



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ILMD

INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

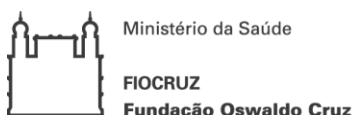
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO Interação)**

RAIMUNDA SANDRA PACHECO DE SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS DE BAÇO A SEREM USADOS
COMO FONTE DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DA MALÁRIA HUMANA**

MANAUS – AM

2022



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ

INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM BIOLOGIA DA
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO (PPGBIO Interação)**

RAIMUNDA SANDRA PACHECO DE SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS DE BAÇO A SEREM USADOS
COMO FONTE DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DA MALÁRIA HUMANA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro.

ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCUS VINÍCIUS GUIMARÃES DE LACERDA

CO-ORIENTADOR: Prof^o. Dra. GISELY CARDOSO DE MELO

MANAUS – AM

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S729p

Souza, Raimunda Sandra Pacheco

Padronização dos cortes histológicos de baço a serem usados como fonte de material biológico para o diagnóstico molecular da malária humana. / Raimunda Sandra Pacheco Souza. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

78 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda.
Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Gisely Cardoso de Melo.

1. Malária 2. Plasmodium vivax I. Título

CDU 616.936(043.3)

CDD 616.9362

22. ed.

RAIMUNDA SANDRA PACHECO DE SOUZA

**PADRONIZAÇÃO DOS CORTES HISTOLÓGICOS DE BAÇO A SEREM USADOS
COMO FONTE DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DA MALÁRIA HUMANA**

Aprovada em: 30/08/2022

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Ciências, com área de concentração em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dra – Gisely Cardoso de Melo
Universidade do Estado do Amazonas – UEA/AM

Prof^a. Dra – Stefanie Costa Pinto Lopes
Instituto Leônidas e Maria Deane- ILMD/FIOCRUZ

Prof^o. Dra – Giselle Maria Rachid Viana
Instituto Evandro Chagas-IEC/PA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por toda força e por não me deixar desistir dos meus sonhos, e sempre ouviu minhas orações.

Aos meus pais Sebastião e Maria do Carmo, por ter sido meu ombro amigo nos momentos de desespero, por terem me apoiado e me incentivado a seguir em frente. Sem vocês não teria tido forças e nem motivação para continuar na realização desse sonho.

Ao meu esposo Ricardo por ter acreditado em mim, por suas ajudas concedidas, conselhos, motivações e abraços, por estar ao meu lado nessa trajetória. Por suportar meus momentos de estresse e desânimo.

Aos meus irmãos por terem sempre me incentivado e me ajudado na minha formação pessoal e profissional, que sempre ajudaram a cuidar de mim, as minhas sobrinhas por me darem tanto amor e serem a minha distração quando estava precisando.

Quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda por ter aceitado me orientar, a minha coorientadora Profa. Dra. Gisely Cardoso de Melo pelo apoio e por acreditar na minha capacidade, por sempre estar tirando minhas dúvidas, por ser extremamente presente, minha gratidão será eterna.

A professora Stefanie Lopes, pelo apoio como coordenadora pelo incentivo, e pela confiança depositada nos sonhos de tantas pessoas. E a todos os professores que tive a honra de receber ensinamentos.

Aos colegas Manuela Crispim e Antônio Kassio por terem me acompanhado intensamente nas atividades laboratoriais, a Laila Rowena por ter me dado vários conselhos e incentivos, a Emannuele Lira e Vanessa por todas as suas ajudas direta e indiretamente.

Agradeço a Dra. Monique Freire que foi fundamental para meu crescimento profissional e por ter contribuído para execução desse trabalho juntamente com o Dr. Luis Ferreira.

Aos meus colegas de mestrado por todo apoio, e a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização desse sonho, pois nós não chegamos a lugar nenhum sem ajuda de alguém.

Um ladrão rouba um tesouro, mas não furta inteligência. Uma crise destrói uma herança, mas não uma profissão, não importa se você não tem dinheiro, você é uma pessoa rica, pois possui o maior de todos os capitais: a sua inteligência. Invista nela. Estude.

