

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Prevalência de Infecções Maláricas Submicroscópicas em uma População de  
Assentamento Agrícola na Amazônia Brasileira**

por

Luiz Felipe Ferreira Guimarães

Belo Horizonte

Fevereiro/2020

**DISSERTAÇÃO MCS IRR**

**L.F.F. GUIMARÃES**

**2020**

**Luiz Felipe Ferreira Guimarães**

**Prevalência de Infecções Maláricas Submicroscópicas em uma População de Assentamento Agrícola na Amazônia Brasileira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

**Belo Horizonte**  
**Fevereiro/2020**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

G947p  
2020

Guimarães, Luiz Felipe Ferreira.

Prevalência de Infecções Maláricas Submicroscópicas em uma População de Assentamento Agrícola na Amazônia Brasileira / Luiz Felipe Ferreira Guimarães. – Belo Horizonte, 2020.

XIII, 70 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 58 – 67

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas não transmissíveis.

1. Malária/diagnóstico 2. Malária/complicações 3. PCR/métodos I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.93

**Luiz Felipe Ferreira Guimarães**

**Prevalência de Infecções Maláricas Submicroscópicas em uma População de Assentamento Agrícola na Amazônia Brasileira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Banca Examinadora:**

Prof. Dra Luzia Helena Carvalho (Instituto René Rachou) Presidente

Prof. Dr. Bruno Coelho Rocha (Instituto René Rachou) Titular

Prof. Dr. Daniel Moreira de Avelar (Instituto René Rachou) Titular

Prof. Dra Agnes Antônia Sampaio Pereira (Instituto René Rachou) Suplente

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 27/02/2020**

“Não veja o mundo como ele é, mas como deveria ser”

## AGRADECIMENTOS

Às pessoas que vivem em áreas endêmicas para malária, em especial ao povo do assentamento agrícola de Rio Pardo, que são o motivo para trabalhos como este existirem. Obrigado pela gentileza, por estarem sempre dispostos a ajudar na pesquisa e acreditar no nosso trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Plataforma de PCR em tempo real e ao Instituto René Rachou (IRR) pelo fornecimento da infraestrutura. Em especial à Sandra, Pedro e Viviane, que sempre ajudaram a solucionar problemas com muito carinho e disposição;

Ao programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do IRR, pela oportunidade única;

À Dra. Luzia, primeiramente pela oportunidade de estar aqui e acreditar que eu era capaz. E pela orientação e sabedoria que você tem me transmitido ao longo destes anos. É um prazer imensurável poder aprender com você diariamente;

À Dra. Flora, que sempre teve carinho para me ajudar, ensinar e discutir ciência e é, sem dúvidas, essencial para todo o trabalho desenvolvido aqui. A Dra. Taís e Dra. Cristiana, por sempre estarem de portas abertas e com muita disposição para ajudar;

Aos nossos colaboradores, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos demais professores do curso, pelos valiosos ensinamentos;

Aos colegas do BMIM, que são minha companhia diária, uma fonte de conhecimento e curiosidade e estão sempre dispostos a ajudar. À Gabi, pela amizade e companhia. Danielle, pelos conselhos, sensatez e por ser uma fonte de tranquilidade. Michelle, por estar sempre disposta a me ajudar e me fazer rir. E demais amigos da “salinha”, por estarem sempre por perto para ouvir meus desabafos e me dar conselhos;

À Daniela, que acreditou em mim há muito tempo atrás e abriu a primeira porta rumo à ciência e meus sonhos. Você não tem ideia do quanto sou grato a você por isso, pela amizade e todos os ensinamentos que você me passou;

À Dra. Lara, um exemplo de seriedade e profissionalismo. Obrigado pelos ensinamentos e colaboração nos experimentos;

À Mika e Helena, eu nunca vou entender como duas pessoas podem ser tão maravilhosas desta forma. Obrigado por ouvir meus assuntos aleatórios, por me darem conselhos, por serem tão lindas e representarem tanto na minha vida;

Aos meus amigos, que tornaram essa caminhada mais leve. É um prazer ter pessoas que me entendem tanto, e estão sempre dispostos a me ajudar quando preciso. Obrigado por se preocuparem e estarem presentes mesmo quando o tempo não permite. Em especial ao Talys, Thaís, Felipe, César e Washington, que me fazem rir, me tiram da minha zona de conforto e me fazem uma pessoa melhor;

À minha família, que independente de qualquer atrito, nunca me abandonou e sempre acreditou no meu potencial. À Janca e Lucas, cujo sucesso e amor enchem meu coração de alegria. Aos meus irmãos, que são a definição da palavra companheirismo e estão sempre comigo;

Aos meus afilhados, Gustavo, Lorenzo e Cecília, por serem luz e tornar meus dias mais brilhantes;

Aos meus pais, meus maiores modelos e as pessoas que mais acreditaram e investiram em mim. Obrigado por fazerem de mim quem eu sou, por terem orgulho de cada parte da pessoa que eu me tornei e serem uma base e porto seguro. Mãe, por ser forte e guerreira, e um verdadeiro exemplo de superação;

Muito Obrigado!

## RESUMO

O diagnóstico eficiente de malária é um dos principais desafios enfrentados pelos programas de controle e eliminação da doença, sendo necessária a correta identificação do parasito, em nível de espécie, para definição do esquema terapêutico e consequente interrupção do ciclo de transmissão. Entretanto, estima-se que a maior parte das infecções maláricas apresenta carga parasitária abaixo do limite de detecção do diagnóstico de rotina, a microscopia óptica. Achados recentes sugerem que as infecções submicroscópicas são mais prevalentes em áreas de baixa transmissão com predomínio de *P. vivax*, como é o caso da Amazônia Brasileira. O presente trabalho propôs determinar, retrospectivamente, a prevalência de malária microscópica e submicroscópica em uma população de assentamento agrícola da Amazônia Brasileira com histórico de longa exposição à doença. Para isto, o desenho experimental incluiu seis cortes transversais (2008 a 2017), correspondendo a períodos de alta e baixa transmissão de malária na área de estudo. O diagnóstico parasitológico foi conduzido por microscopistas experientes e os ensaios moleculares foram realizados através de protocolos de PCR em tempo real (qPCR) baseados em alvos ribossômicos (*18S SSU rRNA* – R-qPCR) e não ribossômicos (Pvr47/Pfr364 – NR-qPCR). No total de amostras estudadas (n=689) foi possível demonstrar que o uso de ferramentas moleculares aumentou em aproximadamente seis vezes a prevalência de infecções maláricas, sendo que as infecções submicroscópicas corresponderam à, aproximadamente, 85% do total de casos de malária diagnosticadas no estudo. O *P. vivax* foi a espécie predominante, seguido por *P. falciparum* e, em menor extensão, o *P. malariae*, que foi detectado apenas pelos protocolos moleculares. Embora o uso simultâneo de dois protocolos moleculares não tenha aumentado significativamente as chances de se detectar malária submicroscópica, a NR-qPCR apresentou maior sensibilidade, particularmente no diagnóstico de infecções mistas por *P. falciparum* e *P. vivax*. A flutuação nos níveis de transmissão de malária na área estudada não influenciou na proporção entre malária submicroscópica e microscópica ao longo do estudo. De relevância, infecções submicroscópicas foram detectadas mesmo no período de baixa transmissão quando nenhuma infecção microscópica foi diagnosticada na área. A estratificação da população de acordo com características demográficas e epidemiológicas sugere que indivíduos de ambos os sexos estavam igualmente expostos à transmissão de malária, sendo a infecção mais prevalente na população ribeirinha quando comparado aos não ribeirinhos. De interesse, os resultados aqui encontrados reforçam que na população estudada a exposição contínua a níveis relativamente baixos de transmissão de malária, levou ao desenvolvimento de imunidade contra os parasitos, caracterizada aqui pela diminuição da parasitemia com o aumento da idade e o tempo de residência na Amazônia. Em conjunto os dados aqui apresentados confirmam a importância de se avaliar infecções submicroscópicas nas áreas endêmicas brasileiras, particularmente onde exista predominância do *P. vivax*.

**Palavras-chave:** Malária; *Plasmodium*; infecções submicroscópicas; diagnóstico molecular; PCR.

## ABSTRACT

The efficient diagnosis of malaria is one of the main challenges faced by the disease control and elimination programs, requiring the correct identification of the parasite, at the species level, to define the therapeutic scheme and consequent interruption of the transmission cycle. However, it is estimated that most malarial infections have a parasitic load below the detection limit of routine diagnosis, optical microscopy. Recent findings suggest that submicroscopic infections are more prevalent in areas of low transmission with a predominance of *P. vivax*, like the Brazilian Amazon. The present work proposed to determine, retrospectively, the prevalence of microscopic and submicroscopic malaria in an agricultural settlement population in the Brazilian Amazon with a history of long exposure to the disease. For this, the experimental design included six cross-sections (2008 to 2017), corresponding to periods of high and low malaria transmission in the study area. Parasitological diagnosis was conducted by experienced microscopists and molecular assays were performed using real-time PCR (qPCR) protocols based on ribosomal targets (18S SSU rRNA - R-qPCR) and non-ribosomal targets (Pvr47 / Pfr364 - NR-qPCR). In the total of samples studied (n = 689) it was possible to demonstrate that the use of molecular tools increased the prevalence of malarial infections by approximately six-fold, with submicroscopic infections corresponding to approximately 85% of the total malaria cases diagnosed in the study. *Plasmodium vivax* was the predominant species, followed by *P. falciparum* and *P. malariae*, which was detected only by molecular protocols. Although the simultaneous use of two molecular protocols did not significantly increase the chances of detecting submicroscopic malaria, NR-qPCR was more sensitive, particularly in the diagnosis of mixed infections by *P. falciparum* and *P. vivax*. The fluctuation in the levels of malaria transmission in the studied area did not influence the proportion between submicroscopic and microscopic malaria throughout the study. Of relevance, submicroscopic infections were detected even in the low transmission period when no microscopic infections were diagnosed in the area. The stratification of the population according to demographic and epidemiological characteristics suggests that individuals of both gender were equally exposed to the transmission of malaria, being the most prevalent infection in the riverine population when compared to non-riverine populations. Of interest, the results found here reinforce that in the studied population, continuous exposure to relatively low levels of malaria transmission led to the development of immunity against parasites, characterized here by the decrease in parasitemia with increasing age and residence time in Amazon. Together, the data presented here confirm the importance of assessing submicroscopic infections in endemic areas in Brazil, particularly where *P. vivax* predominates.

**Keywords:** Malaria; *Plasmodium*; submicroscopic infections; molecular diagnosis; PCR.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Incidência global de malária em 2018.....	14
<b>Figura 2:</b> Mapa de risco da malária no Brasil por município de infecção em 2018...17	
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do ciclo biológico do parasito <i>P. vivax</i> no hospedeiro vertebrado (humano) e no hospedeiro invertebrado (mosquito <i>Anopheles</i> ).....	20
<b>Figura 4:</b> Número de casos de malária notificados no assentamento agrícola de Rio Pardo entre os anos de 2008 e 2017.....	32
<b>Figura 5:</b> Fluxograma do desenho experimental utilizado para o processamento das amostras pertencentes à população de estudo do assentamento agrícola de Rio Pardo.....	33
<b>Figura 6:</b> Prevalência de infecções maláricas nas amostras do estudo de acordo com o método de diagnóstico.....	41
<b>Figura 7:</b> Mapa representando a positividade por <i>P. vivax</i> , <i>P. falciparum</i> e infecções mistas ( <i>Pv/Pf</i> ) para cada método de diagnóstico.....	42
<b>Figura 8:</b> Prevalência de malária na população de Rio Pardo por período do estudo.....	45
<b>Figura 9:</b> Prevalência de malária na população de Rio Pardo por faixa etária.....	48
<b>Figura 10:</b> Prevalência de malária na população de Rio Pardo por local de moradia.....	48

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Sequências dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para amplificação do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO.....	35
<b>Tabela 2:</b> Condições de amplificação da PCR em tempo real para amplificação dos genes do sistema ABO.....	35
<b>Tabela 3:</b> Sequências dos iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (R-qPCR).....	36
<b>Tabela 4:</b> Condições de amplificação da PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (R-qPCR).....	37
<b>Tabela 5:</b> Sequências dos iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real para amplificação das regiões Pvr47/Pfr364 (NR-qPCR).....	38
<b>Tabela 6:</b> Condições de amplificação da PCR em tempo real para amplificação das regiões Pvr47/Pfr364 (NR-qPCR).....	38
<b>Tabela 7:</b> Sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico utilizados, na identificação de infecções maláricas, em nível de gênero e espécie de <i>Plasmodium</i> .....	43
<b>Tabela 8:</b> Dados demográficos e epidemiológicos da população estudada estratificados de acordo com a positividade de malária microscópica e submicroscópica.....	47

## Lista de Siglas e Abreviaturas

**DNA** – Desoxiribonucleic Acid (Ácido desoxiribonucleico)

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético

**GTS** – Global Technical strategy for malaria 2016-2030 (Estratégia técnica global para malária 2016-2030)

**INCRA** - Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária

**LAMP** – Loop Mediated Isothermal Amplification (Amplificação isotérmica de DNA)

**MS** – Ministério da Saúde

**mtCOX1** – Mitochondrially encoded Cytochrome C Oxidase subunit 1

**PCR** – Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

**Pf** – *P. falciparum*

**HRP2** – Histidine-Rich Protein 2 (Proteína rica em histidina 2)

**NR-qPCR** – Protocolo de PCR em tempo real descrito por Amaral *et al.*, 2019

**pb** – Pares de bases

**pLDH** – Plasmodium lactate dehydrogenase (Lactato desidrogenase de *Plasmodium*)

**Pv** – *Plasmodium vivax*

**qPCR** – Quantitative Polimerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

**RDTs** – Rapid Diagnostics Tests (Testes rápidos para diagnóstico)

**RNA** – Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico)

**rRNA** – Ribosomal ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribossomal)

**RPM** – Rotações por minuto

**R-qPCR** – Protocolo de PCR em tempo real descrito por Rougemont *et al.*, 2004

**SIVEP** – Sistema de Vigilância Epidemiológica

**SVS** – Secretaria de Vigilância em Saúde

**varATS** – var gene acidic terminal sequence (Sequência ácido terminal do gene *var*)

**WHO** – World Health Organization (Organização mundial de saúde)

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
1.1. Panorama geral da malária no mundo	13
1.2. Situação epidemiológica da malária no Brasil	16
1.3. Ciclo de vida do plasmódio no homem	18
1.4. Diagnóstico de Malária	20
1.4.1. Microscopia Óptica	21
1.4.2. Testes Rápidos	22
1.4.3. Diagnóstico Molecular	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>3. OBJETIVOS</b>	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos	29
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
4.1. População de estudo	30
4.2. Cortes transversais e coleta de amostras	30
4.3. Diagnóstico de malária por microscopia óptica	32
4.4. Ensaio moleculares	32
4.4.1. Painel de controles	33
4.4.2. Extração de DNA	34
4.4.3. Amplificação do sistema do grupo sanguíneo ABO	35
4.4.4. Diagnóstico de malária por PCR	36
4.5. Análise dos Dados	38

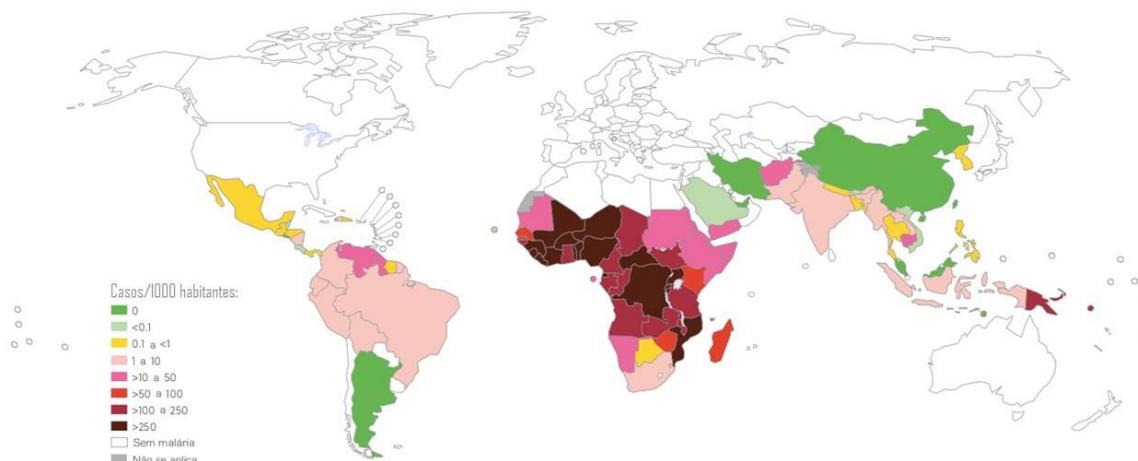
<b>5. RESULTADOS</b> .....	40
5.1. Infecções maláricas na área de estudo caracterizadas segundo o método de diagnóstico .....	40
5.2. Prevalência de malária microscópica e submicroscópica na área de estudo em função da flutuação do número de casos registrados .....	44
5.3. Influência de fatores demográficos e epidemiológicos na prevalência de malária microscópica e submicroscópica na população estudada .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	49
6.1. Infecções maláricas na área de estudo caracterizadas segundo o método de diagnóstico .....	49
6.2. Infecções submicroscópicas na área de estudo.....	52
6.3. Influência de fatores demográficos e epidemiológicos na prevalência de malária microscópica e submicroscópica na população de Rio Pardo .....	54
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	58
<b>Anexo I</b> .....	68

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Panorama geral da malária no mundo

A malária é uma das principais doenças parasitárias, sendo provocada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida por mosquitos do gênero *Anopheles*. Cinco espécies estão normalmente associadas com a malária humana: *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo as duas primeiras mais importantes do ponto de vista de saúde pública. Enquanto *P. vivax* é a espécie com maior distribuição geográfica global *P. falciparum* é a espécie mais patogênica, sendo frequentemente associado com casos mais graves pela doença, particularmente no continente africano, onde esta espécie predomina (WHO, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde estima-se que no ano de 2018 ocorreram aproximadamente 228 milhões de casos de malária distribuídos em 87 países e que resultaram em cerca de 405 mil mortes. Cerca de 85% dos casos de malária no mundo estão distribuídos em 15 países africanos e na Índia, sendo a maior parte deles (99,7%) provocada por *P. falciparum*. Na região das Américas a maior parte dos casos de malária (74,1%) é provocada por *P. vivax* (WHO, 2019). Na figura 1 estão representadas as taxas de incidência de malária por país com risco de transmissão da doença, podendo confirmar que as maiores taxas (>250 casos por mil habitantes) se referem a países africanos.



**Figura 1:** Incidência global de malária em 2018. As taxas de incidência foram representadas por país com risco de transmissão. Fonte: Relatório anual de malária da Organização Mundial de Saúde (*World malaria report, 2019*).

Em relação às Américas, a incidência de malária na região vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Enquanto o número de casos da doença notificados em 2014 foi 477 mil casos, após uma série de aumentos, em 2018 foram notificados 929 mil casos de malária (WHO, 2019). No total, nove países foram responsáveis pelo aumento no número de casos nas Américas. Dentre eles, destacam-se a Venezuela, Brasil e Colômbia, responsáveis por mais de 80% do total de casos registrados na região. Embora Costa Rica, Equador e Nicarágua representem uma parcela menor do número de casos de malária na região, entre 2015 e 2018 houve um aumento de, pelo menos, 100% na incidência da doença nestes países (WHO, 2019).

De grande importância, o aumento do número de caso de malária na Venezuela foi decorrente da grave crise sócio-humanitária que ocorre no país (WHO, 2019). De fato, entre os anos de 2000 e 2015, o país registrou um aumento de 205% no número de casos da doença. Em 2012 foi registrado o maior número de casos de malária na história do país, que em 1961 havia recebido a certificação da Organização Mundial de Saúde pela erradicação da malária em suas áreas populosas. A situação no país intensifica o debate a respeito da necessidade de esforços em conjunto entre diferentes países para o controle da doença, uma vez que aproximadamente 78 e 81% dos casos importados diagnosticados no Brasil e

na Colômbia, respectivamente, são provenientes da Venezuela (RECHT *et al.*, 2017).

Embora a malária provocada por *P. vivax* foi considerada, durante muito tempo, uma infecção benigna, um número significativo de evidências tem demonstrado que infecções por este parasito podem estar associadas a casos graves e óbitos pela doença (BARCUS *et al.*, 2007; GENTON *et al.*, 2008; TJITRA *et al.*, 2008), incluindo no Brasil (RIBEIRO; LACERDA; FERREIRA, 2008). Estes achados tornam extremamente importante a implementação de medidas de controle eficazes para esta espécie.

Os programas de eliminação da malária enfrentam uma série de desafios relacionados ao controle da doença. Em relação à malária por *P. vivax*, destaca-se a alta prevalência de infecções submicroscópicas e assintomáticas, tanto em áreas com alta transmissão da doença quanto em áreas de baixa transmissão (FERREIRA; CASTRO, 2016; RECHT *et al.*, 2017). A baixa parasitemia encontrada nestas infecções dificulta a detecção dos parasitos pelos métodos usuais de diagnóstico fazendo com que os indivíduos infectados, e não tratados, atuem como reservatório da doença (FERREIRA; CASTRO, 2016). Outro fator que dificulta o controle desta espécie é a ocorrência de recaídas ocasionadas pela ativação de formas hepáticas dormentes do parasito, chamadas hipnozoítos. De fato, estima-se que em áreas hiperendêmicas para a doença, as recaídas representam a maior parte dos casos de malária diagnosticados (CHU; WHITE, 2016).

Embora *P. falciparum* também possa causar infecções submicroscópicas (SLATER *et al.*, 2019), o principal desafio à eliminação da malária provocada por esta espécie é a ocorrência de resistência às drogas atualmente disponíveis para o tratamento da doença (WHO, 2019). A resistência desta espécie à cloroquina, principal droga no tratamento da malária causada por *P. vivax*, foi descrita inicialmente na década de 60 (MABERTI, 1960). Decorrente da alta resistência de *P. falciparum* a esta droga, o tratamento da infecção provocada por este parasito é realizado principalmente através da terapia combinada com derivados de artemisinina (SVS, 2019). Entretanto, existem relatos de resistência de *P. falciparum* à derivados de artemisinina em diversas regiões endêmicas para malária (DONDORP *et al.*, 2009; WHO, 2011), sendo considerado um problema de saúde

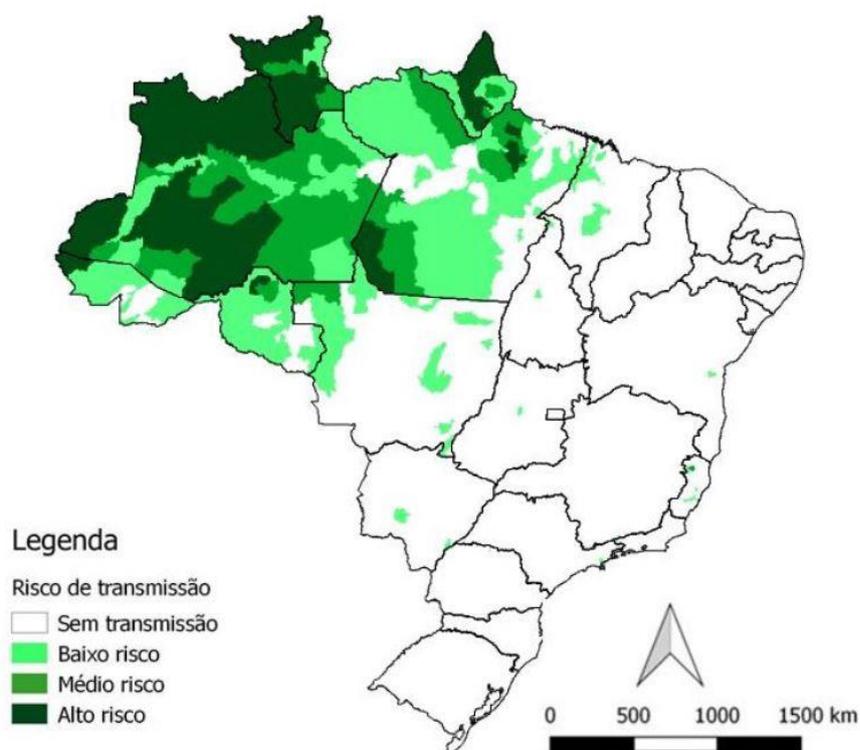
publica no sudeste asiático (AMARATUNGA *et al.*, 2016; NA-BANGCHANG *et al.*, 2013).

