies de *Plasmodium* (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*) pode ter sido determinante para a menor eficiência deste protocolo, incluindo a não detecção de infecções mistas. De fato, trabalhos recentes do nosso grupo sugerem que os iniciadores do RT-Mangold parecem competir pelo DNA alvo, dando preferência à amplificação do DNA de *P. vivax* em quadros de coinfeção com o *P. falciparum* (AMARAL, Dissertação de mestrado, 2010). Esta é uma grande limitação desta técnica, uma vez que compromete o tratamento, favorecendo a manutenção da infecção em indivíduos co-infectados e com baixas parasitemias (OKELL *et al.*, 2012; CUNNINGHAM & BOSMAN, 2013; CAMARGO-COSTA *et al.*, 2014).

Entre os protocolos de PCR em tempo real atuais, a técnica de Rougemont (ROUGEMOUNT *et al.*, 2004), ou suas modificações (SHOKOPLES *et al.*, 2009), tem sido descrita na literatura como altamente sensível. Entretanto, o protocolo padronizado aqui foi inferior à Nested-PCR, apresentando resultados similares ao do RT-Mangold. Neste momento, não se tem uma explicação clara para isto. Entretanto, como a maioria dos protocolos de PCR tem sido padronizados a partir de plasmídeos ou amostras com parasitemias relativamente altas, os resultados obtidos em laboratório podem ser diferentes daqueles obtidos com amostras de campo (CAMARGO-COSTA *et al.*, 2014). Contudo, a escassez de estudos similares realizados a fim de avaliar a coerência do resultados moleculares com amostras de campo, submetidos a condições não ideais de coleta e armazenamento a cerca de portadores submicroscópicos, torna difícil comparar tais resultados. Neste sentido, considerando os três protocolos baseados no gene 18S rRNA aqui utilizados, observou-se maior sensibilidade do ensaio de PCR convencional (Nested-PCR) tido como referência molecular. Atribui-se isto ao fato de que este ensaio dispõe de duas reações (gênero específica e espécie-específica), as quais provavelmente intensificam a sensibilidade da reação, possibilitando a detecção do DNA alvo mesmo em baixas parasitemias.

Considerando ainda os protocolos baseados no gene 18S rRNA aqui utilizados, foi possível demonstrar que cerca de 50% das amostras analisadas foram detectadas apenas por um dos protocolos moleculares. De relevância, cerca de 14,5% das amostras foram inconclusivas quanto a espécie de plasmódio. Estes achados refletem as limitações dos métodos moleculares na detecção de indivíduos pauciparasitados, particularmente, com amostras de campo, proporcionando

irreprodutibilidade dos ensaios e discordâncias entre as técnicas moleculares (SINGH *et al.*, 1996; COSTA-CAMARGOS *et al.*, 2014).

Estes dados permitem concluir que o gene 18S rRNA dos plasmódios não é muito adequado para o diagnóstico de infecções com baixas parasitemias, que também não são detectadas no método parasitológico convencional (MO). Assim, fazem-se necessários mais estudos visando estabelecer outros alvos, como o Pvr47/Pfr364, para o diagnóstico mais apropriado de infecções submicroscópicas.

6.1.3 Avaliação do desempenho dos papeis de filtro (xaroposo e FTA Card (Sigma-Aldrich) para a amplificação de plasmódio

Poucos têm sido os trabalhos que avaliaram o desempenho dos protocolos moleculares em função dos métodos de estocagem de sangue, mais precisamente avaliando a diferença entre os papéis de filtro comumente utilizados para estocar sangue; isto é particularmente relevante em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde o papel de filtro importado tem custo elevado.

Neste intuito, resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa sugeriram uma sensibilidade similar entre os papeis de filtro comum e Whatman (COSTA, Dissertação de mestrado, 2010). Com o intuito de confirmar este achado prévio, realizou-se aqui uma comparação do papel de filtro convencional do tipo xaroposo (sem marca) e os cartões do kit comercial Whatman® FTA® Card (Sigma-Aldrich). Isto foi importante já que todo o estudo nas tribos ianomâmis foi realizado utilizando o kit comercial FTA.