Augusto cury

RESUMO

A malária continua sendo um problema de saúde pública e dentre as formas graves da doença encontra-se a malária esplênica ocasionada, principalmente, pelo *Plasmodium vivax*. O diagnóstico padrão ouro é a gota espessa, porém apresenta limitações como necessidade de microscopistas treinados, leitura difícil e cansativa, etc., dificultando o controle efetivo da malária. O objetivo do estudo foi padronizar cortes histológicos de baço a serem usados como fonte de material biológico para o diagnóstico molecular da malária humana. Foi selecionado uma amostra de baço incluída em parafina sabidamente positiva para *P. vivax*, foi realizado a microtomia com diferentes quantidades e espessuras, sendo seis, oito, dez, quinze, vinte e vinte e cinco cortes histológico com espessura 10 µm e outros cinco e dez cortes com espessura de 20 µm. Foi realizado a desparafinização com xilol e etanol e álcool 70% ,foi testado uma lavagem com xilol uma com etanol absoluto e uma com álcool a 70%. Uma lavagem de xilol e uma de etanol retirando o álcool 70% e posterior duas lavagens de xilol e etanol, após a desparafinização os tecidos foram secos em temperatura ambiente e pesados em balança analítica. A extração de DNA foi feita com kits comerciais sendo um específico para sangue (DNA Blood Minikit) e o outro para tecido (QIAamp FAST DNA Tissue kit) . Foi realizada a qPCR para *Plasmodium* sp. com alvo no gene *18S* e *P. vivax* em regiões conservadas do gene *PvmtCOX1*. Então, foram selecionadas amostras do anode 2021de um laboratório referência para exame histopatológico em Manaus, Amazonas para serem analisadas como teste, as amostras foram testadas para gênero específico,e espécie específico de *Plasmodium* sp. e também para DNA humano. Padronizou-se cortes histológicos, bem como a desparafinização e método de extração de DNA. A amostra com dez cortes e espessura de 20 µm desparafinada com duas lavagens de xilol e duas de etanol absoluto com peso de 40 mg, com o DNA extraído a partir de ambos os kits, com concentração de DNA de 50ng/µL para kit de sangue e 55ng/µL para kit de tecido apresentou-se positiva na qPCR para gênero e espécie específico. E a amostras analisadas como teste apresentaram-se negativa na qPCR para gênero e espécie específico e positiva para DNA humano.

Palavras-chave: Esplênica. Malária. *Plasmodium vivax*. Extração DNA. Diagnóstico.

ABSTRACT

Malaria continues to be a public health problem and among the severe forms of the disease is splenic malaria caused mainly by *Plasmodium vivax*. The gold standard diagnosis is thick sputum, but it has limitations such as the need for trained microscopists, difficult and tiring reading, etc., making it difficult to effectively control malaria. The objective of the study was to standardize histological sections of the spleen to be used as a source of biological material for the molecular diagnosis of human malaria. A spleen sample embedded in paraffin known to be positive for *P.vivax* was selected, microtomy was performed with different amounts and thicknesses, with six, eight, ten, fifteen, twenty and twenty-five histological sections with a thickness of 10 μm and another five and ten slices with a thickness of 20 μm . Deparaffinization was performed with xylol and ethanol and 70% alcohol, a wash with xylol, one with absolute ethanol and one with 70% alcohol was tested. One xylol wash and one ethanol wash, removing the 70% alcohol and two xylol and ethanol washes. After deparaffinization, the tissues were dried at room temperature and weighed on an analytical balance. DNA extraction was performed with commercial kits, one specific for blood (DNA Blood Minikit) and the other for tissue (QIAamp FAST DNA Tissue kit). qPCR was performed for *Plasmodium* sp. targeting the 18S gene and *P. vivax* in conserved regions of the PvmtCOX1 gene. Then, samples from the year 2021 were selected from a reference laboratory for histopathological examination in Manaus, Amazonas to be analyzed as a test, the samples were tested for specific genus, and specific species of *Plasmodium* sp. and also for human DNA. Histological sections were standardized, as well as the deparaffinization and DNA extraction method. The sample with ten sections and 20 μm thickness, dewaxed with two washes of xylol and two washes of absolute ethanol weighing 40 mg, with DNA extracted from both kits, with a DNA concentration of 50ng/ μL for a blood kit e55ng/ μL for tissue kit was positive in qPCR for specific genus and species. And the samples analyzed as a test were negative in qPCR for specific genus and species and positive for human DNA.