Com o objetivo de auxiliar na eliminação da malária no mundo e contornar os desafios ao controle da doença a Organização Mundial de Saúde lançou em 2015 a estratégia técnica global para malária 2016-2030 (*Global technical strategy for malaria 2016-2030*, GTS). Dentre os pilares do GTS se destaca a garantia universal do acesso à prevenção, diagnóstico e tratamento da malária com o objetivo de reduzir a incidência global da doença em 90% até 2030 (WHO, 2015a).

## 1.2. Situação epidemiológica da malária no Brasil

Aproximadamente 99% dos casos notificados no Brasil ocorrem na região da Amazônia Legal, considerada a área endêmica para a doença (Figura 2) (RIBEIRO; LACERDA; FERREIRA, 2008). A maior parte destes casos, cerca de 80%, é causada pelo *P. vivax*, espécie cujos métodos de controle atuais (diagnóstico e tratamento oportuno) não têm apresentado resultados eficazes (FERREIRA; CASTRO, 2016). No país também existe a circulação de *P. falciparum*, *P. malariae* (FERREIRA; CASTRO, 2016) e *P. simium* em regiões de mata atlântica (ALVARENGA, D. *et al.*, 2015). Embora *P. falciparum* fosse responsável por um número considerável de casos de malária notificados no país, desde 1990, a proporção de casos causados por esta espécie vem diminuindo progressivamente. Deve-se a isso, importantes marcos na saúde pública brasileira, como a criação do Sistema Único de Saúde e também à maior susceptibilidade desta espécie aos meios adotados para controle de malária no país, que tinham como foco principal a redução do tempo entre o início dos sintomas e o tratamento (SIQUEIRA *et al.*, 2016). *Plasmodium malariae* é considerada uma espécie subnotificada, uma vez que o método de diagnóstico normalmente empregado na rotina – exame microscópico de gota espessa corada por Giemsa – pode levar ao diagnóstico morfológico incorreto, sendo que esta espécie é geralmente confundida com outras espécies de plasmódio, particularmente *P. vivax*. Estudos utilizando ferramentas moleculares têm sugerido uma alta prevalência deste parasito em algumas regiões (MCKENZIE; JEFFERY; COLLINS, 2001), particularmente em populações indígenas na Amazônia brasileira.

Ao longo dos anos, o número de casos de malária notificado no país diminuiu progressivamente, sendo que entre os anos de 2010 e 2016 houve uma diminuição de aproximadamente 60% dos casos da doença, sendo confirmados aproximadamente 130 mil casos na Região Amazônica em 2016 (SVS, 2018). Entretanto, de acordo com dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde (SIVEP/MS), o número de infecções maláricas no país voltou a subir, sendo registrados cerca de 194.000 casos da doença no ano de 2017, o que representa um aumento de aproximadamente 50% na incidência de malária na região em relação ao ano anterior (SVS, 2018).



**Figura 2:** Mapa de risco da malária no Brasil por município de infecção em 2018. Fonte: Sivep-Malária.

Embora a maior parte dos casos de malária notificada no Brasil ocorra na região amazônica alguns casos da doença ainda são diagnosticados na região extra-amazônica (SVS, 2018). Enquanto a maior parte destes casos é importada de áreas endêmicas, dentro e fora do país, em regiões de Mata Atlântica casos de transmissão autóctone têm sido reportados. Nesta região, o parasito é transmitido,

principalmente, pelo *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, que tem como criadouros as bromélias, estando então próximos de indivíduos em contato com as florestas tropicais (DUARTE *et al.*, 2013). A maior parte dos casos de malária da região de mata atlântica é notificada como *P. vivax*, entretanto, através do uso de ferramentas moleculares específicas, tem sido demonstrada uma alta prevalência de infecções por *P. simium* (BRASIL *et al.*, 2017; DE ALVARENGA *et al.*, 2018). Esta espécie de *Plasmodium*, que é morfológica e geneticamente similar à *P. vivax* é normalmente associada com malária de primatas não humanos, demonstrando um caráter zoonótico na malária de zona atlântica (ALVARENGA *et al.*, 2015).

Apesar de o número de casos de malária registrados fora da região amazônica seja bem menor em comparação à área endêmica, a dificuldade e consequente demora em se realizar o diagnóstico correto acarretam em uma maior proporção de casos graves da doença e óbitos (DE PINA-COSTA *et al.*, 2014).

### **1.3. Ciclo de vida do plasmódio no homem**

Os plasmódios possuem um complexo ciclo de vida que pode ser dividido em duas fases: a fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado, incluindo o homem, e a fase sexuada ocorre no hospedeiro invertebrado, mosquitos do gênero *Anopheles* (Figura 3).

Resumidamente, o homem é infectado através picada da fêmea do mosquito anofelino durante o repasto sanguíneo no qual são inoculadas na pele as formas conhecidas como esporozoítos (AMINO *et al.*, 2006). Os esporozoítos, por sua vez, podem permanecer no tecido subcutâneo por longos períodos, podendo estimular uma resposta imune inicial e destruição de grande parte dos parasitos (WHITE *et al.*, 2014). Uma vez na corrente sanguínea, o restante dos esporozoítos atinge o parênquima hepático e infecta os hepatócitos através de um complexo processo que depende da migração do esporozoítos por várias células e de interações do tipo ligante-receptor permitindo, por fim, a invasão do hepatócito e desenvolvimento dentro de um vacúolo parasitóforo (MOTA, 2001).

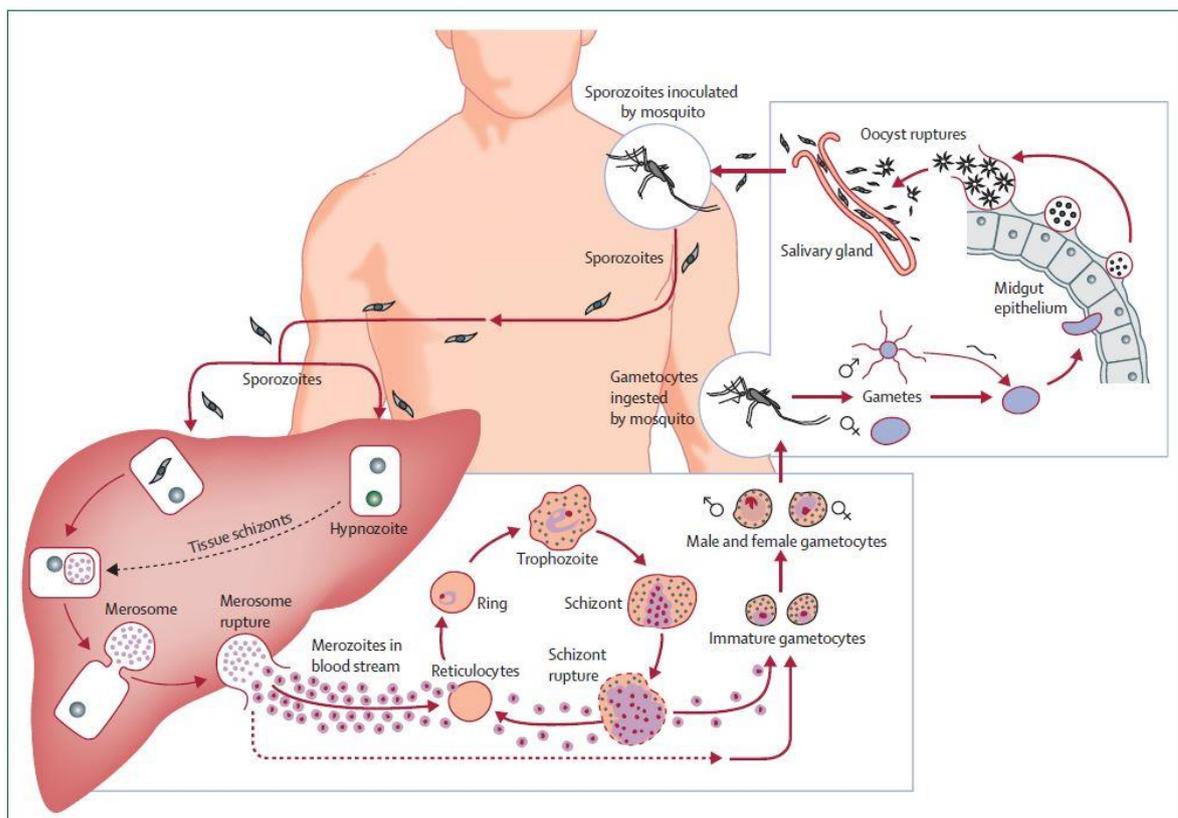
Dentro dos hepatócitos os parasitos se diferenciam em trofozoítos e, após sofrerem múltiplas divisões, em um processo de esquizogonia tecidual se

diferenciam em esquizontes contendo merozoítos (STURM, 2006). Nas infecções por *P. vivax* ou *P. ovale*, formas latentes, chamadas hipnozoítos, podem permanecer nos hepatócitos por meses ou anos, sendo responsáveis pela ocorrência de recaídas quando reativadas por mecanismos, até então, desconhecidos (KROTOSKI, 1989).

Após vários ciclos de multiplicação, os merozoítos são liberados dos esquizontes hepáticos através de vesículas chamadas merossomos e dão origem ao ciclo eritrocítico (STURM, 2006). Os merozoítos invadem então os eritrócitos através de um complexo processo envolvendo diversas etapas, como reconhecimento, reorientação e invasão e diversas interações entre proteínas do parasito e receptores eritrocíticos (COWMAN *et al.*, 2017). Dentro dos eritrócitos, os merozoítos perdem suas organelas apicais, se diferenciam em trofozoítos, jovens e maduros, esquizontes, e, posteriormente, em merozoítos (MOTA, 2001). *P. vivax* é uma espécie com preferência para invadir eritrócitos jovens, os reticulócitos, que compõem cerca de 1% do total de eritrócitos, o que pode explicar, em parte, a baixa parasitemia predominante dessa espécie (KANJEE *et al.*, 2018; KITCHEN, 1938; MALLERET; RÉNIA; RUSSELL, 2017).

Por fim, ocorre o rompimento da hemácia, liberando os merozoítos aptos para invadir novas células e dar prosseguimento no ciclo. O ciclo eritrocítico é responsável por toda a patogenia da doença, incluindo sintomas clássicos em pacientes com malária, como febre, calafrios, dor de cabeça, entre outros. O diagnóstico da doença também é realizado nesta etapa, uma vez que os parasitos podem ser detectados na circulação periférica.

Após a ocorrência de múltiplas replicações nos eritrócitos, alguns parasitos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, formas infectantes para o mosquito vetor, dando prosseguimento à transmissão da doença (BARILLAS-MURY; KUMAR, 2005). Para *P. vivax*, a produção dos gametócitos ocorre precocemente, contribuindo para a manutenção da transmissão por essa espécie, uma vez que o indivíduo é capaz de infectar o mosquito antes mesmo de manifestar os sintomas e iniciar o tratamento (FERREIRA; CASTRO, 2016).



**Figura 3:** Representação esquemática do ciclo biológico do parasito *P. vivax* no hospedeiro vertebrado (humano) e no hospedeiro invertebrado (mosquito *Anopheles*). Fonte: Adaptado de MUELLER *et al.*, 2009.

#### 1.4. Diagnóstico de Malária

O diagnóstico eficiente de infecções maláricas, particularmente daquelas caracterizadas por baixas parasitemias, é um dos principais desafios no contexto atual dos programas de controle e eliminação da doença. Isto porque não existe um método que seja altamente sensível e específico, de baixo custo e aplicável em situações de campo, incluindo regiões isoladas sem energia elétrica (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007). Enquanto os métodos atualmente disponíveis na rotina – microscopia e testes rápidos – têm se mostrado pouco eficientes nas infecções onde a carga parasitária é baixa, os métodos mais sensíveis – como a amplificação de ácidos nucleicos – ainda não estão disponíveis para o diagnóstico “*point-of-care*” (ROTH *et al.*, 2016). Portanto, tornam-se necessárias pesquisas nesta área, particularmente para avaliar a importância das infecções submicroscópicas no contexto dos programas de controle e eliminação da doença em diferentes situações epidemiológicas.

### 1.4.1. Microscopia Óptica

O diagnóstico parasitológico de rotina para a malária é baseado na detecção do parasito no sangue através da análise microscópica da gota espessa corada com giemsa. A gota espessa é uma técnica simples e de baixo custo, permitindo a detecção direta do parasito, quantificação da densidade parasitária e o monitoramento da resposta do paciente ao tratamento, através da lâmina de controle de cura (SVS, 2009).

Diferentes métodos de quantificação do parasito através da gota espessa podem ser utilizados, a avaliação semiquantitativa em cruces é o método de avaliação tradicionalmente utilizado no Brasil. Neste método, a parasitemia é estimada em cruces, que variam de meia cruz (+/2 – entre 40 e 60 parasitos em 100 campos microscópicos) a 4 cruces (++++ - mais que 200 parasitos por campo microscópico). Infecções com parasitemia abaixo de meia cruz devem ser anotados o número de parasitos contados. Outros métodos para se estimar a parasitemia incluem o número de parasitos por leucócitos, bem como o número de parasitos por microlitro de sangue (SVS, 2009).

Embora a microscopia tenha sido considerada por muito tempo o padrão-ouro para o diagnóstico, este ensaio possui diversas limitações, relacionadas principalmente a baixa sensibilidade. Considera-se que o limite de detecção desta técnica pode variar entre 20 a 100 parasitos por microlitro de sangue dependendo do profissional que a realiza, o que leva a necessidade de microscopistas experientes e equipamento de excelente qualidade (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007; ZIMMERMAN; HOWES, 2015). Outros fatores que influenciam no resultado incluem a qualidade do material preparado, sendo necessária boa coloração para que se evitem resultados falso-positivos e falso-negativos.

Ferramentas baseadas em *machine learning* têm sido utilizadas para automatizar a leitura de lâminas de microscopia a fim de identificar e quantificar os parasitos no sangue de indivíduos residentes em área endêmica (POOSTCHI *et al.*, 2018). Desta forma, seria possível fornecer um diagnóstico em menor tempo e diminuir os erros de leitura relacionados à falha humana. Os estudos iniciais que utilizam esta metodologia se mostraram capazes de identificar, diferencialmente, infecções por *P. falciparum* e/ou por *P. vivax* (POLLAK; HOURI-YAFIN; SALPETER,

2017). Embora a sensibilidade desta técnica seja inferior à de protocolos baseados na amplificação do DNA do parasito a automação da microscopia tem o potencial de auxiliar no diagnóstico em larga escala, principalmente em áreas hiperendêmicas para malária (POOSTCHI *et al.*, 2018; TORRES *et al.*, 2018).

#### 1.4.2. Testes Rápidos

Os testes rápidos (*Rapid Diagnostics Tests* - RDTs), ou ensaios imunocromatográficos em membrana de celulose, são testes que utilizam anticorpos monoclonais e policlonais para detectar antígenos do parasito circulantes no sangue de pacientes (WHO, 2015b). Os testes rápidos se apresentam como uma boa ferramenta para auxiliar no diagnóstico da malária, principalmente quando utilizados em locais de difícil acesso ou em hospitais para triagens e confirmação de diagnóstico, sobretudo fora de área endêmica, onde o acesso a microscopistas experientes é limitado (MOUATCHO; DEAN GOLDRING, 2013).

Apesar de sua importância no diagnóstico e controle da doença, os RDTs apresentam uma série de limitações que dificultam seu uso de forma ampla, como a baixa sensibilidade, inferior ao diagnóstico microscópico (>100 parasitos/ $\mu$ L), qualidade do kit, variação entre lotes, antígeno utilizado e o método de estocagem do mesmo, uma vez que alguns kits possuem baixa estabilidade em condições com alta umidade e temperatura, como é o caso de regiões tropicais (MOUATCHO; DEAN GOLDRING, 2013; ROBINSON *et al.*, 2015; WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007).

Atualmente, múltiplos antígenos podem ser utilizados na identificação de infecções maláricas através de RDTs. A maior parte dos testes rápidos disponíveis no mercado é capaz de identificar especificamente *P. falciparum* e/ou infecções por outras espécies de *Plasmodium*. Aproximadamente 90% destes testes utiliza a Proteína Rica em Histidina 2 de *P. falciparum* (PfHRP2). A PfHRP2 é uma proteína estável, específica de *P. falciparum* e que apresenta alta correlação com a densidade parasitária, sendo considerada durante muito tempo, um bom marcador da infecção por este parasito. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado uma alta variabilidade genética no gene que codifica esta proteína e circulação de cepas com a deleção deste gene (KRAMPA *et al.*, 2017; LUCHAVEZ *et al.*, 2011;

MOUATCHO; DEAN GOLDRING, 2013), incluindo no Brasil (RACHID VIANA *et al.*, 2017). Considerando isso, a maior parte dos testes utiliza uma combinação de diferentes antígenos para garantir maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da malária.

A proteína lactato desidrogenase dos plasmódios (pLDH) é uma importante enzima envolvida nas vias glicolíticas de plasmódio, sendo, portanto, essencial para a produção energética do parasito. Os testes baseados neste antígeno podem utilizar epítomos comuns para todas as espécies de *Plasmodium*, uma vez que a proteína apresenta regiões extremamente conservadas, ou podem utilizar regiões específicas que permitam diferenciar as especificidades de cada espécie. Entretanto, os testes baseados na pLDH têm apresentado baixa acurácia em infecções com baixas parasitemias, tendo resultados inferiores a protocolos baseados em outros antígenos.

Outra proteína bastante utilizada em testes rápidos é a aldolase, uma proteína que também está envolvida na via glicolítica do parasito. Poucos trabalhos comparam a eficácia deste alvo com os outros citados, sendo bastante utilizada em conjunto com *PfHRP2* para o diagnóstico de *P. falciparum* ou não *P. falciparum* (pan) (MOUATCHO; DEAN GOLDRING, 2013).

### **1.4.3. Diagnóstico Molecular**

Devido, principalmente, à sua alta sensibilidade, o uso de ferramentas moleculares no diagnóstico de malária tem se tornado importante, sobretudo em áreas próximas a eliminação da doença ou em regiões endêmicas onde os indivíduos apresentam baixas parasitemias. Dentre as ferramentas moleculares atualmente disponíveis para o diagnóstico e estudo da doença destacam-se protocolos baseados na amplificação do DNA do parasito, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a Nested-PCR (SNOUNOU *et al.*, 1993) e PCR em tempo real (qPCR) (ZIMMERMAN; HOWES, 2015) e também o LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*).

O LAMP ou amplificação isotérmica mediada por *loop* é uma técnica que utiliza múltiplos iniciadores e baseia-se na amplificação isotérmica do DNA (entre

60°C e 65°C) pela ação da *Bst DNA polymerase*, que dispensa o passo de desnaturação presente na PCR (CHARPENTIER *et al.*, 2019; ORIERO *et al.*, 2015). Em comparação com a PCR, o LAMP é uma técnica aparentemente mais simples, mais rápida e mais barata. Além disso, o resultado do ensaio pode ser visualizado através de turbidez ou fluorescência, dispensando a manipulação pós-amplificação e permitindo o uso deste método em regiões remotas. Embora diversos protocolos baseados no LAMP para o diagnóstico e estudo molecular de resistência dos parasitos maláricos tenham sido descritos atualmente (ANINAGYEI *et al.*, 2019; CHARPENTIER *et al.*, 2019; MOHON *et al.*, 2019), os estudos sobre sua aplicação no diagnóstico de infecções subpatentes têm demonstrado sensibilidade variável (KOLLENDÁ *et al.*, 2018). De fato, em um trabalho que teve como objetivo avaliar de um protocolo de LAMP adaptado para o diagnóstico de pacientes em campo demonstrou um baixo desempenho da técnica na detecção espécie-específica de plasmódio (KOLLENDÁ *et al.*, 2018).

Protocolos baseados na PCR destacam-se devido à sua alta sensibilidade, sendo teoricamente capaz de detectar e, no caso da qPCR, quantificar parasitemias menores que um parasito por microlitro de sangue. A alta sensibilidade e especificidade, sendo capaz de diferenciar as espécies de *Plasmodium*, sugerem que estas técnicas têm maior potencial para contribuir na identificação apropriada das infecções maláricas, como exigido pelos programas e estratégias de eliminação da malária no mundo. Entretanto, a alta complexidade da técnica e a necessidade de pessoal especializado, assim como o elevado custo de materiais e equipamentos, tem limitado o uso desta técnica a laboratórios de pesquisa e levantamentos epidemiológicos (FERREIRA; CASTRO, 2016).

A maior parte dos protocolos moleculares para diagnóstico da malária utiliza como alvo a região 18S do RNA ribossomal do parasito, presente entre 5 e 8 cópias nos genomas de *Plasmodium* (MERCEREAU-PUIJALON; BARALE; BISCHOFF, 2002). Apesar da elevada sensibilidade dos protocolos moleculares na detecção do DNA do parasito, estudos pioneiros realizados pelo nosso grupo demonstraram que o uso da reação em cadeia da polimerase para detecção de alvos ribossomais apresenta baixa reprodutibilidade dos resultados em infecções com parasitemias submicroscópicas (COSTA *et al.*, 2014). Mais recentemente, outros trabalhos têm confirmado as limitações da PCR baseada na região 18S, mesmo quando utilizando

ensaios mais sensíveis, como a PCR em tempo real (GRUENBERG *et al.*, 2018; HOFMANN *et al.*, 2015; HOFMANN *et al.*, 2018).

Neste contexto, a pesquisa por alvos moleculares alternativos, presentes no genoma do parasito com múltiplas cópias, bem como a padronização de ferramentas mais sensíveis tem se tornado um campo de estudo promissor na pesquisa em malária. Com a disponibilidade do genoma de diferentes espécies de *Plasmodium* e através do uso de ferramentas de mineração de dados genômicos, novos alvos potencialmente mais sensíveis que o alvo ribossomal, devido, principalmente, ao maior número de cópias, têm sido descritos na literatura (DEMAS *et al.*, 2011; HOFMANN *et al.*, 2015; LLOYD *et al.*, 2018; LUCCHI *et al.*, 2013; POLLEY *et al.*, 2010). Os estudos iniciais demonstram uma sensibilidade elevada e maior eficácia no diagnóstico espécie-específico da malária.