Os resultados obtidos confirmaram os resultados anteriores e sugeriram uma provável superioridade no emprego de papeis de filtro convencionais (em diferentes níveis de parasitemia). Este resultado é bastante promissor, uma vez que o custo benefício dos dois métodos difere substancialmente; mais especificamente, um pacote com cem folhas do papel de filtro xaroposo custa, aproximadamente, R\$335,50. Em contrapartida, um pacote com cem unidades do papel de filtro Whatman® FTA® Card Technology (Sigma-Aldrich) custa cerca de R\$2.406,30. Apesar disto, nosso estudo tem limitações já que comparamos apenas amostras provenientes de cultura de *P. falciparum*. Portanto, em estudos futuros faz-se necessário avaliar este protocolo com outras espécies de plasmódio.

6.2 Malária nas aldeias ianomâmis

Ainda que nos últimos anos tenha sido detectada uma diminuição significativa no número de casos de malária nas Américas (REGUILLO *et al.*, 2015), ainda existem grupos populacionais, nos quais as medidas de controle atuais não têm sido eficientes. Este é o caso, por exemplo, dos assentamentos agrícolas, garimpos em atividade, áreas rurais, áreas de ocupação desordenada nas periferias das cidades e as áreas indígenas (DE PINA-COSTA *et al.*, 2014). Neste sentido, muitos focos de transmissão de malária estão concentrados em comunidades indígenas localizadas, principalmente, em áreas isoladas na Amazônia Legal.

Baseado no diagnóstico microscópico de malária, foram registrados, nos últimos 10 anos (2005 à 2014), 41.689 casos de malária no conjunto de todos os Polos Base de Saúde do DSEI-Y, dos quais 33.399 foram de *P. vivax*, 7.948 ocasionados por *P. falciparum* e 342 decorrentes de infecções mistas (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Entretanto, estes números estão subestimados, já que a microscopia ótica é sabidamente pouco sensível. Outro agravante é que o diagnóstico de rotina é feito de forma passiva, isto é, nos indivíduos sintomáticos; portanto, a real dimensão do número de casos de malária em ameríndios ianomâmis ainda é desconhecida. O presente trabalho envolveu busca passiva e ativa de casos de malária, o que permitiu identificar um número significativo de infecções assintomáticas e subpatentes. De fato, na população estudada, enquanto a microscopia ótica (MO) identificou taxas de positividade variando de 0,6% (novembro) a 1,4% (setembro), os protocolos moleculares (em conjunto) foram capazes de identificar taxas de positividade variando de 5,1% a 9,1%. Isto reforça a importância de se empregar métodos de diagnósticos mais sensíveis em populações com infecções subpatentes, que podem servir de reservatórios de malária podendo infectar mosquitos vetores.

No presente estudo, os protocolos de PCR baseados no gene 18S rRNA permitiram demonstrar que *P. vivax* foi a espécie predominante na população estudada. Estes dados estão de acordo com a predominância histórica de *P. vivax* em áreas indígenas (GRENFELL *et al.*, 2008; MARCANO *et al.*, 2004; LASERSON *et al.*, 1999). Além disto, os resultados aqui apresentados identificaram uma proporção significativa de *P. falciparum* nas aldeias. Isto é relevante, visto que *P. falciparum*, espécie mais patogênica, tem sido relatado em comunidades indígenas

ianomâmis em frequências maiores que em outros grupos étnicos da região (METZGER *et al.*, 2009).

Empregando diferentes protocolos moleculares, o presente estudo identificou ainda a presença de *P. malariae* circulando nas áreas estudadas. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com os relatos que demonstraram a presença de *P. malariae* em aldeias ianomâmis (LALREMRUATA *et al.*, 2015; METZGER *et al.*, 2008; MARCANO *et al.*, 2004), especialmente em simpatria com outras espécies de plasmódios, justificando as coinfeções (MUELLER *et al.*, 2007). Estes achados enfatizam que a transmissão de *P. malariae* nos territórios ianomâmis do Brasil necessita ser melhor estudada. Particularmente, porque esta espécie é indistinguível morfológica e geneticamente de *P. brasilianum*, parasito de primatas não humanos. Neste sentido, foi recentemente proposto que o *P. malariae* e *P. brasilianum* são variantes de uma mesma espécie que é capaz de atravessar a fronteira entre os hospedeiros, circulando entre homens e primatas não humanos, em cenários nos quais estes hospedeiros compartilham o mesmo habitat (LALREMRUATA *et al.*, 2015). Estes achados se aplicam à área estudada, já que os fatores culturais dos ianomâmis favorecem a ocorrência de episódios maláricos decorrentes de *P. malariae*, uma vez que as tribos se alimentam e convivem com os macacos em condições de isolamento, proporcionando um cenário de compartilhamento entre homens e primatas não humanos (LALREMRUATA *et al.*, 2015).