Keywords: Splenic. Malaria. *Plasmodium vivax*. DNA extraction. Diagnosis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AVE*	Não informado pelo autor
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DX*	Não informado pelo autor
IPCCB	Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema
FMT- HVD	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
RDT	Teste Rápido de Diagnóstico
RNA	Ácido Ribonucleico
VXL*	Não informado pelo autor

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de Risco da malária, 2021.	12
Figura 2 - Distribuição da Malária no Estado do Amazonas em 2019 e 2020, a cor azul escuro mostra municípios com maior número de casos em 2019 e 2020, em azul claro apenas em 2019 e azul médio em 2020.	13
Figura 3 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i> sp. 1) Transmissão do <i>Anopheles</i> sp. para o homem e forma infectante 2) Ciclo pré-eritrocítico 3) Ciclo eritrocítico 4) Ciclo no vetor.....	15
Figura 4 - Localização do Baço. Fonte: Health hype. Adaptado:(59).	20
Figura 5 - Local de realização do estudo.	24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia da Malária no Mundo	11
1.2 Epidemiologia da malária no Brasil	11
1.2.1 Epidemiologia da Malária no Amazonas	12
1.3 Malária	13
1.4 Manifestações Cínicas da Malária	15
1.5 Diagnóstico da Malária	16
1.5.1 Diagnóstico Microscópico	16
1.5.2 Diagnóstico Molecular	17
1.7 A Importância do Baço	19
1.7.1 Baço e Malária	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Modelo de estudo	24
3.2 Aspectos éticos	25
3.3 Amostra e coleta de dados	25
3.3.1 Coleta das amostras.....	25
3.3.2 Cortes Histológicos	25
3.3.3 Desparafinização	25
3.3.4 Extração de DNA	26
3.3.5 PCR em Tempo Real.....	26
3.3.6 Amostras de baço	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

4 CONCLUSÃO	48
6. REFERÊNCIAS GERAIS (DA DISSERTAÇÃO) – Vancouver ou NBR 6023/2018.....	49
7. ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Malária no Mundo

A malária é um problema de saúde pública em vários países da África, Ásia e América, sendo de grande impacto na saúde e no desenvolvimento econômico de pessoas residentes em regiões tropicais e subtropicais. A maioria dos casos de mortes ocorrem na África Subsaariana, porém outros continentes também são afetados(1).

De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) 36,5% da população do continente americano encontram-se sob risco de adquirir malária, sendo o Brasil é o país com maior número de casos (2). Em 2020, foram notificados 241 milhões casos de malária em 85 países, e 2019 foram registrados 227 milhões. Em 2020, ocorreram 627 mil óbitos, 12% a mais em relação a 2019(3). Nas Américas, ocorreram 500 mil casos de malária, sendo o Brasil responsável por 42% dos casos.

1.2 Epidemiologia da malária no Brasil

A malária é uma das principais doenças endêmicas parasitárias no Brasil, aproximadamente de 99,9% da transmissão da malária no Brasil ocorrem na região Amazônica, com 33 municípios concentrando 80,0% do total de casos autóctones de malária em 2020 (4). A maioria dos casos ocorrem em regiões de baixa a moderada endemicidade, e pode infectar repetidamente pessoas de todas as idades em áreas de maior risco (Figura 1) (5).

A distribuição da malária manifesta-se em grande heterogeneidade espacial. Tornando ainda mais evidente nos inquéritos realizados em unidade menores como pequenas comunidades rurais e vilarejos(6).

A ocupação desordenada da Região Amazônica, construção de usinas hidrelétricas, exposição aos vetores como em áreas de mineração e garimpos, assentamentos agrícolas e desenvolvimento agropecuário, contribuem para o aumento da transmissão da malária (7). Além disso, outros fatores importantes são: as condições climáticas como temperatura, umidade e pluviosidade, o uso inadequado de antimaláricos, e a ausência de infraestrutura social (8).