Um alvo bastante estudado com o objetivo de fornecer um diagnóstico mais sensível para malária é o gene *cytochrome C oxidase I* de *P. vivax* (Pv-mtCOX1). Esta região, presente no DNA mitocondrial do parasito, apresenta um número desconhecido de cópias, entretanto, estima-se a ocorrência de um número até 10 vezes maior do que o normalmente utilizado em protocolos baseados na região 18S (GRUENBERG *et al.*, 2018). Para o diagnóstico de *P. falciparum*, uma região subtelomérica presente em grande quantidade no genoma do parasito (entre 50 e 150 cópias) tem sido proposta (Pf-*varATS*). A região *varATS* é uma região conservada que codifica o domínio intracelular da proteína de membrana eritrocítica 1 de *P. falciparum* (HOFMANN *et al.*, 2015). Protocolos de qPCR baseados nos alvos mtCOX1 e *varATS* têm demonstrado alta sensibilidade, sendo capazes de detectar infecções com baixas parasitemias não detectáveis por protocolos baseados no alvo ribossomal (HOFMANN *et al.*, 2018). Entretanto, a alta sensibilidade encontrada nestes estudos pode estar associada também aos métodos utilizados para o processamento das amostras, como o alto volume de sangue utilizado para purificação do material genético (2mL) e de DNA utilizado nos ensaios (4µL) e a realização de depleção de leucócitos, que diminui a inibição da reação pela presença do material genético do hospedeiro. Neste sentido, torna-se importante a adequação destes protocolos às condições normalmente encontradas em trabalhos de campo em região endêmica para determinar a real eficácia destes alvos no diagnóstico de infecções em regiões com transmissão de malária.

Outros alvos que têm se destacado no diagnóstico de malária são as sequências, Pvr47 e Pfr364, localizadas em regiões subteloméricas do genoma de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente. Estas regiões, sem função conhecida, estão presentes em número de cópias muito maior do que o 18S rRNA no genoma dos parasitos (Pvr47-14 cópias/Pfr364-41 cópias) (DEMAS *et al.*, 2011). Por este motivo, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um protocolo de qPCR com sondas específicas para essas regiões. Os estudos iniciais que tiveram como objetivo comparar a eficácia de Pvr47/Pfr364 com protocolos baseados em 18S rRNA demonstraram uma sensibilidade maior deste protocolo na detecção do DNA de *Plasmodium*, principalmente para monoinfecções de *P. falciparum* ou para coinfeções entre as duas espécies, resultado visto através da titulação de amostras de cultivo dos parasitos e pela análise de amostras de indivíduos com malária subpatente residentes em área endêmica (Tese de Doutorado - AMARAL, 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os assentamentos agrícolas são áreas criadas pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária através de projetos de colonização focados na agricultura e assentamento da população na região amazônica (DE CASTRO *et al.*, 2006). A proximidade da população com a floresta e a predominância de atividades como agricultura e piscicultura, comuns em moradores de assentamentos, já foram associadas com a transmissão de malária na área, uma vez que os moradores se encontram mais expostos ao mosquito vetor (FERREIRA; CASTRO, 2016).

A baixa sensibilidade dos métodos parasitológicos para o diagnóstico da malária representa um importante desafio ao controle e eliminação da doença. De fato, estudos realizados em diferentes áreas endêmicas ao redor do mundo têm demonstrado que o número de infecções submicroscópicas supera o número de casos detectados pela microscopia (ALMEIDA *et al.*, 2018; FERREIRA; CASTRO, 2016; GRUENBERG *et al.*, 2018; RECHT *et al.*, 2017). Além disso, fazendo uso de ferramentas moleculares, relatos na literatura demonstram que indivíduos com malária subclínica e/ou subpatentes, isto é, que não apresentam sintomas ou parasitemia detectável por microscopia óptica, possuem gametócitos na circulação periférica, sendo, portanto, potencialmente capazes de infectar os mosquitos vetores e, assim contribuir para a manutenção da transmissão da doença (GRUENBERG *et al.*, 2019; NGUITRAGOOL *et al.*, 2017; SLATER *et al.*, 2019). Dessa forma o sucesso dos programas atuais de controle e eliminação da malária depende da correta identificação de infecções com baixas parasitemias e tratamento dos pacientes (WHO, 2015a).

O diagnóstico e tratamento de infecções maláricas submicroscópicas se torna importante não apenas por representar um desafio ao controle da doença, mas também pelas diversas evidências que sugerem que estas infecções não são completamente benignas. De fato, infecções maláricas crônicas já foram associadas com risco aumentado de anemia em populações ribeirinhas na Amazônia (LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2009), com a diminuição da atividade das telomerasas e aceleração do envelhecimento celular em aves (ASGHAR *et al.*, 2015) e

alterações nos níveis de proteínas inflamatórias, hemoglobina e plaquetas em crianças do sudeste asiático (DE MAST *et al.*, 2015).

Historicamente, as infecções maláricas submicroscópicas foram associadas às infecções em adultos por *P. falciparum* expostos à elevados níveis de transmissão de malária em áreas hiperendêmicas (OKELL *et al.*, 2009; SLATER *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2016). Entretanto, achados recentes contradizem este paradigma, pois tem sido demonstrado que *P. vivax* está mais comumente associado a infecções com baixas parasitemias, particularmente em áreas de baixa transmissão, como é o caso da Amazônia brasileira (ALMEIDA *et al.*, 2018; FERREIRA; CASTRO, 2016; RIBEIRO; LACERDA; FERREIRA, 2008).

Considerando então a importância das infecções maláricas submicroscópicas e a vulnerabilidade de populações de assentamento agrícola a esta doença, torna-se necessário conhecer a real prevalência de malária nestas populações, como é o caso do assentamento de Rio Pardo, Amazonas, onde nosso grupo de pesquisa tem conduzido um estudo epidemiológico de base populacional (KANO *et al.*, 2012, 2016).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Determinar a prevalência de infecções maláricas (microscópicas e submicroscópicas) durante períodos de alta e baixa transmissão da doença em uma comunidade da Amazônia brasileira com histórico de longa exposição à doença.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

1. Diagnosticar retrospectivamente (2008-2017) as infecções maláricas em moradores do assentamento agrícola de Rio Pardo, Amazonas, utilizando protocolo de PCR em tempo real espécie-específico baseado na região ribossomal (18S rRNA) dos plasmódios;
2. Diagnosticar retrospectivamente, na mesma comunidade, as infecções maláricas utilizando protocolo de PCR em tempo real baseado em alvos multicópias não ribossomais de *P. vivax* (Pvr47) e *P. falciparum* (Pfr364);
3. Determinar se a utilização simultânea de alvos ribossomais e não ribossomais aumenta a chance de detecção de infecções submicroscópicas.
4. Determinar fatores demográficos e epidemiológicos que influenciam na prevalência de malária microscópica e submicroscópica na comunidade de Rio Pardo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. População de estudo**

O estudo foi realizado no assentamento agrícola de Rio Pardo (1°46'S, 1°54'S, 60°22'O, 60°10'O), localizado no município de Presidente Figueiredo, no estado do Amazonas. Rio Pardo fica à aproximadamente 160 km de Manaus, capital do estado, com acesso pela rodovia BR-174, que liga os estados do Amazonas e Roraima. O assentamento foi criado em 1996, pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) e a população vive principalmente da agricultura de subsistência e pesca, atividades associadas com alto risco de exposição à doença (KANO *et al.*, 2012). Como em outras partes da Amazônia, a região não se caracteriza por estações climáticas bem definidas; assim, as estações são definidas como período de chuva e período de seca, que ocorrem de novembro a maio e junho a outubro, respectivamente. O serviço de saúde local é restrito, existindo apenas um posto de diagnóstico de malária, administrado pelo município, que fornece o diagnóstico e tratamento para os moradores da comunidade e comunidades vizinhas. Aproximadamente 120 famílias vivem em Rio Pardo, dividindo-se em áreas denominadas “ramais” e às margens do Igarapé (população ribeirinha).

A área do estudo é considerada entre hipo e mesoendêmica para malária, e, no início do estudo, apresentava um índice parasitológico anual de 127 casos por 1000 habitantes, com, aproximadamente 80% dos casos de malária sendo provocados por *P. vivax*. Na área de estudo a idade reflete o tempo de residência na região endêmica para malária, e, conseqüentemente, a exposição à doença (KANO *et al.*, 2012).

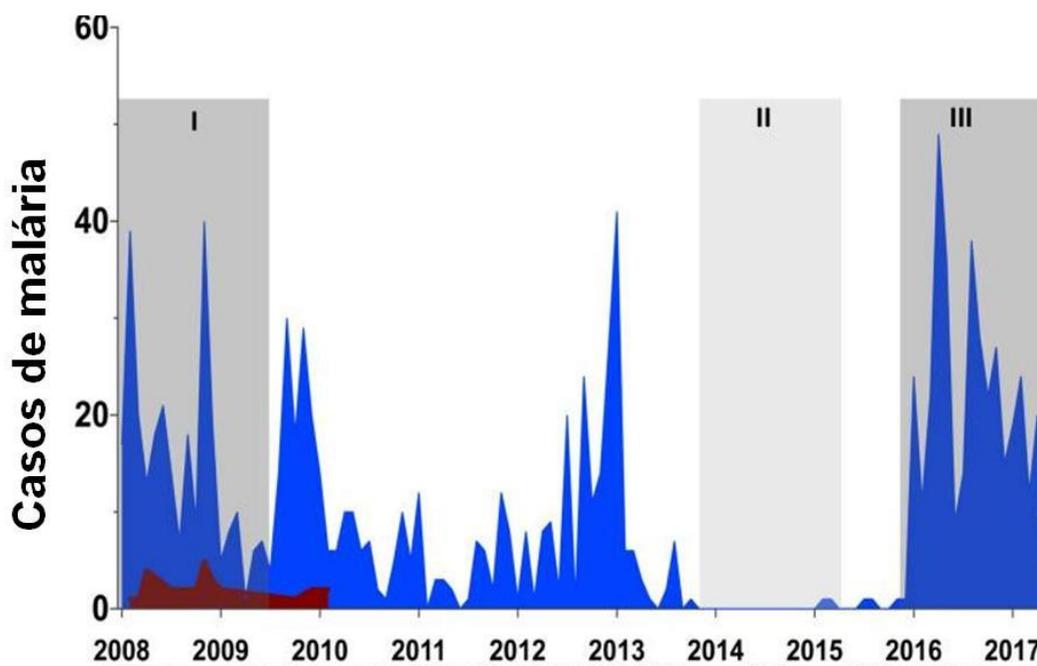
### **4.2. Cortes transversais e coleta de amostras**

De novembro de 2008 a agosto de 2017 foi realizado um estudo de base populacional na população de Rio Pardo pelo grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM) do IRR/FIOCRUZ-MG. Durante o estudo foram realizados seis cortes transversais onde os moradores da região que

aceitaram participar do estudo e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram submetidos à: (i) aplicação de questionário estruturado para obtenção de dados demográficos, epidemiológicos; (ii) coleta de sangue venoso (10mL em tubo com EDTA), e punção digital. No momento da coleta, o sangue foi processado para obtenção de DNA (Item 4.4.2).

No presente estudo, buscou-se utilizar uma amostra representativa da população de estudo, que correspondeu a cerca de 100 indivíduos por corte transversal, que foram pareados com a população original por idade e tempo de residência na área endêmica (em Rio Pardo e/ou Região Amazônica). Assim, um total de 689 amostras, provenientes de 262 indivíduos e coletadas durante os seis cortes transversais, foram analisadas ao longo do estudo. Em função do número de casos de malária oficialmente notificados na área de estudo, os cortes transversais foram divididos em três períodos de acordo com os números de casos de malária notificados na área no momento da coleta (PIRES *et al.*, 2018) (Figura 4): Período I (Alta transmissão) – compreende os três primeiros cortes transversais realizados em novembro de 2008 (n=139), junho de 2009 (n=133) e novembro de 2009 (n=135); Período II (Baixa transmissão) – que compreende os cortes 4 e 5, realizados em agosto de 2014 (n=89) e julho de 2015 (n=94), respectivamente; e, por fim, o Período III (Alta transmissão) – representado pelo sexto corte transversal, realizado em julho de 2017 (n=99).

Os aspectos éticos deste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do IRR/Fiocruz-Minas (protocolos nº 07/2006, nº 07/2009, nº 12/2010, nº 26/2013, Nº 1.821.955/2016, CAAE 50522115.7.0000.5091), de acordo com as resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS-196/96 e CNS-466/2012) sendo que todas as amostras se encontram adequadamente estocadas no Biorrepositório do Grupo de Biologia Molecular e Imunologia da Malária.



**Figura 4:** Número de casos de malária notificados no assentamento agrícola de Rio Pardo entre os anos de 2008 e 2017. Os casos foram definidos pela positividade no exame parasitológico de microscopia, sendo que infecções causadas por *P. vivax* estão marcadas em azul e em vermelho as infecções causadas por *P. falciparum*. Os quadros cinzas representam os três períodos do estudo atual, classificados de acordo com a prevalência de malária notificados na região de Rio Pardo. Fonte: (Adaptado de PIRES *et al.*, 2018)

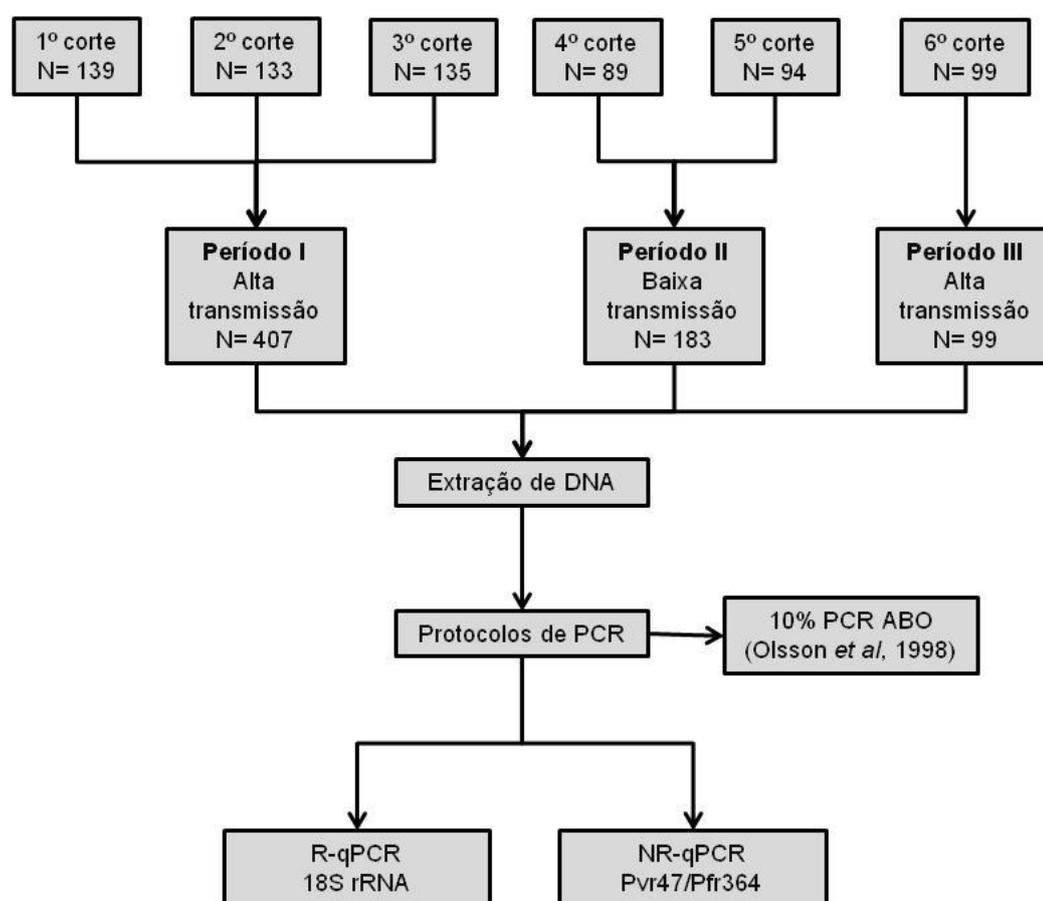
#### 4.3. Diagnóstico de malária por microscopia óptica

No momento da coleta de sangue, todos os indivíduos do estudo foram submetidos à punção digital para obtenção de sangue necessário para o diagnóstico microscópico, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (SVS, 2009). Resumidamente, o diagnóstico parasitológico foi realizado pelo exame de gota espessa corada pelo Giemsa que foram confeccionadas e examinadas por microscopistas experientes responsáveis pelo posto de diagnóstico na região. Os resultados foram expressos como negativo ou positivo, sendo adotado, para as amostras positivas, o método de avaliação semi-quantitativo em cruces. Todos os casos positivos foram tratados imediatamente nos serviços de saúde locais, de acordo com o recomendado pelo Ministério da Saúde (SVS, 2010).

#### 4.4. Ensaios moleculares

A Figura 5 ilustra o fluxograma utilizado para analisar as amostras do estudo por PCR. Resumidamente, aproximadamente 10% das amostras de DNA foram

analisadas utilizando um ensaio que tem como alvo um gene controle do hospedeiro vertebrado (Sistema ABO, item 4.2) para garantir o controle e confiabilidade do processo de extração. Posteriormente as amostras de cada período do estudo (de acordo com o especificado no item 4.2) foram processadas utilizando protocolos de qPCR que tem como alvo as regiões *18S rRNA* (R-qPCR) e *Pvr47/Pfr364* (NR-qPCR) presentes no genoma de *Plasmodium*.



**Figura 5:** Fluxograma do desenho experimental utilizado para o processamento das amostras pertencentes à população de estudo do assentamento agrícola de Rio Pardo.

#### 4.4.1. Painel de controles

Todos os ensaios de PCR foram realizados utilizando amostras controle devidamente caracterizadas e armazenadas no Biorrepositório de amostras biológicas do grupo de pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM, IRR, Fiocruz-MG). Como controles negativos, foram utilizadas 30 amostras, provenientes de indivíduos saudáveis que moram em área livre de transmissão da

doença e sem histórico de viagem para área endêmica. Como controles positivos foram utilizados (i) DNA de indivíduos infectados por *P. vivax*, diagnosticados por microscopia óptica em Porto Velho (RO) e com resultado confirmado utilizando protocolos moleculares; (ii) DNA de *P. falciparum*, da cepa 3D7, extraído a partir de cultivo contínuo estabelecido no laboratório, conforme protocolo previamente descrito (TRAGER; JENSEN, 1976).

#### 4.4.2. Extração de DNA

A extração do DNA a partir de amostras de sangue total coletadas em tubos de EDTA foi realizada utilizando o kit comercial Gentra Puregene Blood core kit C (PUREGENE, Gentra Systems, Minneapolis, USA) seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, foi adicionado 1mL de sangue em um tubo contendo 3mL de tampão de lise de hemácias, essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugada à 3500rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado de células ressuspendido no líquido residual. Em seguida, 1mL de tampão de lise celular foi adicionado e homogeneizado com a amostra. Posteriormente, 330µL de solução de precipitação de proteínas foram adicionados às células lisadas, homogeneizadas por vórtex e então, centrifugadas à 3500rpm por dez minutos. O precipitado de proteínas foi descartado enquanto o sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorff de 1,5mL contendo 1mL de isopropanol puro gelado. A amostra é homogeneizada por inversão, aproximadamente 50 vezes, e centrifugada à 3500rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado, mantendo o precipitado de DNA, e 1mL de etanol 70% (SIGMA) foi adicionado. A amostra foi, novamente, homogeneizada por inversão a fim de lavar o precipitado de DNA, e centrifugada à 3500rpm por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi incubado a temperatura ambiente por 15 minutos, com a tampa aberta, para que o etanol evaporasse. Posteriormente, foram adicionados 330µL de água para biologia molecular à amostra, que foi incubada a 65°C durante uma hora seguida de uma incubação a temperatura ambiente *overnight*. Após o processo as amostras foram refrigeradas à -20°C até o momento do uso.

#### 4.4.3. Amplificação do sistema do grupo sanguíneo ABO

Com o objetivo de determinar a eficácia da extração de DNA das amostras foi realizado um protocolo para amplificação de um fragmento do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO humano para determinar a presença de DNA do hospedeiro em, aproximadamente, 10% das amostras do estudo. O protocolo utilizado foi adaptado para realização através de PCR em tempo real (Dissertação de Mestrado; ROBORTELLA, 2016) utilizando os iniciadores originalmente descritos por OLSSON e colaboradores, 1998 (Tabela 1) e se ligam a uma região de 419 pb presentes no éxon 7 no gene ABO.

Resumidamente, nesta reação são utilizados 500nM de cada iniciador, 1uL de DNA, 5uL de Sybr Green MasterMix (Applied Biosystems) . Todas as reações foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da plataforma de PCR em tempo real do IRR, seguindo as condições de amplificação descritos na Tabela 2.

TABELA 1

Sequências dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real para amplificação do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO

Alvo	Iniciador/Sonda	Sequência
Sistema ABO	<i>Foward</i>	5'GCTGGAGGTGCGCGCTAC3'
	<i>Reverse</i>	5'TACTTGTTTCAGGTGGCTCT CGTC3'

TABELA 2

Condições de amplificação da PCR em tempo real para amplificação dos genes do sistema ABO

Alvo	Etapa	Ciclos	Temperatura	Tempo
Sistema ABO	Amplificação	1 ciclo	95°C	5'
		40 ciclos	95 °C	30''
			68 °C	30''
			72 °C	1'
	Dissociação	1 ciclo	95 °C	15''
			60 °C	20''
			95 °C	15''

#### 4.4.4. Diagnóstico de malária por PCR

##### 4.4.4.1. PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (R-qPCR) dos plasmódios humanos

O processamento das amostras através de PCR específica para a região 18s rRNA dos plasmódios foi realizada utilizando protocolo descrito originalmente por ROUGEMONT *et al.*, (2004) com modificações realizadas por ROBORTELLA, (2016). Neste ensaio, capaz de detectar diferencialmente o DNA de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* foram utilizados 200nM de cada iniciador (plasmo1/plasmo2) que se ligam em uma região conservada entre as diferentes espécies de *Plasmodium*, 80nM da sonda espécie-específica marcada com fluoróforo (*vivprobe*, *falciprobe*, *malaprobe*), 6,25µL de Taqman universal mastermix 2x (Applied Biosystems) e 2µL de DNA distribuídos em um volume final de 12,5µL por reação (Tabela 3).

Todas as reações foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, software versão 2.0.5) da plataforma de PCR em tempo real do IRR, seguindo as condições de amplificação descritos na tabela 4.

TABELA 3

Sequências dos iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (R-qPCR)

Alvo	Iniciador/Sonda	Sequência
18S rRNA de <i>Plasmodium</i>	Plasmo1-F	5' GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAG 3'
	Plasmo2-R	5' AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA 3'
<i>P. vivax</i>	<i>vivprobe</i>	5'VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAA GAGAAAATTCT-MGBNFQ3'
<i>P. falciparum</i>	<i>falprobe</i>	5'FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAA GATGACT-MGBNFQ3'
<i>P. malariae</i>	<i>malprobe</i>	5'-FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT- MGBNFQ3'

TABELA 4

Condições de amplificação da PCR em tempo real para amplificação do gene 18S rRNA (R-qPCR)

Alvo	Ciclos	Temperatura	Tempo
18S rRNA	1 ciclo	50°C	2'
		95 °C	10'
	45 ciclos	95 °C	15"
		60 °C	1'

#### 4.4.4.2. PCR em tempo real para amplificação de regiões não ribossomais de *P. vivax* (Pvr47) e *P. falciparum* (Pfr364) (NR-qPCR)

As amostras de DNA foram avaliadas utilizando o ensaio de PCR em tempo real padronizado pelo nosso grupo de pesquisa e que tem como alvo regiões subteloméricas do genoma do parasito (Tese de Doutorado; AMARAL, 2019). Neste protocolo são utilizados dois pares de iniciadores e sondas que se ligam de forma específica às regiões Pvr47D e Pfr364 de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (TABELA 5). De acordo com o padronizado anteriormente, foram utilizados, para *P. vivax*: 50 nM do iniciador *forward* e 900 nM do iniciador *reverse*, 250 nM de sonda MGB marcada com HEX (Eurofins), 5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) e 2µL de DNA, em um total de 10 µL por reação. Para *P. falciparum* foram utilizados: 900 nM do iniciador *forward* e 300 nM do iniciador *reverse*, 150 nM da sonda MGB marcada com FAM, 5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) e 2 µL de DNA, em um total de 10 µL por reação.