Similar panorama de transmissão é reportado em áreas fora da região Amazônica, como por exemplo, na Mata Atlântica brasileira (DE PINA-COSTA *et al.*, 2014). Ressalta-se ainda que esta espécie tem sido detectada por protocolos moleculares em diferentes partes do mundo, incluindo na África (DODERER-LANG *et al.*, 2014), Ásia (BHARTI *et al.*, 2013) e outros países da América Latina (VOLNEY *et al.*, 2002). Nesta perspectiva este parasito é considerado um agente etiológico geograficamente disseminado; além de representar uma espécie muito bem adaptada. Apesar disto, *P. malariae* é considerado subestimado por dados oficiais (AUTINO *et al.*, 2012).

Em suma, *P. malariae* representa uma importante área para futuros esforços de investigação, dado que as iniciativas voltadas para a eliminação da malária objetivam a detecção precoce de infecções submicroscópicas, a fim de

interromper o ciclo de transmissão da doença. Assim, faz-se necessário a aplicação de técnicas moleculares para seu diagnóstico diferencial.

A população aqui estudada encontra-se estruturada no Polo Base Yanomami denominado Marari, o qual encontra-se categorizado em cinco aldeias. Desta forma, os protocolos moleculares permitiram demonstrar uma taxa de positividade significativamente maior em algumas aldeias. Neste sentido, chama a atenção aldeias como Taibrapa, onde os protocolos moleculares resultaram em uma positividade de cerca de 15% contra apenas 1% diagnosticados pela MO. Estes dados são relevantes, pois podem permitir o direcionamento das medidas de controle para regiões mais críticas, como as aldeias de Taibrapa e Gasolina.

Os dados aqui encontrados, de prevalência de infecções maláricas nas aldeias estudadas, estão de acordo com os achados entomológicos recentes na região (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Logo, os estudos demonstraram que, enquanto o *Anopheles darlingi* encontra-se presente em todas as comunidades estudadas, em densidades médias, a presença de anofelinos exofágicos é tida como baixa em todas as aldeias do Polo Base Marari, com exceção da aldeia de Taibrapa, onde são registradas densidades altas destes vetores (*An. nuneztovari*) (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Isto é relevante já que foi na aldeia Taibrapa que a positividade por malária aqui encontrada foi mais alta. Estes dados sugerem que além do *A. darlingi* -- sabidamente incriminado como o principal vetor no Brasil (HIWAT & BRETAS, 2011) -- os anofelinos exofílicos podem ter grande importância nas populações ameríndias, onde atividades como a pesca e caça expõe as populações a um maior risco de transmissão. De relevância, o trabalho de Ribas (2015) ainda demonstrou taxas de inoculação entomológicas elevadas, preferencialmente em três aldeias do Polo Base Marari (Taibrapa, Gasolina e Alapusi). Logo, relatou-se, também, taxas de infecção elevadas de *An. darlingi* nas três aldeias com maior frequência de ocorrências de malária, Taibrapa, Gasolina e Alapusi. Em conjunto, estes dados corroboram com nossos achados de maior prevalência de malária nestas três aldeias. Estes dados são importantes do ponto de vista do controle, já que as comunidades do Polo Base Marari parecem apresentar características de receptividade e vulnerabilidade muito diferentes dos outros Polos Base situados no DSEI-Y (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015).

Como já foi demonstrado anteriormente, as comunidades situadas no Polo Base Marari são vulneráveis à malária, devido ao alto grau de

interconectividade entre as comunidades e, principalmente, em decorrência das regulares viagens realizadas para fora da área indígena, representando uma via frequente de re-introdução de plasmódios na área (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Além disso, praticamente todas as aldeias encontram-se sob influência de rios, favorecendo pontos de inundação e promovendo criadouros de vetores anofelinos. Em suma, a aldeia Taibrapa, referente ao maior número de acometimentos, encontra-se associada a dois rios de primeira ordem (rio Catalan e rio Taibrapa), intensificando a probabilidade de interferências procedente dos rios (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015).