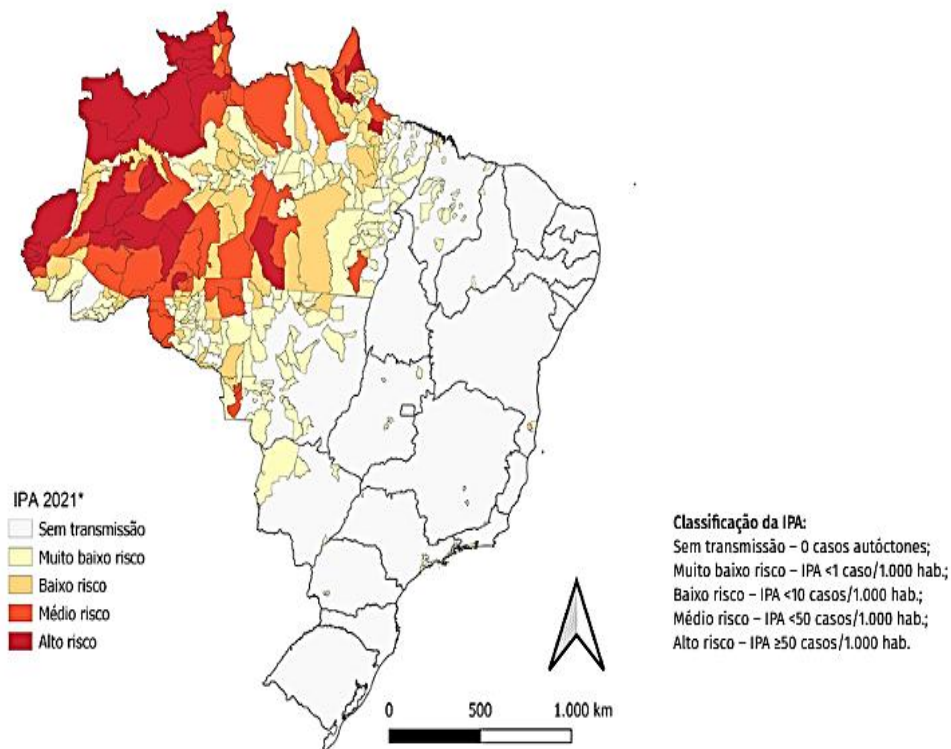


Figura 1 - Mapa de Risco da malária, 2021.

Fonte: (9).

1.2.1 Epidemiologia da Malária no Amazonas

Aproximadamente 40% dos casos registrados na região Amazônica são provenientes do Estado do Amazonas (9). Isso ocorre por conta das condições que favorecem a transmissão: alta densidade de vetores da malária, desmatamento, extensão geográfica e as condições ambientais e populações residindo em condições inadequadas (6)

Em 2021, foram notificados 60.380 casos de malária autóctone (Figura 2). Sendo o *P. vivax* responsável pela maioria dos casos (10). A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) localizada em Manaus, é referência para pesquisa e assistência a doenças tropicais no Amazonas, no período de 2015 a 2019 foram atendidos 13.245 casos positivos, sendo o *P. vivax* a espécie prevalente, responsável por 98,1% dos casos (11).