A reação foi realizada utilizando o equipamento *Via7 Real-Time PCR System* (96-well) presente na Plataforma de PCR em tempo real do Instituto René Rachou utilizando o programa descrito originalmente (TABELA 6) (Tese de Doutorado; AMARAL, 2019). Os resultados foram analisados utilizando o programa *QuantStudio™ Real Time PCR Software*.

TABELA 5

Sequências dos iniciadores e sondas utilizados na PCR em tempo real para amplificação das regiões Pvr47/Pfr364 (NR-qPCR)

Alvo	Iniciador/Sonda*	Sequência
<i>P. vivax</i>	Pvr47D-F	5' TCCGCAGCTCACAAATGTTC 3'
	Pvr47D-R	5' ACATGGGGATTCTAAGCCAATTTA 3'
	Pvr47D Sonda	5' TCCGCGAGGGGCTGCAA 3' (Sonda MGB; Marcação VIC)
<i>P. falciparum</i>	Pfr364D-F	5' ACTCGCAATAACGCTGCAT 3'
	Pfr364D-R	5' TTCCCTGCCCAAAAACGG 3'
	Pfr364D Sonda	5' GGTGCCGGGGGTTTCTACGC 3' (Sonda MGB; Marcação FAM)

TABELA 6

Condições de amplificação da PCR em tempo real para amplificação das regiões Pvr47/Pfr364 (NR-qPCR)

Alvo	Ciclos	Temperatura	Tempo
Pvr47/Pfr364	1 ciclo	50 °C	2'
		95 °C	10'
	40 ciclos	95 °C	15"
		52 °C	1'
		60 °C	1'

#### 4.5. Análise dos Dados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* 5.00.288 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das variáveis analisadas. Os indivíduos no estudo foram classificados em três grupos de acordo com o resultado através dos diferentes métodos de diagnóstico (Malária submicroscópica – resultado positivo em um ou mais protocolos moleculares e negativo através da microscopia óptica; Malária microscópica – resultado positivo através da microscopia óptica; Não infectados – resultado negativo através da microscopia óptica e dos protocolos moleculares).

Para comparar diferentes proporções foram utilizadas as estatísticas não paramétricas de Qui-quadrado ( $X_2$ ) ou Teste Exato de Fisher, conforme apropriado. Neste caso foi comparada a diferença entre as frequências de infecções submicroscópicas na população estudada utilizando diferentes métodos de diagnóstico e a diferença na prevalência de malária em diferentes subgrupos da população estudada. Para determinar a concordância entre os diferentes protocolos de qPCR utilizados para o diagnóstico das infecções maláricas foi utilizado o coeficiente Kappa. A classificação do valor do coeficiente Kappa será avaliada de acordo com o proposto por LANDIS e KOCH (1977), no qual um valor abaixo de 0 entende-se que não existe concordância, entre 0 e 0,2 existe concordância mínima, 0,21 e 0,4 uma concordância razoável, 0,41 e 0,60 existe concordância moderada, 0,61 e 0,8 concordância substancial, e, por fim considera-se que valores de coeficiente kappa entre 0,81 e 1 possuem concordância perfeita. Para avaliar a diferença entre as medianas de idade, tempo de residência no assentamento e na região amazônica foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn, respectivamente. As análises de sensibilidade e especificidade foram realizadas de acordo com o descrito por Hofmann *et al.*, (2018); considerando que os dois protocolos moleculares utilizados no trabalho já foram submetidos a etapas de padronização e validação (com amostras de indivíduos de área endêmica com malária clínica e subclínica) (ROUGEMONT *et al.*, 2004; AMARAL *et al.*, 2019 - Anexo I) optou-se então considerar como padrão de referência o resultado obtido pela combinação do diagnóstico realizado por qualquer protocolo de PCR.

## 5. RESULTADOS

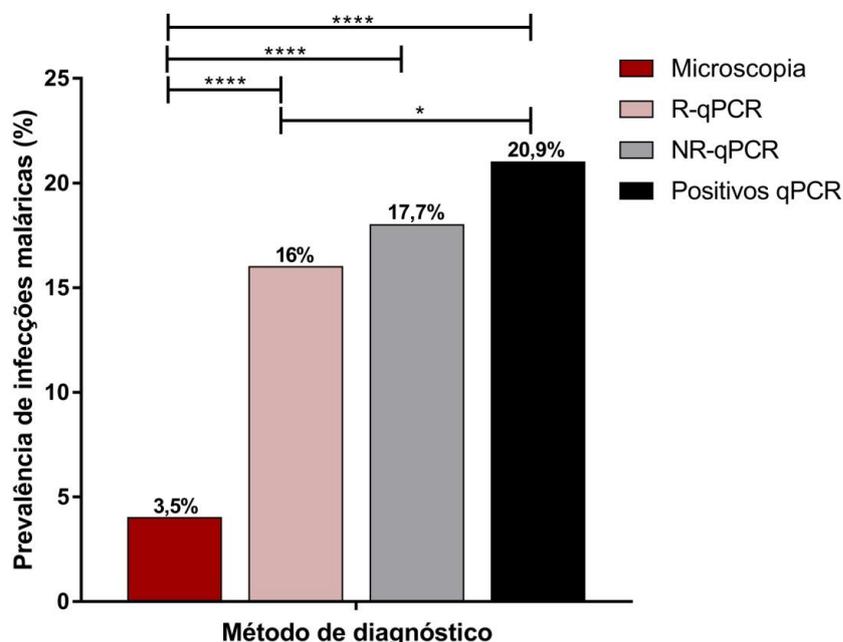
Parte dos resultados aqui apresentados foram incluídos na publicação intitulada “*Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections*” (Anexo I).

### 5.1. Infecções maláricas na área de estudo caracterizadas segundo o método de diagnóstico

Com o objetivo inicial de aumentar as chances de se detectar infecções submicroscópicas por *P. vivax* e *P. falciparum*, espécies predominantes na área de estudo, as amostras aqui estudadas foram submetidas a dois protocolos de PCR em tempo real (qPCR) baseados em alvos ribossomais (R-qPCR) e não ribossomais (NR-qPCR) destas espécies de plasmódios. No total, foram avaliadas 689 amostras coletadas ao longo dos múltiplos cortes transversais do estudo (Figura 5).

Do total de amostras analisadas, 24 (3,5%) foram positivas através do exame de gota espessa corada com Giemsa, considerado método de referência no diagnóstico de malária. Dentre estas, 17 amostras foram confirmadas pelo R-qPCR e 22 pelo NR-qPCR (dados não mostrados). No total, o protocolo baseado em alvos ribossomais detectou 111 (16%) amostras positivas para malária. Já o NR-qPCR foi capaz de detectar 122 (17,7%) amostras positivas. Considerando como positivas as amostras que apresentaram amplificação em qualquer protocolo de qPCR, independente do alvo, a prevalência de malária foi 20,9% (n=144). Assim, a prevalência de malária encontrada por cada um dos protocolos moleculares utilizados apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação à prevalência encontrada pela microscopia óptica ( $p < 0,0001$ ). Em conjunto, a utilização de protocolos moleculares aumentou em, aproximadamente, seis vezes a prevalência de malária encontrada na população, em comparação com o método parasitológico. Embora não houve diferença significativa entre os protocolos ribossomal e não ribossomal (Teste Exato de Fisher –  $p = 0,4724$ ) foi possível observar uma tendência em aumentar a positividade em função do método de

diagnóstico (Microscopia<R-qPCR<NR-qPCR<Positivos qPCR) (Qui-quadrado de tendência= 80,34;  $p<0,0001$ ).

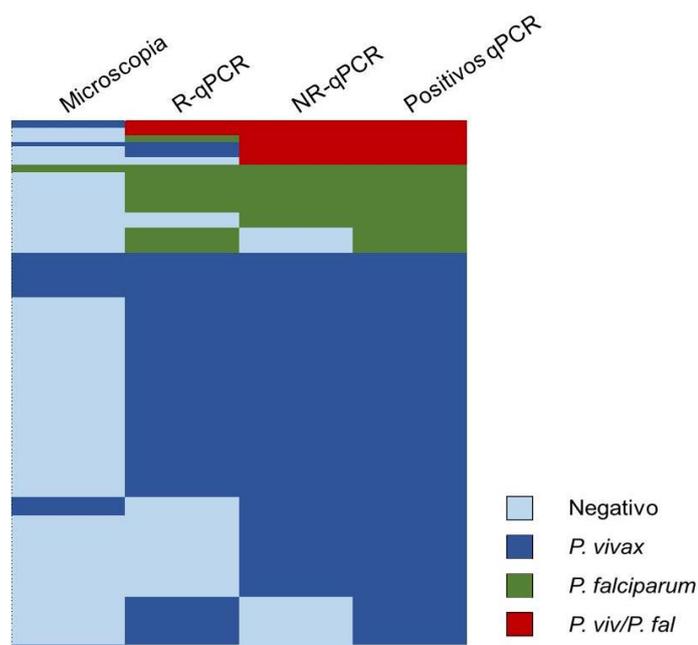


**Figura 6:** Prevalência de infecções maláricas nas amostras do estudo de acordo com o método de diagnóstico. O gráfico demonstra a frequência relativa de indivíduos positivos pela microscopia óptica (vermelho), protocolo ribossomal (R-qPCR – em rosa), protocolo não ribossomal (NR-qPCR – em cinza) e a positividade total pelos protocolos moleculares (positivos qPCR – preto). Diferenças nas proporções foram avaliadas pelo Teste exato de Fisher e considerado nível de significância de  $p<0,05$ . Quatro asteriscos (\*\*\*\*) representam valores de  $p<0,0001$ ; um asterisco (\*), valor de  $p=0,0119$ . O teste qui-quadrado de tendência mostrou uma tendência de aumento do número de positivos de acordo com o método de diagnóstico ( $\chi^2$ : 80,34 ;  $p=0,0001$ ).

Dentre as amostras positivas para malária avaliadas no estudo, a maior parte, independente do método de diagnóstico foi positiva para *P. vivax*, seguida de infecções por *P. falciparum* e coinfeções entre as duas espécies (Figura 7). Apenas duas amostras (1,3%) foram positivas para *P. malariae* (Dados não mostrados). Desta forma, 106 (74%) amostras foram positivas para *P. vivax*, 24 (16,7%) para *P. falciparum* e 12 (8,3%) positivas para ambas as espécies. Nas amostras estudadas, os resultados demonstraram ainda que a microscopia não permitiu identificar nenhuma das infecções mistas detectadas pelos protocolos moleculares (Figura 7).

A avaliação da concordância, em nível de espécie, entre os protocolos de qPCR utilizados no trabalho foi realizada através do teste de Coeficiente de Concordância Kappa. Considerando que o protocolo não ribossomal só apresenta sondas específicas para *P. vivax* e *P. falciparum* e que a prevalência de *P. malariae* foi baixa na população estudada, optou-se por excluir as amostras positivas para

este parasito destas análises. Desta forma, o teste Kappa demonstrou uma concordância substancial entre os dois protocolos moleculares (0,7) e entre a R-qPCR e o total de positivos na qPCR (0,8). Já a concordância entre o protocolo NR-qPCR e qPCR foi considerada quase perfeita (0,9).



**Figura 7:** Mapa representando a positividade por *P. vivax*, *P. falciparum* e infecções mistas (*Pv/Pf*) para cada método de diagnóstico. Cada linha no mapa representa uma amostra, sendo os resultados negativos representados em azul claro, as infecções por *P. vivax* em azul escuro, por *P. falciparum* em verde, e as coinfeções por ambas as espécies em vermelho. As colunas representam os métodos de diagnósticos empregados, incluindo a microscopia óptica, R-qPCR, NR-qPCR; a positividade por qualquer protocolo molecular foi representada na coluna à direita (positivos qPCR).

A sensibilidade dos métodos de diagnóstico empregados no trabalho variou significativamente na detecção das diferentes espécies de *Plasmodium* (Tabela 7). No geral, a microscopia óptica apresentou uma sensibilidade de aproximadamente 15,5%, enquanto os protocolos moleculares, R-qPCR e NR-qPCR, apresentaram sensibilidade de 76,8% e 85,9%, respectivamente. A sensibilidade dos métodos variou de forma mais significativa na detecção de coinfeções entre *P. vivax* e *P. falciparum*. Realmente, enquanto o protocolo baseado em alvos não ribossomais apresentou uma sensibilidade de 100% na detecção destas infecções, a R-qPCR apresentou uma sensibilidade de apenas 33,3%. Em relação às infecções por *P. falciparum*, a sensibilidade da técnica de gota espessa foi de 5,6% e os protocolos moleculares variaram de 72,2% (R-qPCR) a 80,6% (NR-qPCR).

TABELA 7  
Sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico utilizados, na identificação de infecções maláricas, em nível de gênero e espécie de *Plasmodium*

	Protocolo	Verdadeiro Positivo*	Falso Positivo	Verdadeiro Negativo	Falso Negativo	Sensibilidade	Especificidade
<b>Malária</b>	Microscopia óptica	22	2**	545	120	15,5% (10-22)	99,6% (99-100)
	R-qPCR	109	0	547	33	76,7% (69-83)	100% (99-100)
	NR-qPCR	122	0	547	20	85,9% (79-91)	100% (99-100)
<b>Coinfecções</b>	Microscopia óptica	0	0	677	12	0% (0-24)	100% (99-100)
	R-qPCR	4	0	677	8	33,3% (14-61)	100% (99-100)
	NR-qPCR	12	0	677	0	100% (76-100)	100% (99-100)
<b><i>P. vivax</i></b>	Microscopia óptica	20	2**	569	98	16,9% (11-24)	99,7% (99-100)
	R-qPCR	87	0	571	31	73,7% (65-81)	100% (99-100)
	NR-qPCR	105	0	571	13	88,9% (82-93)	100% (99-100)
<b><i>P. falciparum</i></b>	Microscopia óptica	2	0	653	34	5,6% (1-18)	100% (99-100)
	R-qPCR	26	0	653	10	72,2% (56-84)	100% (99-100)
	NR-qPCR	29	0	653	7	80,6% (65-90)	100% (99-100)

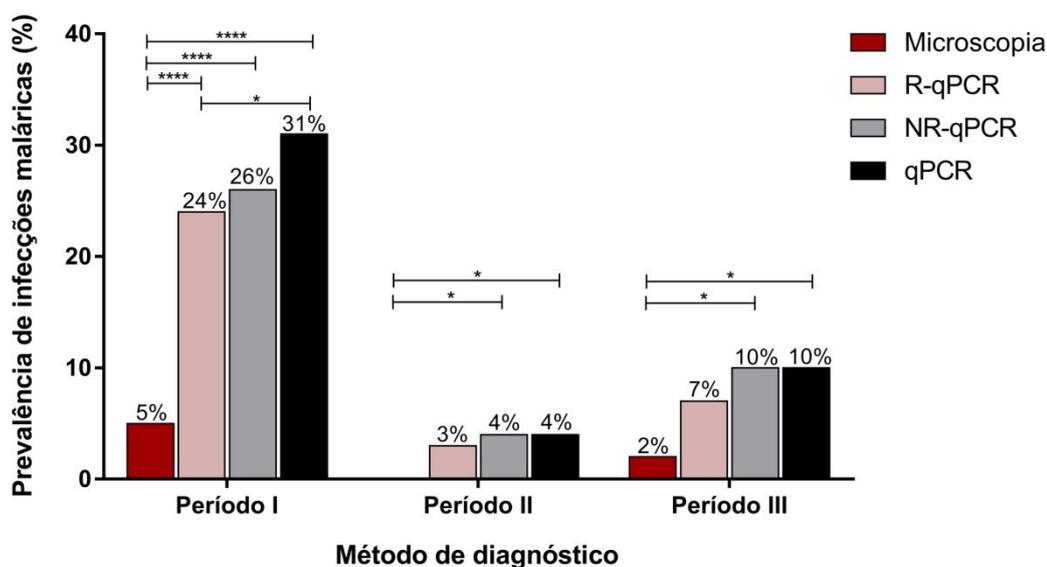
\* - Caracterizados de acordo com a positividade em pelo menos um protocolo molecular, conforme descrito por Hofmann, *et al.*, 2018;

\*\* - Falso positivo no sentido de que nenhum outro protocolo detectou a infecção.

## **5.2. Prevalência de malária microscópica e submicroscópica na área de estudo em função da flutuação do número de casos registrados**

A flutuação dos níveis de transmissão de malária no assentamento agrícola de Rio Pardo durante o estudo permitiu analisar a relação da intensidade da transmissão na área com a prevalência de infecções submicroscópicas diagnosticadas através dos protocolos moleculares (Figura 8). Durante o período I, considerado de alta transmissão pelo grande número de casos notificados na região, houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência de malária diagnosticada por microscopia e pelos protocolos moleculares, independente do alvo plasmidial amplificado ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença entre os alvos ribossomal e não ribossomal, entretanto o número de infecções maláricas diagnosticadas usando os dois protocolos foi significativamente maior quando comparado aos casos detectados pelo protocolo R-qPCR ( $p = 0,0414$ ). Dentre as amostras referentes a este período ( $n = 407$ ), a prevalência de malária detectada através da microscopia foi de 5% ( $n = 22$ ) enquanto o uso dos protocolos moleculares detectou, em conjunto, 31% ( $n = 126$ ) de infecções maláricas. Desta forma, o número de infecções maláricas detectadas através dos protocolos moleculares foi, aproximadamente, seis vezes maior em relação à microscopia.

Durante o período II, considerado de baixa transmissão e no qual todas as amostras ( $n = 183$ ) foram consideradas negativas pela gota espessa, os protocolos moleculares foram capazes de detectar uma prevalência de malária de aproximadamente 4% ( $n = 8$ ) (Figura 8). No período III, considerado de retorno da alta transmissão na área (baseado na positividade da microscopia), o número de casos foi maior que no período II, mas inferior ao período I. Especificamente, enquanto o exame de gota espessa detectou 2% ( $n = 2$ ) de amostras positivas, os protocolos moleculares identificaram 10% ( $n = 10$ ) de infecções maláricas. O que correspondeu a um aumento de cinco vezes em relação à microscopia. Este aumento correspondeu ao protocolo não ribossomal, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativamente entre R-qPCR e microscopia.



**Figura 8:** Prevalência de malária na população de Rio Pardo por período do estudo. Os períodos de transmissão (I, II e III) foram descritos como descrito na legenda da figura 4. O gráfico ilustra a prevalência de infecções maláricas diagnosticadas pela microscopia (em vermelho) e por protocolos moleculares (R-qPCR em rosa e NR-qPCR em cinza), sendo em preto, a positividade total de infecções submicroscópicas. Diferença entre as proporções foi analisada através do teste exato de Fisher considerando  $p < 0,05$ ; um asterisco (\*) representa valor de  $p < 0,05$ ; quatro asteriscos (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Apesar de o número de infecções submicroscópicas ter flutuado entre os períodos estudados, os resultados demonstraram que a proporção de infecções microscópicas *versus* submicroscópicas se manteve, praticamente, estável ao longo do estudo. De fato, as infecções submicroscópicas variam de 80% (Período III) a 100% (Período II) ao longo do estudo.

### 5.3. Influência de fatores demográficos e epidemiológicos na prevalência de malária microscópica e submicroscópica na população estudada

Com o objetivo de determinar os fatores demográficos e epidemiológicos que influenciaram na positividade de malária microscópica e submicroscópica nos períodos estudados, os indivíduos no estudo foram estratificados em função de idade, gênero, tempo de residência em área endêmica e local de moradia (ribeirinhos e não ribeirinhos). A baixa prevalência de malária encontrada nos períodos II e III impossibilitou que as análises pudessem ser realizadas por cada período do estudo. Desta forma, os dados de positividade foram analisados em

conjunto (independente do período), considerando as informações individuais obtidas no momento de cada coleta, o que resultou em um total de 665 amostras coletadas de 262 indivíduos.

Como mostrado na tabela 8, não houve diferença significativa na proporção de homens e mulheres entre os grupos de indivíduos com malária microscópica, submicroscópica e o grupo de indivíduos sem parasitos circulantes no momento da coleta (negativo pela microscopia e PCR). Os indivíduos positivos para malária (microscópica ou submicroscópica) apresentavam uma mediana de idade significativamente menor em comparação aos indivíduos que não apresentavam parasitos circulantes ( $p < 0,0001$ ). De forma interessante, também houve diferença entre os grupos de indivíduos positivos com infecções microscópicas e submicroscópicas ( $p = 0,0395$ ).

Em relação ao tempo de exposição à malária – avaliada aqui pelo tempo de residência no assentamento e de residência na região amazônica – houve diferença significativa entre os grupos de positivos e negativos. Enquanto a mediana do tempo de residência no assentamento agrícola foi de 13 anos para os indivíduos considerados negativos, os indivíduos positivos para infecções maláricas microscópicas e submicroscópicas foi de 8 e 11 anos, respectivamente. Um resultado similar foi encontrado comparando as medianas do tempo de residência na região amazônica entre os grupos de indivíduos positivos na microscopia (23,5 anos), com infecções submicroscópicas (34 anos) e negativos para infecções maláricas (42 anos) (Tabela 8).

TABELA 8

Dados demográficos e epidemiológicos da população estudada estratificados de acordo com a positividade de malária microscópica e submicroscópica

Variável	Infecções microscópicas	Infecções submicroscópicas	Não infectados*
Gênero**	1,22:1	1,97:1	1,35:1
Mediana de idade em anos (IQR)	22 (12-39) <sup>a</sup>	40 (22-51) <sup>b</sup>	46 (37-56) <sup>c</sup>
Mediana dos anos de residência em Rio Pardo (IQR)	8 (5-9) <sup>d</sup>	11 (8-15) <sup>e</sup>	13 (9-17) <sup>f</sup>
Mediana dos anos de residência na região amazônica (IQR)	23,5 (13-46) <sup>g</sup>	34 (20-48,5) <sup>h</sup>	42 (29-54) <sup>i</sup>

\* Caracterizados pela ausência de parasitos circulantes no momento da coleta de sangue (negativos pela microscopia e protocolos moleculares).

\*\* Razão entre homens e mulheres na população de Rio Pardo

As diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas como a seguir:

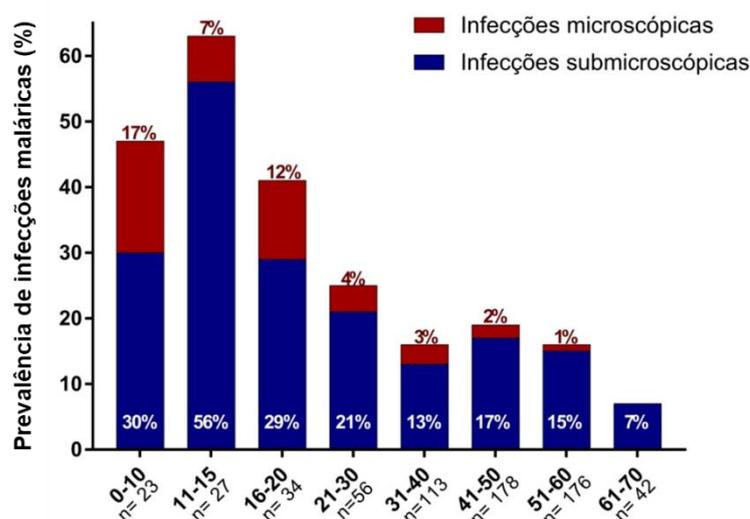
<sup>a,c</sup> / <sup>b,c</sup>: (p<0,0001); <sup>a,b</sup>: (p=0,0395).