Com relação à positividade de infecções maláricas, segundo o sexo, observou-se uma proporção similar de infectados para ambos os sexos. Estes dados concordam com a distribuição absoluta do Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami que foi de 10.987 homens (51,8%), e 10.215 mulheres (48,2%) no ano de 2013 (Fonte DSEI-Y-SESAI-RR). De fato, uma proporção similar de malária entre os sexos já era esperada nestas áreas, onde a exposição aos vetores independe do sexo. Tais resultados concordam com outros achados onde a transmissão ocorre preferencialmente no extradomicílio ou ainda, no caso de exposição em viagens realizadas em família (LASERSON et al., 1999; SAWYER, 1993).

Na amostra estudada, o método parasitológico convencional (MO) diagnosticou malária exclusivamente em crianças e adolescentes (faixa etária de 0 a 17 anos). Considerando-se que a gota espessa -- pela sua baixa sensibilidade (HANSCHIED, 2003; PROUX *et al.*, 2011) -- identifica as parasitemias mais altas, pode-se assumir que nesta área as crianças e adolescentes tem menos imunidade adquirida à malária. Os métodos moleculares também mostraram maior positividade nestas faixas etárias. Em geral, os dados aqui apresentados estão de acordo com aqueles de população constantemente exposta à malária, onde as maiores parasitemias ocorrem nas faixas etárias mais jovens (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; COURA *et al.*, 2006).

De importância, as técnicas moleculares foram capazes de detectar infecções em todos os grupos etários (crianças, adolescentes e adultos); particularmente, em decorrência da maior sensibilidade do teste permitindo detectar indivíduos pauciparasitados e sem manifestações clínicas da doença. Além disto, houve uma tendência em diminuir a positividade da PCR em função da idade. Neste sentido, adultos com histórico de longa exposição à malária, como é o caso da

população estudada, apresentam, na maioria das vezes, infecções assintomáticas e submicroscópicas, pouco detectadas pelos métodos diagnósticos convencionais (FÄRNERT *et al.*, 2015; MARCANO *et al.*, 2004).

Dentre as coletas realizadas no decorrer do estudo, verificou-se uma maior ocorrência de malária no mês de setembro; a maior prevalência ocorreu tanto para o método parasitológico quanto os métodos moleculares. Embora o intervalo entre as coletas de sangue tenha sido pequeno (cerca de 2 meses), observou-se, no Polo Base do estudo, um período com o início mais antecipado da época de seca e, conseqüente pluviosidade reduzida, sendo o mês de setembro a referência entre a transição de chuvas e seca (RIBAS, Tese de Doutorado, 2015). Sabe-se que as altas taxas de transmissão de malária ocorrem no início e final das estações de chuva, em virtude da formação de reservatórios de água limpas e parcialmente iluminadas, estruturadas próximo as habitações (LASERSON *et al.*, 1999). Logo, a ausência de transmissões durante os períodos de forte precipitação podem ocorrer devido a inibição do desenvolvimento do estágio larval do mosquito vetor. Em suma, as ocorrências registradas em setembro podem estar associadas à temporada de transição de estação e, conseqüente formação de eventuais criadouros.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- i. Os alvos Pvr47/Pfr364 se mostraram mais apropriados para o diagnóstico molecular de malária em indivíduos com parasitemias submicroscópicas do que o gene da subunidade menor do RNA ribossomal (18S rRNA);
- ii. Entre os protocolos baseados no gene 18S rRNA dos plasmódios aqui avaliados (Nested-PCR, RT-Mangold, RT-Rougemount), a PCR convencional (Nested-PCR) se mostrou mais apropriada para o diagnóstico específico em infecções submicroscópicas;
- iii. Os protocolos moleculares apresentaram baixa concordância em relação ao diagnóstico de espécie; a maior parte das amostras puderam ser detectadas em apenas um protocolo molecular;
- iv. O papel de filtro convencional (xaroposo) se mostrou adequado para preservar sangue total visando amplificação posterior de DNA plasmodial por PCR;
- v. As aldeias ianomâmis do Polo Base Marari apresentam diferentes níveis de transmissão malárica entre si, destacando a aldeia Taibrapa como a mais afetada pela infecção malárica;
- vi. A positividade de malária não foi influenciada pelo sexo, mas foi influenciada pela idade e variação sazonal de chuvas;
- vii. Os ensaios moleculares detectaram *P. vivax* como a espécie mais prevalente nas aldeias estudadas, seguido das espécies *P. falciparum* e *P. malariae*, em proporções similares;
- viii. Protocolos moleculares se fazem necessários para o estudo de incidência e/ou prevalência de malária em populações ianomâmis, tendo em vista que a infecção submicroscópica é frequente nestas populações.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, D.; DE PINA-COSTA, A.; DE SOUSA, T.; PISSINATTI, A.; ZALIS, M.; *et al.* Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malar J.* 2015.