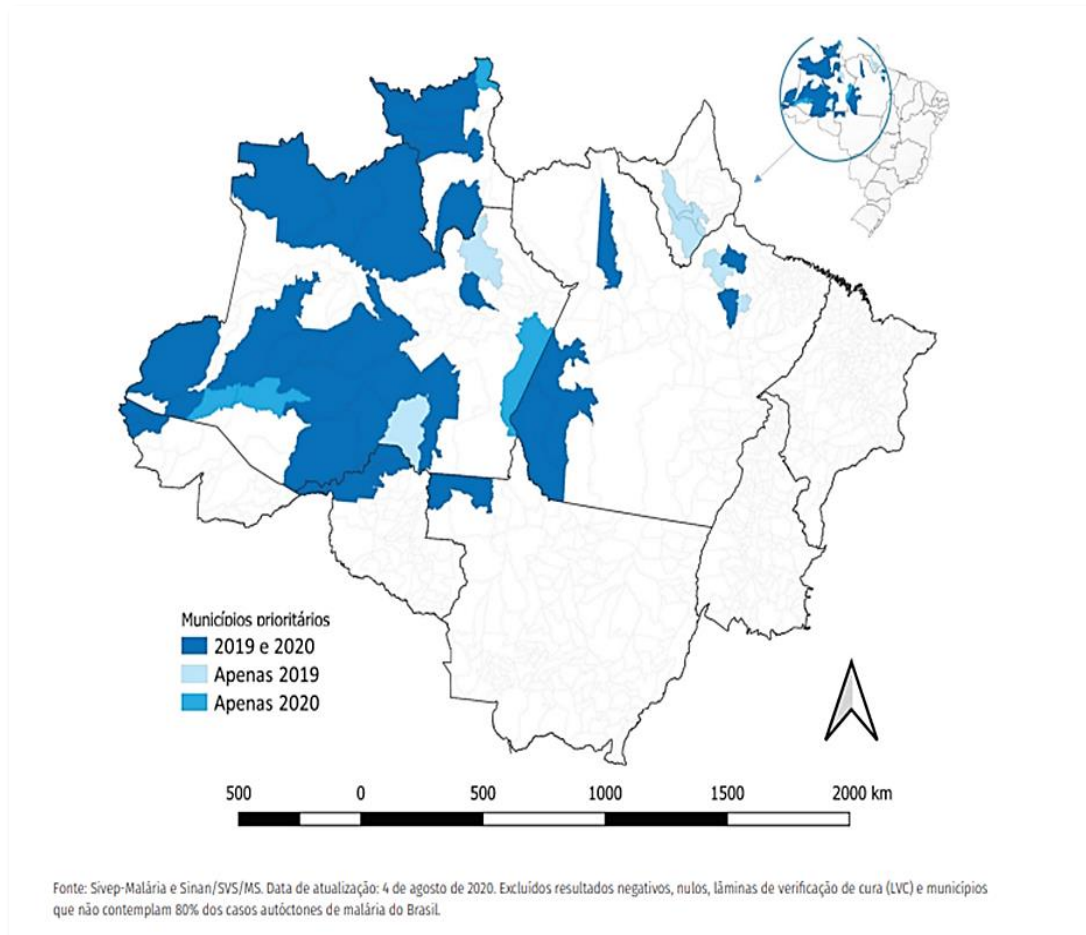


Figura 2 - Distribuição da Malária no Estado do Amazonas em 2019 e 2020, a cor azul escuro mostra municípios com maior número de casos em 2019 e 2020, em azul claro apenas em 2019 e azul médio em 2020.

Fonte. Fonte: (13).

1.3 Malária

A malária é uma doença infecciosa parasitária, causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, disseminados pela picada dos mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Anopheles* (12). Estas podem transmitir sete espécies de malária humana: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. simium*, *P. cynomolgi* (13). A fêmea anofelina ao realizar o repasto sanguíneo, inocula os esporozoítos na corrente sanguínea, através da saliva (Figura 3) (14).

Os esporozoítos migram para o fígado iniciando a fase pré-eritrocítica ou esquizogonia hepática, os esporozoítos invadem os hepatócitos, onde ocorre a divisão intracelular assexuada. Ao finalizar esta fase milhares de merozoítos exoeritrocíticos são liberados na circulação sanguínea. O

tempo para encerrar esta fase varia de acordo com cada espécie, sendo em média uma a duas semanas (Figura 3) (15).

Os merozoítos são liberados na corrente sanguínea através dos merossomos, são pequenas estruturas vesiculares formadas a partir da membrana plasmática do hepatócito. Esses merossomos infectam os eritrócitos na corrente sanguínea, iniciando o segundo estágio da reprodução assexuada a fase eritrocítica (16). Também chamada de esquizogonia sanguínea, os merozoítos desenvolvem-se no interior dos eritrócitos, e evoluem para trofozoítos jovens, logo em seguida passam a ser trofozoítos maduros, através da divisão nuclear tornam-se esquizontes, cada esquizonte libera de 8 a 16 merozoítos na circulação sanguínea, os merozoítos invadem as hemácias, iniciando o ciclo mitótico e dando origem a novos esquizontes, e reiniciando o ciclo eritrocítico (Figura 3) (17).

O ciclo eritrocítico ocorre em intervalos regulares entre 48 à 72 horas de acordo com a espécie, estas repetições ocasionam o aumento da carga parasitária, manifestações clínicas e redução no número de plaquetas(18). Quando acontece uma nova picada por mosquito *Anopheles*, após a ingestão de gametócitos, no intestino delgado do mosquito, rapidamente decorre a divisão celular dos gametócitos em microgametas e macrogametas, e estes se fertilizam originando o oocineto, e na parte exterior do intestino formam o oocisto, estes oocistos ao se romperem formam milhares de esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito, e tornam-se apto a infectar outro indivíduo (Figura 3) (19).

Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* durante a esquizogonia hepática, ocorre a formação de estruturas que ficam dormentes no fígado, denominados hipnozoítos, que podem permanecer por meses ou anos nos hepatócitos e causar recaída da doença com ressurgimento dos sintomas após anos de transmissão (20).