<sup>d,f</sup>: (p=0,0005); <sup>e,f</sup>: (p=0,0102)

<sup>g,i</sup>: (p=0,0006); <sup>h,i</sup>: (p=0,0053)

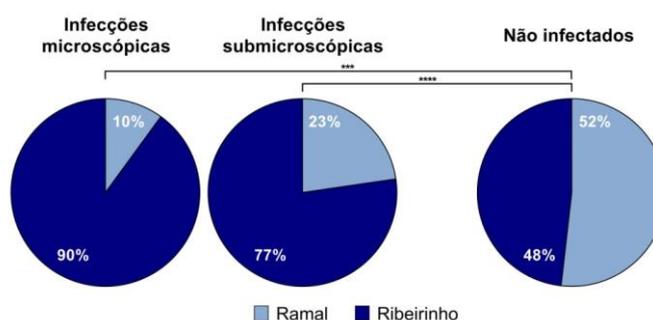
IQR = Intervalo interquartil

A estratificação dos indivíduos positivos para infecções microscópicas e submicroscópicas de acordo com a faixa etária permitiu identificar que, embora ambos os grupos apresentem uma tendência à diminuição do número de casos com o aumento da idade (p<0,0001), a positividade pela microscopia óptica foi mais frequente em crianças, adolescentes e adultos jovens (Figura 9). Por outro lado, as infecções submicroscópicas foram mais frequentes nos indivíduos adultos. Assim, a razão entre as infecções submicroscópicas e microscópicas entre crianças (0 a 10 anos) foi de cerca de 2:1, enquanto entre indivíduos acima dos 30 anos de idade foi de 9:1.



**Figura 9:** Prevalência de malária na população de Rio Pardo por faixa etária. O gráfico demonstra a prevalência de infecções maláricas microscópicas (em vermelho) e submicroscópicas (em azul) na população de estudo estratificada por faixa etária. A análise de tendência foi realizada através do teste qui-quadrado de tendência considerando como significativo  $p < 0,05$ . Existe tendência à diminuição da prevalência de malária em função do aumento da idade, tanto para infecções microscópicas ( $\chi^2$ : 23,8;  $p < 0,0001$ ), quanto para infecções submicroscópicas ( $\chi^2$ : 26,51;  $p < 0,0001$ )

O local de moradia dos indivíduos do estudo dentro do assentamento agrícola de Rio Pardo, isto é, moradores de ramal ou ribeirinhos, influenciou de forma significativa na prevalência de malária (Figura 10). Enquanto a população ribeirinha consistiu na maior parte dos indivíduos infectados (77% a 90%), os residentes dos ramais predominaram entre os indivíduos sem infecção malárica detectável (52% *versus* 48%). As diferenças entre os grupos infectados e não infectados foram estatisticamente significativas, seja nas infecções microscópicas ( $p = 0,0002$ ) quanto nas submicroscópicas ( $p < 0,0001$ ) (Figura 10).



**Figura 10:** Prevalência de malária na população de Rio Pardo por local de moradia. Os gráficos demonstram a frequência de moradores de ramal e de área ribeirinha entre os grupos de indivíduos com infecções maláricas microscópicas e submicroscópicas; Os indivíduos negativos para malária no momento da coleta foram considerados não infectados. A diferença entre as prevalências foi analisada através do Teste Exato de Fisher considerando  $p < 0,05$ . Três asteriscos (\*\*\*) -  $p = 0,0002$ ; Quatro asteriscos (\*\*\*\*) -  $p < 0,0001$ .

## 6. DISCUSSÃO

Tendo em vista a importância crescente das infecções maláricas submicroscópicas para o controle e eliminação da doença (SLATER *et al.*, 2019), este trabalho teve como objetivo determinar, retrospectivamente, a prevalência de malária, microscópica e submicroscópica, em uma população residente em assentamento agrícola na Amazônia brasileira. O desenho experimental incluiu múltiplos cortes transversais realizados em períodos de alta e baixa transmissão de malária. Para isto, foram utilizados dois protocolos de qPCR, baseados em diferentes alvos moleculares presentes no genoma dos plasmódios, buscando-se assim uma maior eficiência no diagnóstico de infecções com parasitemias abaixo do limite de detecção da microscopia.

### 6.1. Infecções maláricas na área de estudo caracterizadas segundo o método de diagnóstico

A determinação da prevalência de malária através da microscopia óptica convencional, baseada na técnica de gota espessa corada pelo Giemsa, foi amplamente utilizada no passado para entender a epidemiologia de transmissão local da malária e determinar estratégias de controle (OKELL *et al.*, 2012). Devido às limitações relacionadas à baixa sensibilidade desta técnica (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007), os protocolos moleculares, representados principalmente por técnicas de amplificação do DNA, como a PCR, se tornaram essenciais para determinar a prevalência de malária, principalmente em regiões em processo de eliminação da doença (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015).

Ainda que muitos protocolos de PCR tenham sido propostos para o diagnóstico diferencial de malária (Revisto por ROTH *et al.*, 2016), algumas limitações metodológicas inviabilizaram a determinação precisa dos limites de detecção de muitos destes protocolos. Dentre estas limitações, inclui-se o fato da maior parte das publicações ter estabelecido o limite de detecção dos ensaios a partir de parasitos de cultivo (no caso do *P. falciparum*), DNA plasmidial ou DNA de pacientes com parasitemias elevadas (detectadas pela microscopia óptica). Nestas

condições, a amplificação do DNA alvo do parasito é facilitada, o que pode levar a resultados não reprodutíveis com amostras de campo, como já descrito pelo nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2014). Assim, faz-se necessário a avaliação de novos protocolos moleculares em que os limites de detecção sejam baseados em amostras de campo com baixas parasitemias. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um novo ensaio de PCR em tempo real, baseado em alvos não ribossomais (NR-qPCR) do *P. vivax* e *P. falciparum*, que apresentou baixo limite de detecção quando avaliado através de curvas de titulação com DNA de amostras de campo (Tese de Doutorado; AMARAL, 2019). A alta sensibilidade do protocolo NR-qPCR anteriormente descrito constituiu uma oportunidade única para avaliar a prevalência de malária com baixas parasitemias na área do estudo em função de flutuação nos níveis de transmissão.

A maior parte das infecções maláricas identificadas no estudo (74%) foi causada pelo *P. vivax*, espécie predominante na Amazônia Brasileira. Também foram detectadas infecções por *P. falciparum* (17%) e, em menor número, infecções mistas por estas duas espécies de plasmódio (8%). Uma baixa prevalência de infecções por *P. malariae* (<1%) foi detectada nas amostras do estudo, sendo que estas amostras foram positivas apenas para os protocolos moleculares. A ausência de exames microscópicos positivos para o *P. malariae* já era esperada, uma vez que o diagnóstico de rotina (exame de gota espessa corado por Giemsa) não permite a correta identificação morfológica desta espécie (COLLINS; JEFFERY, 2007). Além disto, a sensibilidade dos protocolos atuais de PCR específicos para *P. malariae* apresentam baixa sensibilidade, pois apenas recentemente o genoma de uma amostra de campo do parasito foi sequenciado (RUTLEDGE *et al.*, 2017). Desta forma, a frequência de *P. malariae* na área do estudo pode estar sendo subestimada. Entretanto, isto parece pouco provável, uma vez que este parasito predomina em regiões da Amazônia onde o homem está muito próximo dos primatas não humanos (reservatórios), como é o caso de comunidades indígenas (LALREMRUATA *et al.*, 2015; MARCANO *et al.*, 2004; METZGER *et al.*, 2008).

No presente trabalho, a hipótese de estudo foi a de que o uso simultâneo de alvos ribossomais e não ribossomais aumentaria de forma significativa as chances de se detectar casos de infecção com baixas parasitemias por *P. falciparum* e/ou *P. vivax*. Entretanto, os resultados obtidos demonstraram que a prevalência de

infecções maláricas diagnosticadas por cada protocolo (R-qPCR ou NR-qPCR) foi similar. Apesar disso, foi possível observar que o protocolo NR-qPCR foi capaz de identificar, em geral, mais casos positivos do que o R-qPCR. De fato, a análise da sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico aqui empregados confirmou uma sensibilidade ligeiramente superior da NR-qPCR. Estes dados se aplicaram não apenas ao total do número de infecções maláricas detectadas, mas também na detecção diferencial das espécies de *Plasmodium*, já que o NR-qPCR foi sensível no diagnóstico de coinfeções. De forma interessante, apenas um terço das coinfeções por *P. vivax/P. falciparum* detectadas pela NR-qPCR foi detectada pela R-qPCR (4 de 12). Embora o número de infecções mistas foi baixa ao longo do estudo, estes resultados confirmam achados prévios, de titulação *in vitro*, que demonstraram que o NR-qPCR é mais indicada para detectar, simultaneamente, baixos níveis de *P. vivax/P. falciparum* (Tese de Doutorado - AMARAL, 2019; Anexo I).

A baixa eficácia da R-qPCR no diagnóstico de coinfeções por *P. vivax/P. falciparum* pode estar relacionada com o fenômeno de competição entre iniciadores, já que este protocolo utiliza um único par de iniciadores na detecção de ambas as espécies de plasmódio (ROUGEMONT *et al.*, 2004). Desta forma, o uso de protocolos moleculares com iniciadores espécie-específicos, como a NR-qPCR aqui utilizada, é recomendado em áreas onde existe o risco potencial de circulação de *P. vivax* e *P. falciparum*. Este é o caso de estados da Amazônia brasileira que fazem fronteiras com países endêmicos, como o estado de Roraima, onde o risco de reintrodução de casos de *P. falciparum* tem sido confirmado (GRILLET *et al.*, 2019). Nestas áreas, como é o caso da fronteira Brasil-Venezuela, a detecção precoce da doença é de extrema importância para que se evitem possíveis epidemias e mortes pelo *P. falciparum*, uma vez que esta espécie é mais patogênica.

Neste sentido, podemos inferir que em populações com baixa prevalência de malária, como diversas áreas da região amazônica, o uso de protocolos moleculares, particularmente mais sensíveis em coinfeções como a NR-qPCR, fazem-se necessários para as estratégias de vigilância e controle.

## 6.2. Infecções submicroscópicas na área de estudo

Revisões sistemáticas da literatura tem confirmado que o diagnóstico molecular pode aumentar consideravelmente as chances de se detectar malária com baixas parasitemias (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015; MOREIRA *et al.*, 2015). No presente estudo, a utilização de ferramentas moleculares permitiu a identificação de um número considerável de infecções submicroscópicas que correspondeu a cerca de 85% do total de infecções maláricas identificadas na área de estudo. Este resultado corrobora relatos na literatura a respeito da alta prevalência de infecções submicroscópicas em populações vivendo em áreas endêmicas para malária (HOFMANN *et al.*, 2018; ROUGEMONT *et al.*, 2004; SLATER *et al.*, 2019), incluindo na Amazônia brasileira (ALVES *et al.*, 2002; SUÁREZ-MUTIS *et al.*, 2007). No caso de *P. vivax*, espécie responsável pela maior parte dos casos de malária na área de estudo, as evidências apontam que as infecções submicroscópicas são ainda mais importantes em regiões com baixos índices de transmissão, como a região amazônica, do que em áreas hiperendêmicas para malária, como os países do sudeste asiático (BOUSEMA *et al.*, 2014). Embora as razões para esta distribuição de infecções submicroscópicas não sejam conhecidas, pode-se especular que estejam associadas com características únicas da biologia de *P. vivax*, incluindo a rápida aquisição de imunidade clínica, em comparação com *P. falciparum* (ADAMS; MUELLER, 2017) e as baixas parasitemias características desta espécie.

Neste trabalho, a proporção entre as infecções microscópicas e submicroscópicas não foi alterada, de forma significativa, pela flutuação na transmissão de malária, se mantendo estável ao longo dos períodos do estudo. Desta forma a prevalência das infecções detectadas apenas pelos protocolos moleculares variou de 80% a 100% do total de casos de malária detectados. Estes resultados reforçam a importância de se detectar as infecções com baixas parasitemias, particularmente em áreas onde a doença parece ter sido controlada, como foi o caso do assentamento agrícola de Rio Pardo.

Embora a contribuição real das infecções submicroscópicas para a transmissão de malária não esteja bem estabelecida, achados recentes reforçam que estas infecções têm que ser priorizadas pelos programas de controle. Em uma

revisão sistemática recente, os autores analisaram uma série de conjuntos de dados correspondendo a mais de 20 locais com ampla gama de intensidades de transmissão (SLATER *et al.*, 2019). Os resultados do estudo demonstraram que, embora as infecções submicroscópicas possam ser menos infecciosas que as infecções patentes, as mesmas podem funcionar como reservatório da doença, podendo ser duradouras e requerendo ferramentas de diagnóstico mais sensíveis para detectá-las. De fato, indivíduos com parasitemias submicroscópicas possuem gametócitos circulantes, forma infectante para o mosquito vetor, na corrente sanguínea, sendo potencialmente capazes de dar prosseguimento ao ciclo do parasito no mosquito vetor (GRUENBERG *et al.*, 2019; NGUITRAGOOL *et al.*, 2017). No Brasil, um estudo pioneiro já havia demonstrado que o sangue de indivíduos com infecções submicroscópicas era capaz de infectar *Anopheles darlingi*, principal vetor no país (ALVES *et al.*, 2005). Embora no presente trabalho nenhum método de detecção de gametócitos tenha sido utilizado, as evidências na literatura e a alta proporção de infecções submicroscópicas no estudo sugerem que tais infecções possam apresentar um importante papel na dinâmica de transmissão da malária no assentamento agrícola de Rio Pardo. De fato, no período de baixa transmissão de malária em Rio Pardo (período II), onde nenhum exame microscópico foi positivo (por busca ativa ou passiva), os dados encontrados confirmaram a circulação do parasito na população estudada, em níveis relativamente significativos (4% de prevalência). Em conjunto, estes dados reforçam que a identificação de casos submicroscópicos deve ser uma das prioridades das estratégias de vigilância e controle de malária na região. A alta frequência de infecções assintomáticas encontrada neste trabalho é relevante ainda, já que existem perspectivas de se tratar estas infecções (JAITEH *et al.*, 2019).

Ainda que a importância das infecções submicroscópicas tenha sido confirmada em diversas publicações (ALMEIDA *et al.*, 2018; KAURA *et al.*, 2019; ZIMMERMAN; HOWES, 2015), a implementação de protocolos moleculares no campo tem limitações devido, principalmente, ao alto custo e complexidade dos ensaios, requerendo laboratórios especializados. Neste sentido, publicações recentes vêm propondo métodos de adaptação de técnicas moleculares para condições de campo. Dentre elas destacam-se as plataformas *lab-on-chip*, que permitem a realização e análise de ensaios de amplificação do DNA através de

equipamentos portáteis independentes de rede de energia (CHIN; LINDER; SIA, 2007; MALPARTIDA-CARDENAS *et al.*, 2019; TAYLOR *et al.*, 2011, 2014), e também protocolos baseados na metodologia LAMP, que permitem visualizar o resultado através da análise de turbidez ou fluorescência, dispensando o uso de equipamentos de leitura (HSIANG; GREENHOUSE; ROSENTHAL, 2014). Entretanto, até o momento, nenhum dos métodos propostos apresenta sensibilidade similar às técnicas realizadas em laboratórios de referência. Neste sentido, a determinação de um ensaio com alta sensibilidade e especificidade, e que possa ser adaptado às plataformas “*point of care*” sem perda significativa na sensibilidade, é de grande importância para o correto diagnóstico de infecções submicroscópicas e um dos principais campos de pesquisa em malária.

### **6.3. Influência de fatores demográficos e epidemiológicos na prevalência de malária microscópica e submicroscópica na população de Rio Pardo**

A região amazônica apresenta uma distribuição heterogênea na incidência de malária, apresentando microrregiões com maiores ou menores taxas de infecção (SIQUEIRA *et al.*, 2016). Neste trabalho foram avaliados fatores que poderiam alterar a distribuição de infecções maláricas submicroscópicas na população de Rio Pardo, como idade, gênero, tempo de residência na comunidade e na região amazônica, bem como o local de moradia dentro da comunidade.

Na área estudada, a prevalência de malária (microscópica e submicroscópica) foi similar entre homens e mulheres. Este resultado já era esperado já que em Rio Pardo, a agricultura familiar é uma das principais atividades de trabalho, o que favorece a exposição semelhante entre homens e mulheres aos mosquitos vetores, como demonstrado anteriormente (KANO *et al.*, 2012). Por outro lado, o local de residência dentro da área estudada influenciou significativamente na prevalência de malária. Assim, a prevalência de infecções entre os indivíduos que moram próximos aos igarapés (ribeirinhos) foi três vezes maior em comparação aos indivíduos que residiam nos ramais (estradas não pavimentadas). Neste sentido, entende-se que a população ribeirinha está mais exposta ao risco de transmissão de malária devido à proximidade aos criadouros do mosquito vetor (KANO *et al.*, 2012; PIRES *et al.*,

2018). Em conjunto, estes resultados confirmam que o perfil epidemiológico da doença em áreas de assentamento agrícola é diferente daquele relacionado à doença ocupacional, como em regiões de garimpos e construção de estradas, onde a doença predomina em homens adultos (SOUZA *et al.*, 2019). Assim, para o sucesso dos programas de controle da doença, faz-se necessário levar em consideração as peculiaridades de transmissão de cada região específica (FERREIRA; CASTRO, 2016).

No presente estudo, foi possível confirmar que a prevalência da doença diminuiu com o aumento da idade. Assim, as parasitemias mais altas, isto é, detectadas pela microscopia óptica, predominaram em crianças e adolescentes. Estes resultados sugerem que, nesta população, a longa exposição à transmissão está levando a imunidade contra a doença, caracterizada aqui pela predominância de infecções submicroscópicas na idade adulta. Considerando que, nesta população, a idade do indivíduo corresponde ao tempo de residência na Amazônia (KANO *et al.*, 2012), a exposição à malária também pode ser avaliada pelo tempo de residência na região. Assim, os resultados aqui encontrados confirmaram uma associação positiva entre maiores parasitemias e menor tempo de residência na região. De interesse, o grupo de indivíduos considerados aqui como “não infectados” apresentou uma mediana de idade e de residência na Amazônia (e na área de estudo) superior aos demais grupos (Não infectados > Submicroscópicos > Microscópicos). Isto pode indicar que estes indivíduos apresentam uma imunidade adquirida capaz de manter os parasitos em densidades abaixo do limite de detecção nos ensaios de PCR aqui utilizados. Reforçando esta hipótese estão os achados recentes que sugerem que a maior parte das formas sanguíneas do *P. vivax* pode estar sequestrada em órgãos como a medula óssea e baço (OBALDIA *et al.*, 2018). Portanto, para confirmar esta hipótese, seria necessário utilizar protocolos de PCR ultrasensíveis, que requerem o processamento de grandes volumes de sangue (HOFMANN *et al.*, 2015) ou processamento mais complexo das amostras, incluindo processos de filtração do sangue para retirar o DNA do hospedeiro (HOFMANN *et al.*, 2018). Infelizmente, estes procedimentos estão fora do alcance dos objetivos aqui propostos.

Embora a relação entre exposição e proteção clínica à malária já esteja bem estabelecida na literatura (CLARK *et al.*, 2012; GARCIA-SENOSIAIN *et al.*, 2020;

WIPASA *et al.*, 2010), os resultados no Brasil ainda são escassos (BARBOSA *et al.*, 2014; LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2009). Na área de estudo, o nosso grupo tem mostrado que os chamados anticorpos protetores, isto é, que bloqueiam a interação do parasito com a sua célula hospedeira, aumentam com a exposição à malária (KANO *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2018; SOUZA-SILVA *et al.*, 2014). Estes dados reforçam a presença de imunidade adquirida contra o parasito, particularmente contra o *P. vivax*, que predomina na área de estudo.

Limitações relacionadas às amostras e ao intervalo entre os cortes transversais impediram que fosse realizado o acompanhamento individual da população de estudo. Apesar disto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram a importância de se determinar a prevalência de infecções submicroscópicas em diferentes situações de transmissão na Amazônia Brasileira.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- i. A maior parte das infecções maláricas em Rio Pardo, cerca de 85%, são submicroscópicas, reforçando a necessidade da utilização de ferramentas moleculares no diagnóstico da doença em regiões endêmicas;
- ii. A utilização simultânea de protocolos baseados em alvos ribossomais e não ribossomais não apresenta benefícios na detecção de infecções com parasitemias submicroscópica; entretanto, para o diagnóstico de coinfeções por *P. vivax* e *P. falciparum* fazem-se necessários protocolos baseados em alvos não ribossomais;
- iii. O *P. vivax* é a espécie de plasmódio humano mais prevalente na área estudada, seguido *P. falciparum* e coinfeções entre as duas espécies. Infecções por *P. malariae* foram pouco prevalentes nesta comunidade;
- iv. A distribuição de malária na população de assentamento agrícola de Rio Pardo é heterogênea, sendo mais prevalente em habitantes que residem próximos aos criadouros de mosquitos nos igarapés;
- v. A exposição contínua da população de estudo a níveis relativamente baixos de transmissão de malária leva ao desenvolvimento de imunidade contra a doença, caracterizada aqui por diminuição da parasitemia com o aumento da idade e o tempo de residência na Amazônia brasileira.

## 8. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The Biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 7, n. 9, p. a025585, set. 2017. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a025585>>.

ALMEIDA, A. C. G. *et al.* High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

ALVARENGA, D. *et al.* Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malaria Journal*, v. 14, n. 1, p. 81, 2015. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/14/1/81>>.

ALVES, FABIANA P. *et al.* High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 66, n. 6, p. 641–8, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12224567>>.

ALVES, FABIANA P. *et al.* Asymptomatic Carriers of *Plasmodium* spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 777–779, 1 set. 2005. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/42.5.777>>.

AMARAL, L. C. *Identificação Molecular de infecções maláricas subclínicas e mistas por alvos não ribossômicos de Plasmodium vivax e Plasmodium falciparum*. 2019. 1–109 f. Instituto René Rachou - Fiocruz-MG, 2019.

AMARAL, L. C. *et al.* Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malaria Journal*, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2781-3>>.

AMARATUNGA, C. *et al.* Dihydroartemisinin–piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 3, p. 357–365, mar. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309915004879>>.

AMINO, R. *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v. 12, n. 2, p. 220–224, 22 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm1350>>.

ANINAGYEI, E. *et al.* Evaluating 18s-rRNA LAMP and selective whole genome amplification (sWGA) assay in detecting asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in blood donors. *Malaria Journal*, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2850-7>>.

ASGHAR, M. *et al.* Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates

telomere degradation and senescence in wild birds. *Science*, v. 347, n. 6220, p. 436–438, 2015.

BARBOSA, S. *et al.* Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 8, 2014.

BARCUS, M. J. *et al.* Demographic risk factors for severe and fatal vivax and falciparum malaria among hospital admissions in northeastern Indonesian Papua. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, n. 5, p. 984–991, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17984364>>.

BARILLAS-MURY, C.; KUMAR, S. Plasmodium-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons. *Cellular Microbiology*, v. 7, n. 11, p. 1539–1545, 6 set. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-5822.2005.00615.x>>.