ALVES, F.; GIL, L.; MARRELLI, M.; RIBOLLA, P. E.; CAMARGO, E. P.; DA SILVA, L. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* 2005.

AMARAL, L. C. Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*. Belo Horizonte. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias] - Centro de Pesquisas René Rachou. 2014.

ANDRADE-NETO, F.; POHLIT, M.; PINTO, C.; SILVA, C.; NOGUEIRA, K.; *et al.* In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Jun; 102(3):359-65.

AUTINO, B.; NORIS, A.; RUSSO, R.; CASTELLI, F. Epidemiology of malaria in endemic areas. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2012;4(1).

BHARTI, P.; CHAND, S.; SINGH, M.; MISHRA, S.; SHUKLA, M.; *et al.* Emergence of a new focus of *Plasmodium malariae* in forest villages of district Balaghat, Central India: implications for the diagnosis of malaria and its control. *Trop Med Int Health.* 2013 Jan;18(1):12-7.

CAMARGOS-COSTA, D. A reação em cadeia da polimerase como técnica auxiliar no diagnóstico de malária em serviços de saúde de referência em minas gerais. Belo Horizonte. Dissertação [Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias] - Centro de Pesquisas René Rachou. 2010.

CAMARGOS-COSTA, D.; MADUREIRA, A.; AMARAL, L.; SANCHEZ, B.; GOMES, L.; *et al.* Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* In Press 2014:1-8.

CARLTON, J.; ADAMS J.; SILVA, J.; BIDWELL, S.; LORENZI, H.; *et al.* Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature.* 2008; 455(7214):757-63.

CARTER, R.; MENDIS, K. Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:564-594.

CHEN, H.; LU, F.; LIM, S.; KIM, Y.; AHN, J.; *et al.* Detection of *plasmodium vivax* infection in the Republic of Korea by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Acta Trop.* 2010;113, 61-65.

CHENG, Q.; CUNNINGHAM, J.; GATTON, M. L. Systematic Review of Sub-microscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jan; 9(1): e3413.

COLLINS, W.; JEFFERY, M. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin. Microbiol*. 2007; Rev. 20:579–592.

COURA, J.; SUAREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101:229-237.

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.

DAS, A.; HOLLOWAY, B.; COLLINS, E.; SHAMA, P.; GHOSH, K.; *et al.* Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. *Mol Cell Probes*. 1995; 9, 161-165.

DEMAS, A.; OBERSTALLER, J.; DEBARRY, J.; LUCCHI, W.; SRINIVASAMOORTHY, G.; *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.

DE PINA-COSTA, A.; BRASIL, P.; DI SANTI, S.; DE ARAUJO, M.; SUAREZ-MUTIS, M.; *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109:618-633.

DODERER-LANG, C.; ATCHADE, P.; MECKERT, L.; HAAR, E.; PERROTEY, S. The ears of the African elephant: unexpected high seroprevalence of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* in healthy populations in Western Africa. *Malar J*. 2014 Jun; 18;13:240.

ERDMAN, L.; KAIN, K. Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Med Infect Dis*. 2008 Jan-Mar; 6(1-2):82-99.

FÄRNERT, A.; WYSS, K.; DASHTI, S.; NAUCLER, P. Duration of residency in a non-endemic area and risk of severe malaria in African immigrants. *Clin Microbiol Infect*. 2015 May; 21(5):494-501.

FEACHEM, R. *Shrinking the Malaria Map A Guide on Malaria Elimination for Policy Makers*. San Francisco: University of California. 2009.

FREITAS, R.; DUARTE, C. Normative evaluation of blood banks in the Brazilian Amazon region in respect to the prevention of transfusion-transmitted malaria. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014 Nov-Dec; 36(6):394-402.

GAMA, E.; SILVA-PIRES, E.; LOPES, N.; CARDOSO, A.; BRITTO, C.; *et al.* Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol.* 2007; 116, 427-432.

GETHING, P.; ELYAZAR, I.; MOYES, C.; SMITH, D.; BATTLE, K.; *et al.* A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(9):e1814.