BOUSEMA, T. *et al.* Asymptomatic malaria infections: Detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 12, p. 833–840, 2014.

BRASIL, P. *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X17303339>>.

CHARPENTIER, E. *et al.* Performance evaluation of different strategies based on microscopy techniques, rapid diagnostic test and molecular loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of imported malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, maio 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X19302253>>.

CHENG, Q.; CUNNINGHAM, J.; GATTON, M. L. Systematic Review of Sub-microscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 1, 2015.

CHIN, C. D.; LINDER, V.; SIA, S. K. Lab-on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities. *Lab Chip*, v. 7, n. 1, p. 41–57, 2007. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=B611455E>>.

CHU, C. S.; WHITE, N. J. Management of relapsing *Plasmodium vivax* malaria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 14, n. 10, p. 885–900, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2016.1220304>>.

CLARK, E. H. *et al.* *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 4, p. 1583–1592, 2012.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 4, p. 579–592, 2007.

COSTA, D. C. *et al.* Submicroscopic malaria parasite carriage: How

reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 1, p. 21–28, 2014.

COWMAN, A. F. *et al.* The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host and Microbe*, v. 22, n. 2, p. 232–245, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.003>>.

DE ALVARENGA, D. A. M. *et al.* An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 86, 8 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-18216-x>>.

DE CASTRO, A. B. *et al.* How Immigrant Workers Experience Workplace Problems: A Qualitative Study. *Archives of Environmental & Occupational Health*, v. 61, n. 6, p. 249–258, 7 nov. 2006. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3200/AEOH.61.6.249-258>>.

DE MAST, Q. *et al.* Is asymptomatic malaria really asymptomatic? Hematological, vascular and inflammatory effects of asymptomatic malaria parasitemia. *Journal of Infection*, v. 71, n. 5, p. 587–596, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.005>>.

DE PINA-COSTA, A. *et al.* Malaria in Brazil: What happens outside the Amazonian endemic region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.

DEMAS, A. *et al.* Applied Genomics: Data Mining Reveals Species-Specific Malaria Diagnostic Targets More Sensitive than 18S rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 7, p. 2411–2418, jul. 2011. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.02603-10>>.

DONDORP, A. M. *et al.* Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. *New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 5, p. 455–467, 30 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0808859>>.

DUARTE, A. M. R. *et al.* Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic forest in Brazil. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 58, 7 dez. 2013. Disponível em: <<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-58>>.

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria Journal*, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2016.

GARCIA-SENOSIAIN, A. *et al.* Peripheral merozoite surface proteins are targets of naturally acquired immunity against malaria both in India and in Ghana. *Infection and Immunity*, n. January, 2020. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00778-19>>.

GENTON, B. *et al.* Plasmodium vivax and mixed infections are associated with severe malaria in children: a prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS medicine*, v. 5, n. 6, p. e127, 17 jun. 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18563961>>.

GRILLET, M. E. *et al.* Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 19, n. 5, p. e149–e161, 2019.

GRUENBERG, M. *et al.* Plasmodium vivax molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malaria Journal*, v. 17, n. 1, p. 55, 30 dez. 2018. Disponível em: <<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12936-018-2201-0>>.

GRUENBERG, M. *et al.* qRT-PCR versus IFA-based Quantification of Male and Female Gametocytes in Low-Density Plasmodium falciparum Infections and Their Relevance for Transmission. *The Journal of Infectious Diseases*, p. 1–10, 2019.

HOFMANN, N. *et al.* Ultra-Sensitive Detection of Plasmodium falciparum by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets. *PLOS Medicine*, v. 12, n. 3, p. e1001788, 3 mar. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001788>>.

HOFMANN, N. E. *et al.* Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 10, p. 1108–1116, out. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918304110>>.

HSIANG, M. S.; GREENHOUSE, B.; ROSENTHAL, P. J. Point of care testing for malaria using lamp, loop mediated isothermal amplification. *Journal of Infectious Diseases*, v. 210, n. 8, p. 1167–1169, 2014.

JAITEH, F. *et al.* Community perspectives on treating asymptomatic infections for malaria elimination in the Gambia. *Malaria Journal*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2672-7>>.

KANJEE, U. *et al.* Molecular and cellular interactions defining the tropism of Plasmodium vivax for reticulocytes. *Current Opinion in Microbiology*, v. 46, p. 109–115, dez. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527418300626>>.

KANO, F. S. *et al.* Plasmodium vivax Duffy binding protein: Baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Tropical Medicine and International Health*, v. 17, n. 8, p. 989–1000, 2012.

KANO, F. S. *et al.* The Presence, Persistence and Functional Properties of Plasmodium vivax Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 12, p. e0005177, 13 dez. 2016. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005177>>.

KAURA, T. *et al.* Prevalence of submicroscopic malaria in low transmission

state of Punjab: A potential threat to malaria elimination. *Journal of Vector Borne Diseases*, v. 56, n. 1, p. 78–84, 2019.

KITCHEN, S. F. The Infection of Reticulocytes by Plasmodium Vivax. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. s1-18, n. 4, p. 347–359, 1 jul. 1938. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.1938.s1-18.347>>.

KOLLEND, H. *et al.* Poor diagnostic performance of a species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) platform for malaria. *European Journal of Microbiology and Immunology*, v. 8, n. 4, p. 112–118, 2018.

KRAMPA, F. *et al.* Recent Progress in the Development of Diagnostic Tests for Malaria. *Diagnostics*, v. 7, n. 3, p. 54, 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2075-4418/7/3/54>>.

KROTOSKI, W. A. The hypnozoite and malarial relapse. *Progress in clinical parasitology*, v. 1, p. 1–19, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491691>>.

LADEIA-ANDRADE, S. *et al.* Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 80, n. 3, p. 452–9, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270298>>.

LALREMURATA, A. *et al.* Natural infection of Plasmodium brasilianum in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*, v. 2, n. 9, p. 1186–92, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501116>>.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159, 1977.

LLOYD, Y. M. *et al.* PCR-based detection of Plasmodium falciparum in saliva using mitochondrial cox3 and varATS primers. *Tropical Medicine and Health*, v. 46, n. 1, p. 22, 22 dez. 2018. Disponível em: <<https://tropmedhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41182-018-0100-2>>.

LUCCHI, N. W. *et al.* Malaria Diagnostics and Surveillance in the Post-Genomic Era. *Public Health Genomics*, v. 16, n. 1–2, p. 37–43, 2013. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/345607>>.

LUCHAVEZ, J. *et al.* Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: Implications for clinical management. *Malaria Journal*, v. 10, n. 1, p. 286, 2011. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/content/10/1/286>>.

MABERTI, S. [The development of resistance to pyrimethamine. Presentation of 15 cases studied in Trujillo, Venezuela]. *Archivos venezolanos de medicina tropical y parasitología médica*, v. 3, p. 239–59, dez. 1960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14467711>>.

MALLERET, B.; RÉNIA, L.; RUSSELL, B. The unhealthy attraction of *Plasmodium vivax* to reticulocytes expressing transferrin receptor 1 (CD71). *International Journal for Parasitology*, v. 47, n. 7, p. 379–383, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.03.001>>.

MALPARTIDA-CARDENAS, K. *et al.* Quantitative and rapid *Plasmodium falciparum* malaria diagnosis and artemisinin-resistance detection using a CMOS Lab-on-Chip platform. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 145, n. August, p. 111678, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111678>>.

MARCANO, T. J. *et al.* Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 4, p. 369–376, 2004.

MCKENZIE, F. E.; JEFFERY, G. M.; COLLINS, W. E. *Plasmodium malariae* blood-stage dynamics. *The Journal of parasitology*, v. 87, n. 3, p. 626–37, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11426728>>.

MERCEREAU-PUIJALON, O.; BARALE, J.-C.; BISCHOFF, E. Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *International Journal for Parasitology*, v. 32, n. 11, p. 1323–1344, out. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002075190200111X>>.

METZGER, W. G. *et al.* Malaria diagnosis under field conditions in the Venezuelan Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 1, p. 20–4, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919672>>.

MOHON, A. N. *et al.* Ultrasensitive loop mediated isothermal amplification (US-LAMP) to detect malaria for elimination. *Malaria Journal*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2979-4>>.

MOREIRA, C. M. *et al.* A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malaria Journal*, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.

MOTA, M. M. Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, v. 291, n. 5501, p. 141–144, 5 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.291.5501.141>>.

MOUATCHO, J. C.; DEAN GOLDRING, J. P. Malaria rapid diagnostic tests: Challenges and prospects. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. PART10, p. 1491–1505, 2013.

MUELLER, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70177-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70177-X)>.

NA-BANGCHANG, K. *et al.* Identification of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in an area along the Thai-Myanmar border: integration of clinico-parasitological response, systemic drug exposure, and in vitro parasite sensitivity. *Malaria Journal*, v. 12, n. 1, p. 263, 30 dez. 2013.

Disponível em: <<https://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-12-263>>.

NGUITRAGOOL, W. *et al.* Very high carriage of gametocytes in asymptomatic low-density *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections in western Thailand. *Parasites & vectors*, v. 10, n. 1, p. 512, 2017.

OBALDIA, N. *et al.* Bone Marrow Is a Major Parasite Reservoir in *Plasmodium vivax* Infection. *mBio*, v. 9, n. 3, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29739900>>.

OKELL, L. C. *et al.* Submicroscopic Infection in *Plasmodium falciparum* – Endemic Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 200, n. 10, p. 1509–1517, 2009.

OKELL, L. C. *et al.* Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Communications*, v. 3, p. 1–9, 2012.

OLSSON, M. *et al.* A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*, v. 38, n. 2, p. 168–173, fev. 1998. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1537-2995.1998.38298193099.x>>.

ORIERO, E. C. *et al.* Novel techniques and future directions in molecular diagnosis of malaria in resource-limited settings. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 15, n. 11, p. 1419–1426, 2015.

PIRES, C. V. *et al.* Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: A nine year follow-up study in the Amazon region. *PLOS ONE*, v. 13, n. 11, p. e0207244, 12 nov. 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0207244>>.

POLLAK, J. J.; HOURI-YAFIN, A.; SALPETER, S. J. Computer Vision Malaria Diagnostic Systems—Progress and Prospects. *Frontiers in Public Health*, v. 5, n. August, p. 1–5, 2017.

POLLEY, S. D. *et al.* Mitochondrial DNA Targets Increase Sensitivity of Malaria Detection Using Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 8, p. 2866–2871, 1 ago. 2010. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00355-10>>.

POOSTCHI, M. *et al.* Image analysis and machine learning for detecting malaria. *Translational Research*, v. 194, p. 36–55, 2018.

RACHID VIANA, G. M. *et al.* Histidine-rich protein 2 (pfrp2) and pfrp3 gene deletions in *Plasmodium falciparum* isolates from select sites in Brazil and Bolivia. *PLOS ONE*, v. 12, n. 3, p. e0171150, 16 mar. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0171150>>.

RECHT, J. *et al.* Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current

challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.

RIBEIRO, C. T. D.; LACERDA, M. V. G.; FERREIRA, J. O. Plasmodium vivax malaria in the Brazilian Amazon: some aspects of its epidemiology, clinical spectrum and naturally induced immune responses. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)*, v. 101, n. 3, p. 243–8, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683322>>.

ROBINSON, L. J. *et al.* Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. 2015. v. 12. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pmed.1001891>>.

ROBORTELLA, D. R. *Diagnóstico Molecular de Infecção Malárica em Aldeias Indígenas Ianomâmis*. 2016. Dissertação de Mestrado.

ROTH, J. M. *et al.* Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 53, n. 2, p. 87–105, 2016.

ROUGEMONT, M. *et al.* Detection of four Plasmodium species in blood from human by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific Real-Time PCR assays. v. 42, n. 12, p. 5636–5643, 2004. Disponível em: <<http://www.eur.nl/fsw/sofa/detail/article/40157-promotie-wj-verheul/>>.

RUTLEDGE, G. G. *et al.* Plasmodium malariae and P. ovale genomes provide insights into malaria parasite evolution. *Nature*, v. 542, n. 7639, p. 101–104, 2017.

SIQUEIRA, A. M. *et al.* Plasmodium vivax landscape in Brazil: Scenario and challenges. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. Suppl 6, p. 87–96, 2016.

SLATER, H. C. *et al.* The temporal dynamics and infectiousness of subpatent Plasmodium falciparum infections in relation to parasite density. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 1433, 29 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41467-019-09441-1>>.

SNOUNOU, G. *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 61, n. 2, p. 315–320, out. 1993. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016668519390077B>>.

SOUZA-SILVA, F. A. *et al.* Duffy Antigen Receptor for Chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-Duffy Binding Protein II (DBPII) immunity. *PLoS ONE*, v. 9, n. 4, 2014.

SOUZA, P. F. *et al.* Spatial spread of malaria and economic frontier expansion in the Brazilian Amazon. *PloS one*, v. 14, n. 6, p. e0217615, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31211772>>.

STURM, A. Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287–1290, 1 set. 2006.

Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1129720>>.

SUÁREZ-MUTIS, M. C. *et al.* Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic Plasmodium vivax infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 49, n. 3, p. 159–164, 2007.

SVS. *Guia de tratamento da malária no Brasil*. 1. ed. Brasília, Distrito Federal: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/dezembro/13/guia-tratamento-malaria-preliminar-2019.pdf>>.

SVS. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. 1. ed. Brasília, Distrito Federal: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2010. v. 20.

SVS. *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária Manual de Diagnóstico*. Brasília, Distrito Federal: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009.

SVS, M. DA S.-S. DE V. EM S. *Situação Epidemiológica da Malária*. Disponível em: <[http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.c - %0A malaria\\_CIT\\_30\\_ago\\_2018\\_cassiopeterka.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.c-%0A%20malaria_CIT_30_ago_2018_cassiopeterka.pdf)>. Acesso em: 3 jan. 2020.

TAYLOR, B. J. *et al.* A lab-on-chip for malaria diagnosis and surveillance. *Malaria Journal*, v. 13, n. 1, p. 179, 2014. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-13-179>>.

TAYLOR, B. J. *et al.* Real-time PCR detection of Plasmodium directly from whole blood and filter paper samples. *Malaria Journal*, v. 10, n. 1, p. 244, 2011. Disponível em: <<http://malariajournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2875-10-244>>.

TJITRA, E. *et al.* Multidrug-Resistant Plasmodium vivax Associated with Severe and Fatal Malaria: A Prospective Study in Papua, Indonesia. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 6, p. e128, 17 jun. 2008. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0050128>>.

TORRES, K. *et al.* Automated microscopy for routine malaria diagnosis: A field comparison on Giemsa-stained blood films in Peru. *Malaria Journal*, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12936-018-2493-0>>.

TRAGER, W.; JENSEN, J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, v. 193, n. 4254, p. 673–675, 20 ago. 1976. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.781840>>.

WHITE, N. J. *et al.* Malaria. *The Lancet*, v. 383, n. 9918, p. 723–735, 2014.

WHO. *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. Pharmacology*. 2011. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44449/9789241500470\\_eng.pdf;jsessionid=204E83FF9CFA1E97AE05D87345BA9A18?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44449/9789241500470_eng.pdf;jsessionid=204E83FF9CFA1E97AE05D87345BA9A18?sequence=1)>.

WHO. Global technical strategy for malaria 2016-2030. *World Health Organization*, p. 1–35, 2015a. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991_eng.pdf?ua=1)>.

WHO. *Malaria Rapid Diagnostic Test Performance Round 6 (2014-2015)*. 2015b. v. 3. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241510035/en/>>.

WHO. *World Malaria Report 2019*. 2019.

WIPASA, J. *et al.* Long-lived antibody and B cell memory responses to the human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 2, 2010.

WONGSRICHANALAI, C. *et al.* A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. SUPPL. 6, p. 119–127, 2007.

ZHOU, Z. *et al.* Assessment of submicroscopic infections and gametocyte carriage of *Plasmodium falciparum* during peak malaria transmission season in a community-based cross-sectional survey in western Kenya, 2012. *Malaria Journal*, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2016.

ZIMMERMAN, P. A.; HOWES, R. E. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 28, n. 5, p. 446–454, 2015.

## Anexo I

Amaral et al. *Malar J* (2019) 18:154  
<https://doi.org/10.1186/s12936-019-2781-3>

Malaria Journal

## RESEARCH

## Open Access



# Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections

Lara Cotta Amaral<sup>1</sup>, Daniela Rocha Robortella<sup>1,2</sup>, Luiz Felipe Ferreira Guimarães<sup>1</sup>, Jean Ezequiel Limongi<sup>3</sup>, Cor Jesus Fernandes Fontes<sup>4</sup>, Dhelio Batista Pereira<sup>5</sup>, Cristiana Ferreira Alves de Brito<sup>1</sup>, Flora Satiko Kano<sup>1</sup>, Taís Nóbrega de Sousa<sup>1\*</sup> and Luzia Helena Carvalho<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** The unexpected high proportion of submicroscopic malaria infections in areas with low transmission intensity challenges the control and elimination of malaria in the Americas. The current PCR-based assays present limitations as most protocols still rely on amplification of few-copies target gene. Here, the hypothesis was that amplification of different plasmodial targets—ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal multi-copy sequences (Pvr47 for *Plasmodium vivax* and Pfr364 for *Plasmodium falciparum*)—could increase the chances of detecting submicroscopic malaria infection.

**Methods:** A non-ribosomal real-time PCR assay targeting Pvr47/Pfr364 (NR-qPCR) was established and compared with three additional PCR protocols, two of them based on *18S rRNA* gene amplification (Nested-PCR and R-qPCR) and one based on Pvr47/Pfr364 targets (NR-cPCR). The limit of detection of each PCR protocol, at single and artificial mixed *P. vivax/P. falciparum* infections, was determined by end-point titration curves. Field samples from clinical (n = 110) and subclinical (n = 324) malaria infections were used to evaluate the impact of using multiple molecular targets to detect malaria infections.

**Results:** The results demonstrated that an association of ribosomal and non-ribosomal targets did not increase sensitivity to detect submicroscopic malaria infections. Despite of that, artificial mixed-malaria infections demonstrated that the NR-qPCR was the most sensitive protocol to detect low-levels of *P. vivax/P. falciparum* co-infections. Field studies confirmed that submicroscopic malaria represented a large proportion (up to 77%) of infections among asymptomatic Amazonian residents, with a high proportion of infections (~20%) identified only by the NR-qPCR.

**Conclusions:** This study presents a new species-specific non-ribosomal PCR assay with potential to identify low-density *P. vivax* and *P. falciparum* infections. As the majority of subclinical infections was caused by *P. vivax*, the commonest form of malaria in the Amazon area, future studies should investigate the potential of Pvr47/Pfr364 to detect mixed-malaria infections in the field.

**Keywords:** Malaria, Molecular diagnosis, PCR, Submicroscopic, Mixed-malaria infections

\*Correspondence: [tais@minas.fiocruz.br](mailto:tais@minas.fiocruz.br); [hc Carvalho@minas.fiocruz.br](mailto:hc Carvalho@minas.fiocruz.br)

<sup>1</sup> Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Malaria is a worldwide public health concern that is present in roughly 90 countries, mainly in tropical and subtropical regions [1]. While *Plasmodium vivax* is the most widely distributed parasite causing malaria, *Plasmodium falciparum* accounts for the most severe forms of the disease [2]. Although malaria incidence rate is estimated to have decreased by 18% globally between 2010 and 2016, a recent increase in case incidence occurred in the Americas, particularly in the Amazon rainforest [1, 3].

In order to progress towards malaria control and elimination, it is critical to understand the sources of transmission (the infectious reservoir) and those at risk of infection at the population level [4]. In this context, the molecular detection of *Plasmodium* infections in endemic areas have confirmed previous finding of high frequencies of malaria infections at densities below the limit of conventional microscopic diagnostics [5–9]. It is particularly relevant as data from systematic reviews have shown that across different geographic areas low-density infections may represent the majority of malaria infections [10, 11]. Accordingly, a substantial proportion of asymptomatic and submicroscopic malarial infections has been described in peri-urban areas of the Brazilian Amazon [12]. Many are the implications of these findings as submicroscopic malaria carriers may be able to transmit the *Plasmodium* parasites, acting as reservoirs for malaria [13, 14]. Beyond the practical value of using molecular tools to identify submicroscopic carriers and mixed-species infections, malaria infections at any density may have significant health and socioeconomic consequences [15].

Historically, the small subunit 18S of the ribosomal RNA gene (*18S rRNA*) has been the most common target used for molecular diagnosis of malaria [16–20]. As this gene is present in few copies (5 to 8) in the genome of *Plasmodium* parasites [21], low sensitivity and reproducibility of standard PCR protocols based on *18S rRNA* gene amplification have been described [22, 23]. In the last decade, the genomic data mining of *Plasmodium* parasites has allowed the discovery of new species-specific multi-copy targets which show potential for molecular diagnosis of *P. vivax* and *P. falciparum* malaria [24–26]. Among the promising targets include the non-coding subtelomeric repeat sequences Pvr47 and Pfr364 that are present in 14 and 41 copies in the genomes of *P. vivax* and *P. falciparum*, respectively [24]. While there is evidence for their location and distribution, the biological functions of Pvr47 and Pfr364 remains to be established. By using a single-step PCR assay to amplify Pvr47/Pfr364 targets, it was possible to demonstrate the relatively higher sensitivity of these targets as compared to

the amplification of *18S rRNA* gene by the conventional nested-PCR assay [24].

Since most malaria PCR-based protocols still relies on amplification of *18S rRNA* gene, which has low sensitivity to detect low-density infections, we evaluated here how useful Pvr47/Pfr364 targets are to detect single and mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections in clinical and subclinical malaria. As the original PCR protocol to amplify Pvr47/Pfr364 involved DNA visualization on gel electrophoresis [24], here a new qPCR protocol targeting these high-copy non-ribosomal sequences was established. The experimental approach evaluated whether amplification of different plasmodial targets (Pvr47/Pfr364 and *18S rRNA* gene) could increase the chances of detecting submicroscopic malaria infections. For that, field samples (clinical and subclinical malaria) were amplified by four different PCR assays, two of them targeting Pvr47/Pfr364 sequences [24] and two targeting the *18S rRNA* gene [16, 17].

## Methods

### Study population and participants

Ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the René Rachou Institute/Oswaldo Cruz Foundation (protocols No 24/2008, and No 1.821.955/2016), according to the Brazilian National Council of Health (Resolutions 196/96 and 466/12). All participants were informed about the objectives and procedures of the study, with voluntary participation through written informed consent.

### Clinical malaria

This group included individuals with clinical suspicion of malaria who sought care at Brazilian malaria reference healthcare facilities located in both endemic (States of Rondônia and Mato Grosso) and non-endemic areas (Minas Gerais). After short-trips to malaria transmission areas, these individuals presented symptoms suggestive of uncomplicated malaria infection, such as fever, myalgia, chills, and headaches. Non-inclusion criteria included: (i) refusal or inability to sign the informed consent; (ii) age below 5 years-old; (iii) pregnant women; and (iv) any other co-morbidity that could be traced. One-hundred-and-ten patients were enrolled in the study, which gives 90% statistical power at 5% significance level assuming 30% of prevalence by light microscopy and an estimative of 50% increase by molecular assays; the majority of study population were adults, with a median age of 40 years (IQR 30.75–48.25), and a proportion female:male of 1:5. For each individual, blood sample was collected at a single time point by venipuncture or finger prick. The period of blood collection varied from 2008

to 2017, and since there, all samples from participants have been maintained in the biorepository of malaria research group at FIOCRUZ-MINAS (Belo Horizonte, MG), Brazilian Ministry of Health, according to the local legislation.

#### Subclinical malaria

This group included malaria-exposed individuals who had participated of cross-sectional surveys carried-out between 2008 and 2015 in a rural community of the Brazilian Amazon rainforest, Rio Pardo (1°46'S–1°54'S, 60°22'W–60°10'W), Presidente Figueiredo municipality, State of Amazonas. The study site and malaria transmission patterns have been described in details elsewhere [27–29]. In this area, malaria transmission is considered hypo to mesoendemic, and the majority of residents were natives from the Amazon region [27]. For the current study, the non-inclusion criteria were: (i) refusal or inability to sign the informed consent; (ii) any signs and/or symptoms that could be related to symptomatic malaria such as fever, myalgia, chills, and headaches; the absence of symptoms was self-reported and obtained during a personal interview conducted through structured questionnaire, as previously described [27]; (iii) age below 5 years-old, as subclinical malaria infection is not prevalent in Amazon children [30]; (iv) pregnant women; and (v) any other morbidity that could be traced. This group was composed by 324 participants; considering 7% of prevalence by light microscopy [27] and assuming that in an area of greater chance of *P. vivax* infection molecular assays is expected to increase malaria prevalence by a factor of 2 [11], sample size will give more than 90% of statistical power at 5% significance level. The median age of studied individuals were 40 years (IQR 24–56), with female:male ratio of 1:1.5, and an average of 35 years (IQR 21–52) living in the endemic area. For each individual, blood sample was collected at a single time-point by venipuncture or finger prick. As in the study area the number of malaria cases fluctuated during the last 8 years, reflecting periods of high and low malaria transmission [31], samples covered the temporal-variation in the profile of malaria transmission; thus, the blood samples were collected from November 2008 to June 2015, and all biological specimens have been maintained in the biorepository of malaria research group at FIOCRUZ-MINAS (Belo Horizonte, MG), Brazilian Ministry of Health, according to the local legislation.

#### Conventional light microscopy

At the time of blood collection, all individuals (clinical and subclinical groups) were submitted to a finger-prick for malaria diagnosis by light microscopy. The Giemsa-stained thick blood smears were prepared and examined

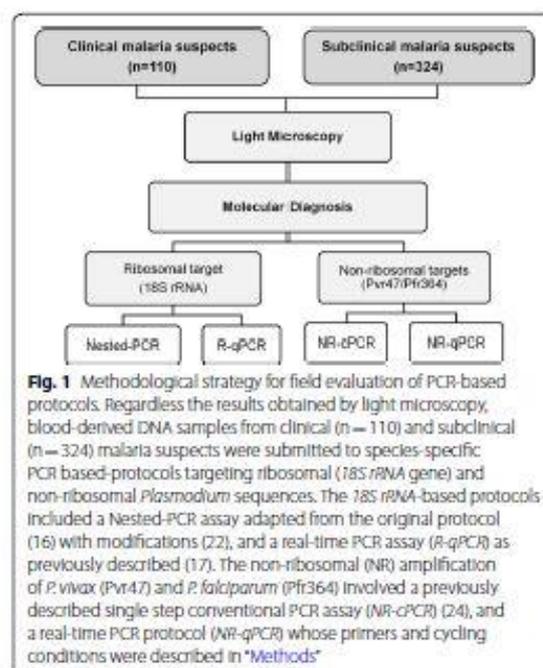
by experienced local microscopists, according to the malaria diagnosis guidelines of the Brazilian Ministry of Health [32]. Parasite density was estimated as the number of parasites per microlitre of blood (parasites/ $\mu$ L), and all microscopically positive cases were treated immediately in local health services, following the national malaria treatment protocols recommended by the Brazilian Ministry of Health [33].

#### Extraction of genomic DNA

The experimental approach to the molecular detection of clinical and subclinical malaria infections was included in Fig. 1. Genomic DNA (gDNA) was extracted from either whole blood samples collected in EDTA, or from dried blood spots on filter paper using the Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen) and the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), respectively, according to manufacturer's instructions. As an internal control of the DNA extractions, 10% of the samples extracted were randomly submitted to a PCR assay for the amplification of a human gene (ABO blood group), according to the protocol previously described [34]. All samples tested amplified the target gene. The extracted DNA was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

#### Panel of *Plasmodium* reference samples

The following parasites were used as reference in molecular assays: (i) *P. falciparum* (3D7 strain) from in vitro



continuous blood-stage cultures maintained in the routine of the laboratory, according to protocol previously described [35]; (ii) *P. vivax*, *P. falciparum* and *Plasmodium malariae* from peripheral blood of malaria infected individuals whose species-specific diagnosis was confirmed by PCR protocols (Malaria Biorepository, FIOCRUZ-Minas, MG, Brazil); (iii) *Plasmodium brasilianum*/*P. malariae* (Peruvian III strain, MR4-349) kindly provided by the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, MR4 (Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, BEI Resources, NIAID/NIH, ATCC, USA).

#### End-point *Plasmodium* DNA titrations of single and mixed *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections

DNA samples from high-density *P. vivax* (12,900 parasites/ $\mu$ L) and *P. falciparum* (13,400 parasites/ $\mu$ L) infections were used to determine the end-point detection for ribosomal and non-ribosomal PCR assays. For each plasmidial DNA, three-fold dilutions were prepared range from 2000 to 0.3 parasites/ $\mu$ L. Similarly, artificial mixed malaria infections were produced by mixed DNA samples from *P. vivax* and *P. falciparum* in different proportions (1:1 until 1:2000; threefold dilutions). Each sample was assayed in triplicate and submitted to all PCR protocols (Fig. 1).

#### Primers design and real-time PCR conditions to amplify the non-ribosomal Pvr47/Pfr364 targets (NR-qPCR)

Primers and MGB (minor groove binder) probes were designed for Pvr47 and Pfr364 targets using Primer-Blast (NCBI) and OLIGO (version 4.0, 1999) softwares, considering conserved regions in each species alignments. The alignments were based on the sequences previously described [24], composed of 14 copies of Pvr47 (*P. vivax* Sal-I strain) and 41 copies of Pfr364 (subfamilies 1 and 2 of *P. falciparum* 3D7 strain). The set of oligonucleotides obtained for Pvr47 was 5'TCCGCAGCTCACAAA TGTTTC3' (forward), 5'ACATGGGGATTCTAAGCC AATTTA3' (reverse), and 5'HEX-TCCGCGAGGGCT GCAA3' (probe), which binds respectively to positions 142–161, 245–222 and 189–204 of *P. vivax* Sal-I (GenBank accession number AAKM01000578), resulting in a 104 bp amplicon. For Pfr364, the set used was 5'ACT CGCAATAACGCTGCAT3' (forward), 5'TTCCCTGCC CAAAAACGG3' (reverse), and 5'FAM-GGTGCCGGG GGTTCCTACGC3' (probe), which binds respectively to positions 313–331, 400–383 and 335–354 of *P. falciparum* 3D7 (*Pf3D7\_04\_12625\_14152*, in [24]), resulting in an 88 bp amplicon. All NR-qPCR reactions were performed in 10  $\mu$ L volumes containing 2  $\mu$ L of DNA (~3 to 6  $\mu$ L of whole blood) and 5  $\mu$ L of TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). For Pvr47

amplification was used 50 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer, and 250 nM of probe; for Pfr364, 900 nM of forward primer, 300 nM of reverse primer, and 150 nM of probe were used. The PCR assays were performed using the automatic thermocycler ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) and the following cycling parameter: a pre-incubation and initial denaturation, respectively, at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, primers annealing at 52 °C for 1 min, and extension at 60 °C for 1 min. The fluorescence acquisition was performed at the end of each extension step. Analytical sensitivity and specificity of Pvr47 and Pfr364 NR-qPCR assays were included as an Additional file 1. Specificity was investigated using template DNA from either malaria unexposed individuals (n=30) or other *Plasmodium* species (Additional file 2). For the limit of detection, standard curves were prepared from serial dilution of plasmid DNA carrying the Pvr47 or Pfr364 target (Additional file 3). The cycle threshold (Ct) values of 37 and 38 ( $C_t \leq 37$  or  $C_t \leq 38$ ) were used to define positivity to *P. vivax* and *P. falciparum*, respectively.

#### Amplification of Pvr47/Pfr364 targets by conventional PCR assay (NR-cPCR)

The amplification of the targets Pvr47 (*P. vivax*) and Pfr364 (*P. falciparum*) were conducted by using primers previously described [24]. Details about primers and cycling conditions were included in Additional file 4.

#### 18S rRNA gene amplification by nested-PCR (Nested-PCR) and real-time PCR assay (R-qPCR)

Nested-PCR assay for amplification of 18S rRNA gene was performed as described [22], using genus and species-specific primers previously described [16]. The real-time PCR (R-qPCR) method uses a single pair of genus-specific primers for the detection of the 18S rRNA gene, with two internal species-specific hydrolysis probes for *P. falciparum* and *P. vivax* [17]. Primers and cycling conditions for 18S rRNA gene amplification (Nested-PCR and R-qPCR) were included as Additional file 4.

#### Statistical analysis

Differences in proportions were evaluated using the Chi square ( $\chi^2$ ) test or Fisher's exact test, as appropriate. The Probit Regression analysis was used to define the limit of detection (LOD) of NR-qPCR assay, with different input concentrations of plasmid DNA used to calculate the predicted proportion of positive results (MedCalc Statistical Software program, Ostend, Belgium). Heat map of malaria prevalence was constructed using the heatmap.2 function available in the R package gplots. The assessment of sensitivity and specificity of PCR assays was

determined as described [23], with the reference standard established by combining the detection of any PCR assay excluding the protocol under evaluation. The analyses of sensitivity and specificity were performed in the *GraphPad InStat*, version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The significance at the 5% level was considered to all analysis.

## Results

### Limit of detection of Pvr47 and Pfr364 NR-qPCR

To determine the LOD of NR-qPCR protocols, standard curves were constructed for each DNA plasmid carrying the target gene (Pvr47 or Pfr364) through serial dilution ranging from 20,000 to 0.05 copies/ $\mu\text{L}$  (Additional file 3). By using probit regression analysis was possible to demonstrate that NR-qPCR developed here presented a 95% probability of detecting levels as low as 0.66 copies/ $\mu\text{L}$  for *P. vivax* (Additional file 5A) and 3.27 copies/ $\mu\text{L}$  for *P. falciparum* (Additional file 5B). No amplification was observed by using template DNA from either malaria unexposed individuals or other *Plasmodium* species (data not shown, Additional file 2).

**Ribosomal and non-ribosomal detection of mono-infections caused by either *P. vivax* or *P. falciparum***  
The ability of different targets (*18S rRNA* vs. Pvr47/Pfr364) to detect *P. vivax* and *P. falciparum* mono-infections at low parasite densities was investigated through serial dilutions of field samples containing known

amounts of either *P. vivax* or *P. falciparum* gDNA. In case of *P. vivax* mono-infection, no significant difference was observed between parasite targets amplified by PCR (Table 1). Despite of that, the NR-qPCR was the only protocol able to consistently detect the lowest levels of parasite densities (all replicates amplified until 1 parasite/ $\mu\text{L}$ ). Variability between PCRs assays using the same target resulted in a difference in positivity between conventional and real-time PCR assays targeting Pvr47 (67% vs. 96% for NR-cPCR and NR-qPCR, respectively). Considering *P. falciparum* titration (Table 2), regardless the PCR assay, the amplification of Pfr364 sequence was more precise than *18S rRNA* gene (80% vs. 59%,  $p=0.0359$ , Fisher's exact test). While the amplification of Pfr364 by NR-qPCR was reproducible until 3 parasites/ $\mu\text{L}$ , the amplification of *18S rRNA* was inconsistent, alternating between positive and negative results at similar levels of parasite density (both nested-PCR and R-qPCR).

### Ribosomal and non-ribosomal detection of artificial mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections

Next, the ability of ribosomal and non-ribosomal targets to amplify artificial mixed malaria infections was evaluated. By fixing the amount of *P. vivax* DNA (1433 parasites/ $\mu\text{L}$ ) and varying the amount of *P. falciparum* (1489 to 0.7 parasites/ $\mu\text{L}$ ), it was possible to demonstrate that the protocols based on non-ribosomal targets were much more precise to identify both parasite species, even when *P. falciparum* was present at very low densities (Table 3).

**Table 1 Titration of *P. vivax* single infection by PCR assays targeting ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal (Pvr47) species-specific sequences**

<i>P. vivax</i> mono-infection (12,900 parasites/ $\mu\text{L}$ ) <sup>c</sup>				
Parasite density ( $\mu\text{L}$ ) <sup>d</sup>	18S rRNA		Pvr47	
	Nested-PCR	R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2000	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
1	1/3 (33%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
0.3	0/3 (0%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)
PCR positivity	22/27 (81%) <sup>a,b</sup>	25/27 (93%) <sup>b</sup>	18/27 (67%) <sup>a</sup>	26/27 (96%) <sup>b</sup>
Target positivity	47/54 (87%) <sup>d</sup>		44/54 (81%) <sup>d</sup>	

*P. vivax* blood-derived DNA template was serially diluted (2000 to 0.3 parasites/ $\mu\text{L}$ ) and submitted to each PCR protocol in triplicate. The results were expressed as the number of positive samples in relation to the total of replicates (percentage of positive). PCR assays were defined as described in legend of Fig. 1

Different letters (a,b) indicate differences between proportions ( $p < 0.05$ , Fisher's Exact Test)

No difference was observed between proportions of targets positivity (a')

<sup>c</sup> Determined by Light Microscopy

<sup>d</sup> Parasite density ( $\mu\text{L}$  of blood) was estimated according to the fold-dilution

**Table 2 Titration of *P. falciparum* single infection by PCR assays targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (Pfr364) species-specific sequences**

<i>P. falciparum</i> mono-infection (13,400 parasites/ $\mu$ L) <sup>c</sup>				
Parasite density ( $\mu$ L) <sup>d</sup>	18S rRNA		Pfr364	
	Nested-PCR	R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2000	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	2/3 (67%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	1/3 (33%)	1/3 (33%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
1	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
0.3	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
PCR positivity	16/27 (59%) <sup>a</sup>	16/27 (59%) <sup>a</sup>	21/27 (78%) <sup>a</sup>	22/27 (81%) <sup>a</sup>
Target positivity	32/54 (59%) <sup>a</sup>		43/54 (80%) <sup>b</sup>	

*P. falciparum* blood-derived DNA template was serially diluted (2000 to 0.3 parasites/ $\mu$ L) and submitted to each PCR protocol in triplicate. The results were expressed as the number of positive samples in relation to the total of replicates (percentage of positive).

Different letters (a, a', b') indicate differences between proportions ( $p < 0.05$ , Fisher's Exact Test). PCR assays were defined as described in legend of Fig. 1

<sup>a</sup> Determined by light microscopy

<sup>d</sup> Parasite density ( $\mu$ L of blood) was estimated according to the fold-dilution

**Table 3 Titration of *P. falciparum* in artificial mixed infections by PCR assays targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (Pvr47/Pfr364) species-specific sequences**

Parasite density (per $\mu$ L of blood)	18S rRNA			Pvr47/Pfr364 (NR targets)									
	Nested-PCR			R-qPCR			NR-cPCR			NR-qPCR			
	Pv	Pf	#1 #2 #3	#1 #2 #3	#1 #2 #3	#1 #2 #3	#1 #2 #3	#1 #2 #3					
1433	1489	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	496	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	165	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	55	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	18	Pv+Pf	Pv	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	6	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	2	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf
0.7	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	
PCR positivity		13/24 (54%) <sup>b</sup>		2/24 (8%) <sup>a</sup>			19/24 (79%) <sup>b,c</sup>			22/24 (92%) <sup>c</sup>			
Target positivity		15/48 (31%) <sup>d</sup>					41/48 (85%) <sup>b</sup>						

Artificial mixtures containing *P. vivax* (Pv) and *P. falciparum* (Pf) in different proportions were prepared from well-characterized field samples, as described in Methods. The results are expressed as positive to *P. vivax* and *P. falciparum* (Pv+Pf), *P. vivax* (Pv) or *P. falciparum* (Pf). For each PCR assay, dilution points were assayed in triplicate (#1 to #3)

Different letters (a-c or a', b') indicate significant differences between proportions ( $p < 0.05$ , Fisher's Exact Test)

Taken together, non-ribosomal protocols identified 85% (41 out of 48) artificial mixed infections, while ribosomal protocols identified only 31% (15 out of 48). By comparing the variation intra-target, the amplification of 18S rRNA gene by R-qPCR demonstrated a trend to amplify *P. vivax* in detriment of *P. falciparum*, even when *P. falciparum* DNA was present at relatively high concentrations

(Table 3). By fixing the concentration of *P. falciparum* (1489 parasites/ $\mu$ L) and varying *P. vivax* densities (1433 to 0.7 parasites/ $\mu$ L), a good performance of both targets was observed until 6 parasites/ $\mu$ L (Table 4). Although there was no significant difference between the amplification of ribosomal and non-ribosomal targets (69% vs. 83%), the NR-qPCR protocol developed here seems to

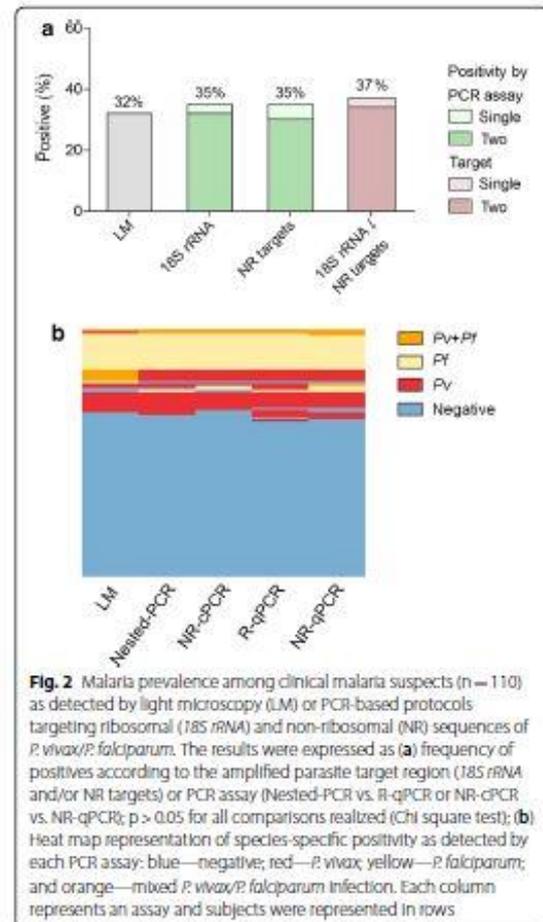


present a better performance as compared to *18S rRNA* amplification, detecting almost all replicates in all *P. vivax/P. falciparum* dilution points. In fact, NR-qPCR was the only PCR assay able to consistently detect mixed infection when one of the species was present in a ratio of about 700-fold lower than the other species (1489 vs. 2 parasites/ $\mu$ L to all replicates) (Table 4).

#### Field evaluation of ribosomal and non-ribosomal PCR targets in clinical and subclinical malaria infections

Initially, the potential use of both ribosomal and non-ribosomal PCR targets for application in malaria field studies involved samples from 110 symptomatic individuals whose light microscopy (LM) confirmed 35 (32%) malaria infections (Fig. 2). As compared with LM, *18S rRNA* gene PCR-based assays (nested-PCR and/or R-qPCR) identified a similar proportion of malaria infections (35%,  $n=39$ ) (Fig. 2a); of interest, the majority of positive samples were amplified by both *18S rRNA* protocols. Basically, the same proportion of positives was obtained with the non-ribosomal protocols (NR-cPCR and/or NR-qPCR). In addition, the use of different PCR targets (ribosomal and non-ribosomal) did not increase malaria positivity (Fig. 2a, the right-side bar chart, in lilac;  $p=1.0$  for ribosomal vs. both PCR-targets and  $p=0.89$  for non-ribosomal vs. both targets). To confirm that an association of ribosomal and non-ribosomal targets did not increase sensitivity to detect submicroscopic malaria infections, the values of sensitivity and specificity were determined for molecular PCR-assays. In accordance, the performance of each PCR assay was similar with almost no detection of false positives or negatives (Table 5). *Plasmodium* species-specific identification (Fig. 2b) showed the same pattern of positivity, with no significant difference obtained between methods (LM vs. PCR based-protocols) or target amplified (ribosomal vs. non-ribosomal). In this symptomatic malaria patients, *P. vivax* and *P. falciparum* were found in similar proportions. Despite of that, a couple of mixed-infections (5 out of 6) identified by LM (Fig. 2b, first panel) could not be confirmed by any PCR-based assay.