GETHING, P.; PATIL, A.; SMITH, D.; GUERRA, C.; ELYAZAR, I.; *et al.* A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malar J.* 2011 Dec 20; 10:378.

GRENFELL, P.; FANELLO, I.; MAGRIS, M.; GONCALVES, J.; METZGER, G.; *et al.* Anaemia and malaria in Yanomami communities with differing access to healthcare. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008 Jul;102(7):645-52.

GUERRA, A.; SNOW, W.; HAY, I. Mapping the global extent of malaria in 2005. *Trends Parasitol.* 2005 Aug; 22(8):353-8.

HANSCHEID, T. Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical & Laboratory Haematology.* 1999. 21 (4):235-245.

HANSCHEID, T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clinical Microbiology and Infection.* 2003. 9 (6):497-504.

HAY, S.; OKIRO, A.; GETHING, W.; PATIL, P.; TATEM, J.; *et al.* Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Med.* Jun. 2010;15;7(6):e1000290.

HIWAT, H.; BRETAS, G. Ecology of *Anopheles darlingi* Root with respect to vector importance: a review. *Parasit Vectors.* 2011.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Censo demográfico 2010. Características gerais dos indígenas. IBGE; 2012.

KELLY, J.; CARRERA, J. *Salud indígena en Venezuela.* Caracas: Editorial Arte. 2007.

KUBISTA, M.; *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine.* 2006; 95-125.

LAL, A.; CHANGKASIRI, S.; HOLLINGDALE, R.; MCCUTCHAN, F. Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Mol Biochem Parasitol.* 1989, 36, 67-71.

LALREMRUATA, A.; MAGRIS, M.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; KOEHLER, M.; ESEN, M.; *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine.* 2015 Jul 29;2(9):1186-92.

LAPORTA, G.; BURATTINI, M.; LEVY, D.; FUKUYA, L.; DE OLIVEIRA, T.; *et al.* Plasmodium falciparum in the southeastern Atlantic forest: a challenge to the bromeliad-malaria paradigm? Malar J. 2015;14:181.

LASERSON, F.; WYPIJ, D.; PETRALANDA, I.; SPIELMAN, A.; MAGUIRE, H. Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. Am J Trop Med Hyg. 1999 May;60(5):767-73.

LIU, W.; LI, Y.; SHAW, K.; LEARN, G.; PLENDERLEITH, L. African origin of the malaria parasite Plasmodium vivax. Nat Commun. 2014;5:3346.

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

LORENZ, C.; VIRGINIO, F.; AGUIAR, B.; SUESDEK, L.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. Malar. J. 2015; 14:408.

LUCCHI, W.; NARAYANAN, J.; KARELL, A.; XAYAVONG, M.; KARIUKI, S. Molecular Diagnosis of Malaria by Photo-Induced Electron Transfer Fluorogenic Primers: PET-PCR. PLoS One. 2013; 8(2): e56677.

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

MANGOLD, A.; MANSON, U.; KOAY, S.; STEPHENS, L.; REGNER, M.; *et al.* Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. J. Clin. Microbiol. 2005 May; 43(5):2435-40.

MARCANO, T.; MORGADO, A.; TOSTA, E.; COURA, JR. Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 Jun;99(4):369-76.

MCKENZIE, E.; JEFFERY, M.; COLLINS, E. Plasmodium malariae blood- stage dynamics. J Parasitol. Jun. 2001;87(3):626-37.

MENS, P.; SPIEKER, N.; OMAR, S.; HEIJNEN, M.; SCHALLIG, H.; *et al.* Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. Trop Med Int Health. 2007;12, 238–244.

METZGER, G.; MARTÍNEZ, S.; RODRIGUEZ, I.; GONÇALVES, J.; BONGARD, E.; *et al.* Malaria diagnosis under field conditions in the Venezuelan Amazon. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008;102, 20-24.

METZGER, G.; GIRON, M.; VIVAS-MARTÍNEZ, S.; GONZÁLEZ, J.; CHARRASCO, J.; *et al.* A rapid malaria appraisal in the Venezuelan Amazon. Malar J. 2009;11;8:291.

Ministerio da Saúde - Fundação Nacional de Saúde: Relatório Técnico da Malária - Distrito Sanitário Yanomami. MS/FNS; 2006.

Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde - Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. vol. 44. pp. 1-16. MS/SVS: 2013:1-16.

MOODY, H.; CHIODINI, L. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. Br J Biomed Sci. 2002;59, 228-231.

MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P.; REEDER, J. Plasmodium malariae and Plasmodium ovale--the "bashful" malaria parasites. Trends Parasitol. 2007 Jun;23(6):278-83.

MURRAY, K.; BENNETT, W. Rapid Diagnosis of malaria. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009;53, 41-49.

NANSSEU, J.; NOUBIAP, J.; NDOULA, T.; ZEH, F.; MONAMELE, G. What is the best strategy for the prevention of transfusion-transmitted malaria in sub-Saharan African countries where malaria is endemic? Malar J. 2013 Dec 28;12:465

OKELL, C. *et al.* The potential contribution of mass treatment to the control of Plasmodium falciparum. Plos One. 2011;no. 5.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M. V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J. L.; TAUIL, P. L.; RIBEIRO, C. T. Malaria in Brazil: an overview. Malar J. 2010 Apr 30; 9:115.

OLSSON, M. L.; HANSSON, C.; AVENT, N. D.; AKESSON, I. E.; GREEN, C. A.; DANIELS, G. L. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (IT') blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. Transfusion. 1998. 38:168-173.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P.; RAO, V.; MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol. 2008, 18, 407-421.

PARIS, H.; IMWONG, M.; FAIZ, M.; HASAN, M.; YUNUS, B.; *et al.* Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg. 2007;77, 972-976.

PÉREZ, S. Anemia and malaria in a Yanomami Amerindian population from the southern Venezuelan Amazon. Am J Trop Med Hyg. 1998 Dec;59(6):998-1001.

PROUX, S.; *et al.* Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. Malaria Journal. 2011. 10:323.

RAHMAN, W.; CHOTIVANICH, K.; SILAMUT, K.; TANOMSING, N.; HOSSAIN, A.; *et al.* Plasmodium malariae in Bangladesh. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010;104, 78-80.

REGUILLO, P.; THOMSON-LUQUE, R.; MONTEIRO, W.; LACERDA, M. Urban and architectural risk factors for malaria in indigenous Amazonian settlements in Brazil: a typological analysis. *Malar. J.* 2015; 14:284.

RIBAS, J. S. Aspectos ecológicos da transmissão da malária em área indígena yanomami, Brasil. Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Biologia Parasitária] - Fundação Oswaldo Cruz; 2015.

ROUGEMONT, M.; VAN, M.; SAHLI, R.; HINRIKSON, H. P.; BILLE, J.; JATON, K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(12): 5636.

SAWYER, D. Economic and social consequences of malaria in new colonization projects in Brazil. *Soc Sci Med.* 1993 Nov;37(9):1131-6.

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. 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. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2015.

SCURACCHIO, P.; VIEIRA, D.; DOURADO, A.; BUENO, L.; COLELLA, R.; *et al.* Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011 Jan-Feb;53(1):55-9.

SHOKOPLES, S. E.; NDAO, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; YANOW, S. K. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J. Clin. Microbiol.* 2009;47:975–980.

SINGH, B.; COX-SINGH, J.; MILLER, A.; ABDULLAH, M.; SNOUNOU, G. Detection of malaria in Malaysia by nested polymerase chain reaction amplification of dried blood spots on filter papers. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996; 90, 519-521.

Sistema de Informação da Atenção à Saúde Indígena (SIASI): <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/secretaria-sesai/mais-sobre-sesai/9518-destaques>>. Acessado em 01/2016.

SNOUNOU, G.; *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1993; 61:315-320.

SNOW, R. W.; GUERRA, C. A.; NOOR, A. M.; MYINT, H. Y.; HAY, S. I. The global

distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature*. 2005 Mar 10;434(7030):214-7.

TAUIL, P. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; Vol. 106(Suppl. I): 105-106.