Screening for subclinical malaria infections among individuals from cross-sectional surveys identified a positivity of 7% (21 out of 324) by LM (Fig. 3A). In this population, molecular diagnosis of malaria increased three to four times the detection of subclinical malaria carriers. However, the amplification of either *18S rRNA* gene (nested-PCR/R-qPCR) or non-ribosomal targets (NR-cPCR/NR-qPCR) detected a similar proportion of subclinical infections, being 22% ( $n=72$ ) and 27% ( $n=89$ ), respectively. As the predicted sensitivity of individual PCR assays varied significantly in this group of low-parasite densities, especially with high false negative rate for nested-PCR



**Fig. 2** Malaria prevalence among clinical malaria suspects ( $n=110$ ) as detected by light microscopy (LM) or PCR-based protocols targeting ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal (NR) sequences of *P. vivax/P. falciparum*. The results were expressed as (a) frequency of positives according to the amplified parasite target region (*18S rRNA* and/or NR targets) or PCR assay (Nested-PCR vs. R-qPCR or NR-cPCR vs. NR-qPCR;  $p > 0.05$  for all comparisons realized (Chi square test)); (b) Heat map representation of species-specific positivity as detected by each PCR assay: blue—negative; red—*P. vivax*; yellow—*P. falciparum*; and orange—mixed *P. vivax/P. falciparum* infection. Each column represents an assay and subjects were represented in rows

assay (Table 5), a significant amount of submicroscopic infections was identified only by the real-time PCR assays, i.e., R-qPCR for *18S rRNA* and NR-qPCR for Pvr47/Pfr364 sequences. In addition, the majority of submicroscopic infections were identified by both ribosomal and non-ribosomal targets (Fig. 3A, the right-side bar chart, in lilac;  $p=0.09$  ribosomal vs. both PCR-targets, and  $p=0.86$  for non-ribosomal vs. both targets). Overall, while PCR protocols identified 92 (28%) subclinical infections, only 21 (7%) were identified by LM ( $p < 0.0001$ , Fig. 3), indicating that 71 out of 92 (77%) infections were missed by the routine LM. Species-specific identification demonstrated a high proportion of *P. vivax* as compared with *P. falciparum* and mixed infections (Fig. 3B), and confirmed differences in the sensitivity between protocols. Although real-time PCR assays (R-qPCR and NR-qPCR) presented a better performance than conventional PCR assays (NRc-PCR and Nested-PCR), the results confirmed the gains achieved

**Table 5** Assessment of sensitivity and specificity for molecular PCR-assays in clinical (n = 110) and subclinical (n = 324) malaria suspects

Study population/ molecular protocol	True positive	False positive <sup>a</sup>	True negative	False negative	Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)
Clinical malaria suspects						
Nested-PCR	36	0	70	4	90% (0.76–0.97)	100% (0.95–1.0)
R-qPCR	37	1	70	2	95% (0.83–0.99)	99% (0.92–1.0)
NR-cPCR	34	0	70	6	85% (0.70–0.94)	100% (0.95–1.0)
NR-qPCR	36	1	70	3	92% (0.79–0.98)	99% (0.92–1.0)
Subclinical malaria suspects						
Nested-PCR	16	1	232	75	18% (0.10–0.27)	100% (0.98–1.0)
R-qPCR	67	2	232	23	74% (0.64–0.83)	99% (0.97–1.0)
NR-cPCR	42	0	232	50	46% (0.35–0.56)	100% (0.98–1.0)
NR-qPCR	72	17	232	3	96% (0.89–0.99)	93% (0.89–0.96)

Sensitivity and specificity was determined as previously described [23]. The reference standard (true positive) for each protocol was calculated by combining the detections by any PCR, excluding the protocol under evaluation

<sup>a</sup> False positive in a sense that no other molecular protocol detected these infections

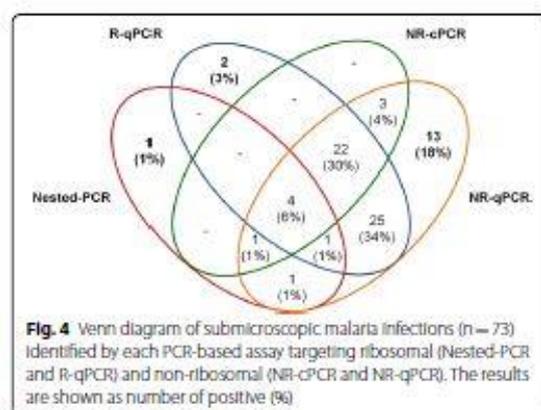
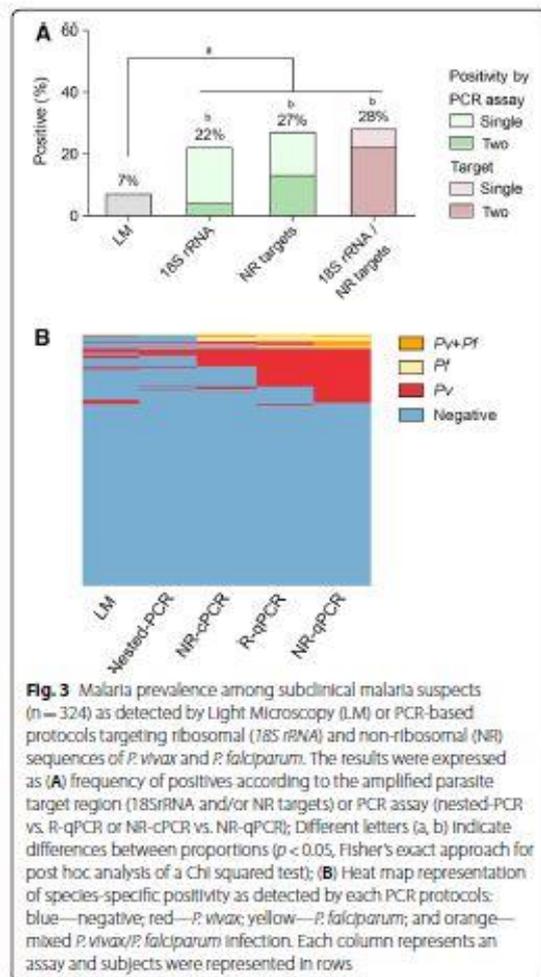
by using NR-qPCR to detect subclinical malaria infection (Fig. 3B). According, considering only the submicroscopic infections identified by any PCR-based assay (73 out of 92), Venn diagram demonstrated a high proportion of infections (18%, 13 out of 73) identified only by the NR-qPCR (Fig. 4). In terms of amplified target region, 96% (n = 70) of submicroscopic infections were detected by non-ribosomal sequences, while 78% (n = 57) were detected by ribosomal target ( $p = 0.0024$ , Fisher's exact test).

## Discussion

Although major advances have been reached for the molecular detection of malaria parasites [25, 26, 36, 37], most sensitive PCR-based assays require high-volume of venous blood and complex sample processing [8, 23, 38, 39], being not feasible in the context of malaria routine surveillance. The current study involved investigate the hypothesis that the amplification of both ribosomal and non-ribosomal multi-copy PCR targets could increase the chances of detecting low parasite density and mixed *P. falciparum* and *P. vivax* infection. For that, a non-ribosomal (NR) qPCR targeting the multi-copy Pvr47/Pfr364 sequences was developed and this new protocol was compared with the original non-ribosomal gel-stained PCR-based protocol [24] as well as with two species-specific PCR assays based on the *18S rRNA* gene amplification.

The end-point titration assays of field samples revealed that the NR-qPCR protocol was able to accurately detect both *P. vivax* and *P. falciparum* infections—in single and artificial mixed infections—producing reproducible results at the lowest parasite densities (1–3 parasites/ $\mu$ L).

Although there was considerable variation between PCR protocols assayed, the non-ribosomal protocols (NR-cPCR and NR-qPCR) were more accurate than ribosomal (nested-PCR and R-qPCR) to detect mixed-species infections. Of interest, only NR-qPCR assay developed here were able to detect *P. falciparum* when this species was present in a proportion of 240-fold lower than *P. vivax*. As the sensitivity of any PCR protocol depends largely on the molecular target used [40], the high copy number of Pfr364 (around 20 copies of "subfamily 1" targeted by specific primers) probably facilitated the detection of low levels of *P. falciparum* in co-infections as compared to *18S rRNA* (around 5–8 copies). Although different multi-copy targets have been described as sensitive for molecular diagnosis of malaria [23, 25, 36], those studies did not investigate the reliability of these targets in mixed-malaria infections, which precludes any potential comparison with results described here. In addition, most of the studies have been carried-out in endemic areas, such as Papua New Guinea, that currently does not represent an unstable and low-transmission endemic area [23]. More work needs to be done in this field of investigation. An apparent inability of *18S rRNA* qPCR to detect low *P. falciparum* densities in situation where *P. vivax* was present in much higher densities was observed. The use of a single pair of primers to detect both species may have been a determinant factor in causing failure of R-qPCR to identify mixed infections. A similar phenomenon of primer competition was described in the original protocol [17], straightening that species-specific primers should be used in field studies in which malaria co-infection is expected to be relevant.



In clinical malaria suspects, the overall prevalence for *P. vivax* and *P. falciparum* detected by amplification of non-ribosomal Pvr47/Pfr364 targets was not significantly different than that of either conventional microscopy or *18S rRNA* gene amplification. The predicted sensitivity and specificity of each PCR protocol assayed here were also similar, and it was independent of the parasite target. Although the clinical sample size limited the statistical power to detect small differences between protocols, these results were not completely unexpected as symptomatic patients usually present high parasite densities in the peripheral blood; consequently, it may facilitate the confirmation of malaria infection by less sensitive protocols such as microscopy and rapid diagnostic tests (RDTs) [41]. These findings reinforce that submicroscopic malaria infections are not prevalent among symptomatic patients, and LM and RDTs are adequate tools for case management [10, 42]. Nevertheless, the limited sensitivity of microscopy in correct identification of mixed-species malaria should be considered in areas where more than one *Plasmodium* species is circulating [43, 44], a result that was confirmed here.

While low frequencies of submicroscopic infections were observed in the group of clinical malaria cases (3–5%), screening for malaria in cross-sectional surveys demonstrated a large proportion (>70%) of malaria cases in the study area that was not detected by conventional microscopy. The majority of subclinical infections were caused by *P. vivax*, the commonest malaria parasite in the Amazon basin, and frequently associated with low-density infections [27, 28, 45–47]. These findings are in accordance with recent reports showing high proportions of submicroscopic *P. vivax* infections across different endemic settings, particularly areas with relatively low transmission intensity [10–12, 26]. Although the reason for this high rate of asymptomatic *P. vivax* infections is unknown, it is probably associated with the unique biology of *P. vivax* that includes a fast acquisition of clinical immunity as compared with *P. falciparum* [47]. It is particularly relevant because in different epidemiological settings there are perspectives on treating asymptomatic infections for malaria elimination [48]. In the study area, the results demonstrated that, in general, multiple molecular targets (i.e., ribosomal plus non-ribosomal) did not increase sensitivity to detect subclinical malaria infections. Despite of that, the NR-qPCR developed here was the most sensitive protocol to detect submicroscopic asymptomatic malaria infections, which resulted in a significantly higher prevalence of submicroscopic infections (70 out of 73, 96%) when compared to that detected by ribosomal PCR assays (57 out of 73, 78%). While more sensitive amplification of *18S rRNA* gene has been described [39, 49], the likelihood of amplify *18S rRNA*

gene was dependent on (i) large blood volume (2 mL); (ii) careful removal of plasma and buffy coat as prerequisite to avoid interference during PCR processing; (iii) concentration of purified DNA dehydrated in a centrifugal vacuum concentrator; additionally, these "high-volume" 18S rRNA PCR strategy did not allow the detection by species (only *Plasmodium* spp.) [39].

The apparent ability of Pvr47/Pfr364 NR-qPCR to increase sensitivity to investigate the true prevalence of malaria infection is relevant as an unexpectedly large reservoir of infections may hinder control and elimination of malaria in the Americas [3, 50]. These findings are critical as both subclinical and submicroscopic malaria carriers remain untreated in the Brazilian Amazon region and therefore might remain infective over long periods of time [12]. As parasite densities cannot be assumed as a static parameter and thus may fluctuate over time falling below the detection threshold of the assay [51], future studies should approach longitudinal PCR-malaria surveys. Although the NR-qPCR developed here may constitute powerful additive tools to identify endemic sites where relevant control measures have to be settled and monitored [52], the costs of PCR-based assays limited such type of study. In general, nucleic acid amplification tests (NAATs) require expensive equipment available, well-equipped laboratories, qualified personnel, and large quantities of disposable supplies that need to be frozen or refrigerated, which is sometimes difficult in the country [41, 53]. Currently, WHO recommends that the use of NAATs be considered only for epidemiological research or surveys mapping submicroscopic infections in low transmission areas [54]. Innovative and cost-effective strategies that identify the real burden of malaria infections (those detected by qPCR) are required to reach malaria elimination goals, but remain a challenge [48].

Assuming that the NR-qPCR developed here seems to be the most sensitive method—as it was positive in a number of samples not detected by other PCR protocols—the results suggested that NR-qPCR has a lower detection threshold. Despite of that, it is important to clarify the technical limitations that apply for the definition of "reference standard" for PCR-detection of submicroscopic malaria infections. In general, the estimative of test accuracy are based on the assumptions that the reference standard is 100% sensitive and that specific disagreements between the reference standard and the diagnostic test being evaluated (index test) result from incorrect classification by the index test [55]. However, this statement cannot be applied for the detection of low-density malaria infections because there is no "gold-standard". While the conventional microscopy diagnostic present high number of false negatives at low parasite density [41], there is no

consensus about a PCR assay able to detect all malaria infections [25]. Due to these inherent limitations, the "reference standard" for each molecular diagnostic method was defined as a combination of positive detections by any PCR assay, excluding the method under evaluation, as described before [23]. Consequently, "false positive" in this type of analysis is considered in the sense that no other PCR method found these infections. In this scenario, the findings unlikely represent a tendency to false positive by NR-qPCR as it was established by (i) end-point titration of well-characterized field samples, including mono and artificial mixed-infections; (ii) reproducibility of replicates at low levels of parasitaemia; (iii) no amplification with gDNA samples from malaria-free volunteers; (iv) no cross-reactivity with other *Plasmodium* species. Furthermore, considering the rules for quality assessment of diagnostic accuracy studies (QUADAS-2) [56], the risk of bias of the present study was reduced as methodological design involved: (i) structured sample size calculations and random selection of malaria-exposed individuals, with explicit exclusion criteria defined in methods; (ii) in the estimative of sensitivity and/or specificity, the diagnostic test being evaluated was clearly interpreted before the reference standard was known; (iii) the execution of the PCR-based assays and the definition of reference standard were described in sufficient detail to permit replication of the test. Consequently, valuable malaria information can be retrieved from the current study.

Finally, relatively low frequencies of mixed-malaria infections were detected here, which precluded a more detailed evaluation of the potential of Pvr47/Pfr364 to detect mixed-malaria infections in the field. In the Amazon area, besides *P. vivax* being the predominant malaria parasite [27, 29], the progress achieved in malaria control has decreased the number of *P. falciparum* cases in recent years [57]. Notwithstanding this study limitation, it is highly relevant the results from the end-point titration experiments showing the ability of Pvr47/Pfr364 to consistently detect *P. vivax/P. falciparum* co-infection, as the accurate detection of malaria mixed-infections seems to be critical for control and management of malaria [43, 44]. In fact, disease burden due to mixed species infections remains largely unknown, and this limitation have the potential to influence decisions on testing vaccines and new antimalarial drugs [58]. As malaria has been re-emerging in areas where it was previously controlled, dealing with mixed malaria infection cannot be bypassed, as recent evidence suggest that the frequency of these infections may be much higher than previously expected [44], including in the Amazon region [59]. Due to the risk of *P. falciparum* reemergence from Amazonian

neighboring countries with high transmission rates, a cross-border malaria study to evaluate the relevance of NR-qPCR in mixed-malaria infections are on progress.

## Conclusion

Although the simultaneous use of ribosomal and non-ribosomal PCR-targets did not impact the molecular diagnosis of malaria, the amplification of Pfr364 and Pvr47 multi-copy targets by the NR-qPCR seems to be a valuable tool in detection of subclinical and mixed *P. vivax*/*P. falciparum* infections, even though one of the species was present in a ratio of hundred-times lower than the other species.

## Additional files

**Additional file 1.** Analytical evaluation of NR-qPCR assay.

**Additional file 2.** Amplification curves of NR-qPCR performed on field samples infected with *P. vivax* (n = 3; red), *P. falciparum* (n = 3; blue), *P. malariae* (n = 3; green), and *P. brasilianum* DNA (n = 1; orange). The amplification plots are shown for (A) Pvr47 and (B) Pfr364 assays.

**Additional file 3.** Five-fold dilution of *P. vivax*-Pvr47 and *P. falciparum*-Pfr364 plasmids amplified by NR-qPCR.

**Additional file 4.** Conditions of the Nested-PCR, R-qPCR, and NR-cPCR assays. The primers/probes used for *P. vivax* and *P. falciparum* targets were the original described. The products of nested-PCR and NR-cPCR were visualized by 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

**Additional file 5.** Limit of detection (LOD) for (A) Pvr47 and (B) Pfr364 targets amplified by NR-qPCR. Probit regression analysis was used on logarithmic scale using nine points of NR-qPCR standard curves (20,000 to 0.05 copies/ $\mu$ L). The calculated regression curves (blue lines) indicate the probability (y-axis) of obtaining positive results at any template concentration, and dashed brown lines shows 95% confidence intervals. Dashed black lines correspond to the lower DNA concentration in which 95% of positive samples were detected (0.66 copies/ $\mu$ L of Pvr47 and 3.27 copies/ $\mu$ L of Pfr364).

## Abbreviations

18S rRNA: small subunit 18S of the ribosomal RNA gene; NR: non-ribosomal; PCR: polymerase chain reaction; NR-qPCR: non-ribosomal real-time PCR; NR-cPCR: non-ribosomal conventional PCR; R-qPCR: ribosomal real-time PCR; IQR: interquartile range; gDNA: genomic DNA; LM: light microscopy; LOD: limit of detection.

## Authors' contributions

LHC, CFAB, and TNS led the conception and study design. LCA contributed to the study design, performed PCR assays, and data analysis. DRR and LFFG performed PCR assays based on the amplification of 18S rRNA gene. JEL, CJFF, DBP and FSK participated in the field study. LCA, TNS and LHC wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. <sup>3</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. <sup>4</sup> Hospital Júlio Müller, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. <sup>5</sup> Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), Porto Velho, Rondônia, Brazil.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the MRA/Bei Resources/NIAD/NIH-VATCC for providing the genomic DNA of the *P. brasilianum* Peruvian II strain (MRA-349). We also thank the Programme for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of the DNA sequencing (RP101E) and Real-Time PCR (RP109D) facilities. This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Research Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG) and Program of Excellence in Research/Diagnosis (Proep/IRR/FIOCRUZ). Fellowships from CNPq (LHC, CFAB, TNS, CJFF, DRR) and CAPES (LCA, LFFG) are also acknowledged. The authors declare that the study was conducted in the absence of any financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

The authors confirm that all data reported in the manuscript are publicly available.

## Consent for publication

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

Ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the René Rachou Institute/Oswaldo Cruz Foundation (Protocols Nos. 24/2008, and 1.821.955/2016), according to the Brazilian National Council of Health (Resolutions 196/96 and 466/12). All participants were informed about the objectives and procedures of the study, with voluntary participation through written informed consent.

## Funding

The study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Research Foundation of Minas Gerais (FAPEMIG), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES; Finance code 001)—Finance Code 001. Scholarships from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel/CAPES (LCA, LFFG) and CNPq (DRR, LHC, CFAB, TNS, CJFF) are also acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 11 February 2019 Accepted: 13 April 2019

Published online: 30 April 2019

## References

1. WHO. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization; 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>. Accessed 9 Apr 2019.
2. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol*. 2017;47:145–52.
3. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MWG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017;16:273.
4. Rabinovich RN, Drakeley C, Djimde AA, Hall BF, Hay SI, Hemingway J, et al. malERA: an updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLoS Med*. 2017;14:e1002456.
5. Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, Peto T, Lwin KM, Vihokhem B, et al. Numerical distributions of parasite densities during asymptomatic malaria. *J Infect Dis*. 2016;213:1322–9.
6. Tadesse FG, Van Den Hoogen L, Lanke K, Schildkraut J, Tetteh K, Aseffa A, et al. The shape of the iceberg: quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malar J*. 2017;16:99.

7. Lamptey H, Ofori MF, Kusi KA, Adu B, Yeboah EO, Baafour EK, et al. The prevalence of submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage and multiplicity of infection in children, pregnant women and adults in a low malaria transmission area in Southern Ghana. *Malar J*. 2018;17:331.
8. Bejon P, Andrews L, Hunt-cooke A, Sanderson F, Gilbert SC, Hill AVS. Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malar J*. 2006;5:104.
9. Haanshuus CG, Chandy S, Manoharan A, Vivek R. A high malaria prevalence identified by PCR among patients with acute undifferentiated fever in India. *PLoS ONE*. 2016;11:e0158816.
10. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e3413.
11. Moreira CM, Shehata MA, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2015;14:360.
12. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*. 2018;11:194.
13. Alves FP, Gil LH-S, Marelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Pereira Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 2005;42:777–9.
14. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otiemo S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SASR. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:470–4.
15. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. "Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med*. 2016;13:e1001942.
16. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu PZ, Jarra W, Pinheiro I, Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315–20.
17. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hirrikson HR, Bille JJK. 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;42:5636–43.
18. Mangold KA, Manson RJ, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, Peterson LRK. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2435–40.
19. Murphy SC, Prentice J, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86:383–94.
20. Kamau E, Alemayehu S, Feighali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PLoS ONE*. 2013;8:e71539.
21. Mercereau-Pujalon O, Barale J, Bischoff E. Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *Int J Parasitol*. 2002;32:1323–44.
22. Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BAM, Gomes LT, Fernandes Fontes CJ, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:21–8.
23. Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:1108–16.
24. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2411–8.
25. Hofmann NE, Mwingira F, Shekalaghe S, Robinson LI, Mueller I, Felger I. Ultra-sensitive detection of *Plasmodium falciparum* by amplification of multi-copy subtelomeric targets. *PLoS Med*. 2015;12:e1001788.
26. Gruenberg M, Maniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malar J*. 2018;17:55.
27. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012;17:989–1000.
28. Souza-silva A, Brito CFA, Adams JH, Kano FS, Carvalho LH. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBP-II) immunity. *PLoS ONE*. 2014;9:e93782.
29. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BA, Sousa TN, Alves JR, Rocha RS, Fontes CJ, Sanchez BA, Adams JH, Brito CF, Pires DE, Ascher DB, Sell AMCL. The presence, persistence and functional properties of *Plasmodium vivax* duffy binding protein II antibodies are influenced by HLA class II allelic variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0005177.
30. Ladeira-Andrade S, Ferreira MJ, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:452–9.
31. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Sousa N, Soares IS, et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: a nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS ONE*. 2018;13:e0207244.
32. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. [http://bvsvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_diagnostico\\_laboratorial\\_malaria\\_2ed.pdf](http://bvsvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf). Accessed 9 Apr 2019.
33. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. [http://bvsvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsvms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf). Accessed 9 Apr 2019.
34. Olsson ML, Hansson C, Arent ND, Åkesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*. 1998;38:168–73.
35. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193:673–5.
36. Lloyd YM, Esemu LF, Antallan J, Thomas B, Yunga ST, Obase B, et al. PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial *cox3* and *varATS* primers. *Trop Med Health*. 2018;46:22.
37. Meerstein-Kessel L, Andolina C, Carrio E, Mahamar A, Sawa P, et al. A multiplex assay for the sensitive detection and quantification of male and female *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Malar J*. 2018;17:441.
38. Andrews L, Andersen RF, Webster D, Dunachie S, Walther RM, Bejon P, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:191–8.
39. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NPJ, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3303–9.
40. Lucchi NW, Oberstaller J, Kissinger JCV. Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era. *Public Health Genomics*. 2013;16:37–43.
41. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28:446–54.
42. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:633–40.
43. Ehtesham R, Fazaeli A, Raeesi A, Keshavarz H, Heidari A. Detection of mixed-species infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by nested PCR and rapid diagnostic tests in southeastern Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:181–5.
44. Singh US, Siwal N, Pande V, Das A. Can mixed parasite infections thwart targeted malaria elimination program in India? *Biomed Res Int*. 2017;2017:2847548.
45. Oliveira-ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Taui PL, Daniel-ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
46. Sampaio VS, Siqueira AM, Costa G, Paula M, Mourão G, Monteiro WM, et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(Suppl 1):4–11.
47. Adams JH, Mueller I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:9.

48. Jaitoh F, Masunaga Y, Okebe J, Alessandro UD, Balen J, Bradley J, et al. Community perspectives on treating asymptomatic infections for malaria elimination in The Gambia. *Malar J*. 2019;18:39.
49. Irmwong M, Nguyen TN, Tripura R, Peto T, Lee SJ, Lwin KM, et al. The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malar J*. 2015;14:381.
50. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.
51. Nguyen T, Seidlein LV, Nguyen T, Truong P, Hung SD, Pham H, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:565–72.
52. Niang M, Diop F, Niang O, Sadio BD, Sow A, Faye O, et al. Unexpected high circulation of *Plasmodium vivax* in asymptomatic children from Kédougou, southeastern Senegal. *Malar J*. 2017;16:497.
53. Berzosa P, De Lucio A, Barja MR, Hemador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar J*. 2018;17:333.
54. WHO. Nucleic acid amplification-based diagnostics. Geneva: World Health Organization. 2018. <https://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/nucleic-acid-amplification-tests/en/>. Accessed 9 Apr 2019.
55. Biesheuvel C, Irwig L, Bossuyt P. Observed differences in diagnostic test accuracy between patient subgroups: is it real or due to reference standard misclassification? *Clin Chem*. 2007;53:1725–9.
56. Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011;155:529–36.
57. Siqueira AM, Mesones-Iapoube O, Marchesini P, Sampaio VDS, Brasil P, Tsui PL, et al. *Plasmodium vivax* landscape in Brazil: scenario and challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(Suppl 6):87–96.
58. Zimmerman PA, Mehlotra RK, Kasehagen LJK. Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? *Trends Parasitol*. 2004;20:440–7.
59. Camargo M, León SCS, Del Rio-ospina L, Pérez AC, González Z, González E, et al. Micro-epidemiology of mixed-species malaria infections in a rural population living in the Colombian Amazon region. *Sci Rep*. 2018;8:5543.

**Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:**

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)