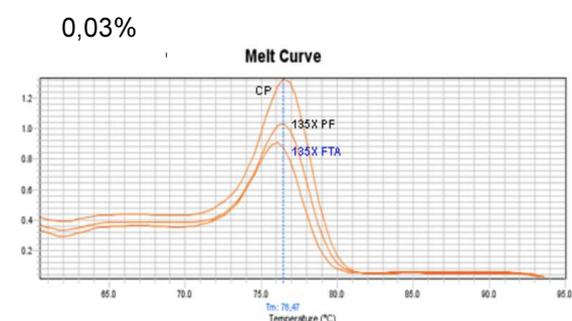
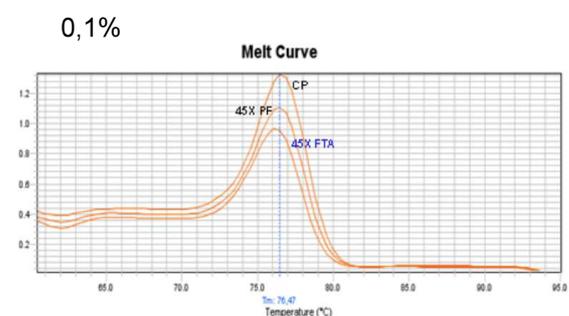
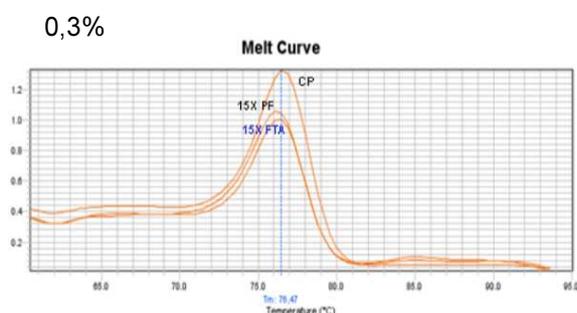
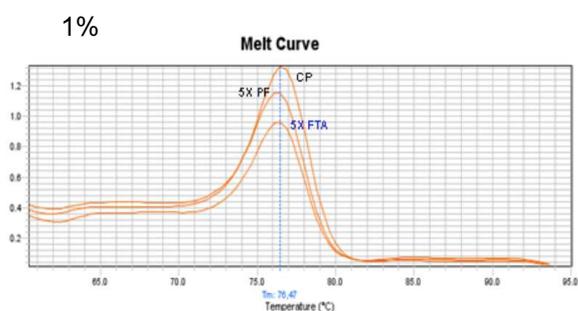
VOLNEY, B.; POULIQUEN, J.; DE THOISY, B.; FANDEUR, T. A sero-epidemiological study of malaria in human and monkey populations in French Guiana. *Acta Trop*. 2002 Apr;82(1):11-23.

WONGSRICHANALAI, C.; BARCUS, J.; MUTH, S.; SUTAMIHARDJA, A.; WERNSDORFER, H. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Tro Med Hyg*. 2007;77, 119-127.

World Health Organization: World malaria report 2013. Geneva: WHO; 2013.

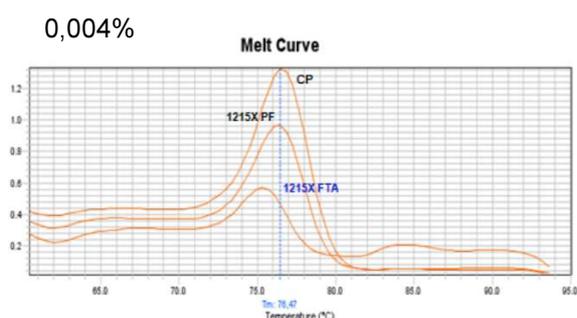
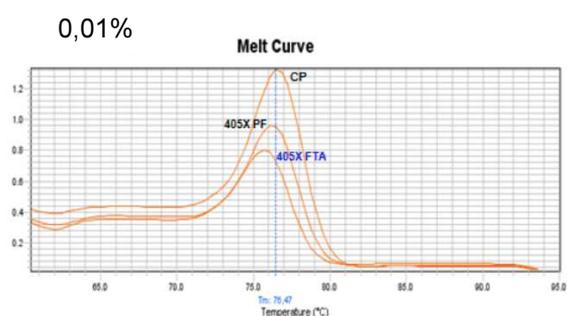
World Health Organization: World malaria report 2014. Geneva: WHO; 2014.

APÊNDICE



Apêndice I. Curvas de

dissociação referente a



amplificação de *P. falciparum* pela técnica RT-LAMAL. As amostras de DNA de *P. falciparum* foram obtidas a partir de diluição sucessiva de cultura do parasito, o que correspondeu a parasitemias finais variando de 1 a 0,004%. Cada gráfico corresponde a uma diluição sendo os resultados referentes ao papel de filtro xaroposo (PF) ou o cartão (FTA) (Whatman® FTA® Card Technology (Sigma-Aldrich). Como controle positivo, foi utilizada uma amostra positiva de *P. falciparum* obtida de paciente com elevada parasitemia (CP).