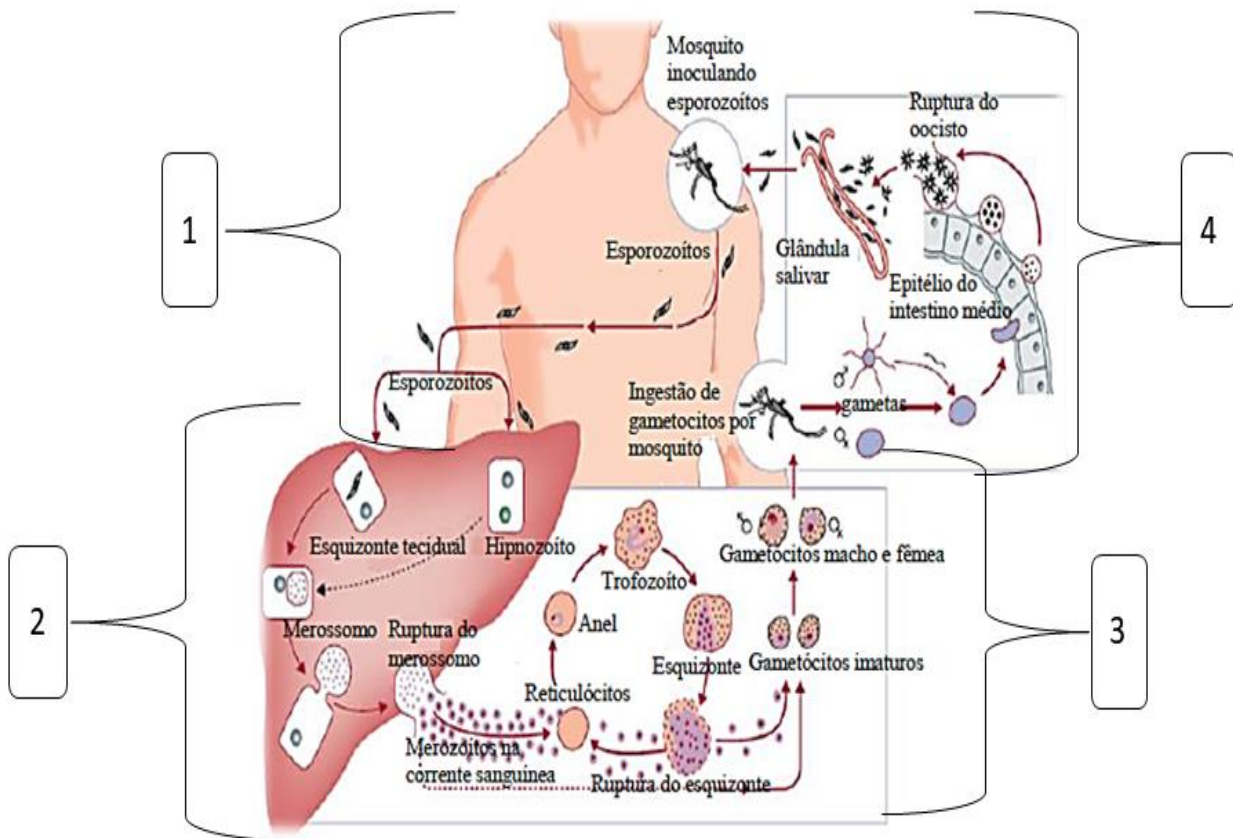


Figura 3 - Ciclo biológico do Plasmodium. 1) Transmissão do esporozoíto (forma infectante) para o homem 2) Ciclo pré-eritrócítico 3) Ciclo eritrócítico 4) Ciclo no vetor.

Fonte: Adaptado de (23).

1.4 Manifestações Clínicas da Malária

As manifestações clínicas da malária iniciam-se após um período de incubação, que varia de acordo com a espécie causadora da infecção, em média de 7 a 21 dias para o *P. vivax* e de 7 a 12 dias para o *P. falciparum*. Sintomas como mal-estar, inquietação, sonolência, recusa alimentar, cefaleia e náuseas podem ocorrer antes do paroxismo febril (sudorese, calafrio e febre) (21). O paroxismo febril que pode ter um intervalo de 48 a 72 horas dependendo da espécie infectante (22)

O *P. falciparum* é considerado o mais propenso a desenvolver formas graves, pois sua multiplicação ocorre rapidamente na circulação sanguínea, é capaz de destruir de 2% a 25% do total de hemácia e ocasionar anemia grave, possui capacidade de modificar sua estrutura possibilitando a adesão entre si e nas paredes dos vasos sanguíneos, podendo causar sérios problemas como trombose

ou embolias em órgãos (23). Em infecções por *P. falciparum* o tratamento deve ser imediato, ou seja, nas primeiras 24 horas do início da febre (24).

O *P. vivax* é responsável pela malária não complicada, que na maioria das vezes não atinge 1% das hemácias e, podendo ocorrer a diminuição no número de plaquetas, podendo confundir com outras doenças e causando um retardo no diagnóstico e tratamento (25) Além disso se não houver tratamento correto os hipnozoítos podem provocar recaídas, dificultando o controle da doença (26). (27)

Outros sinais e sintomas da malária encontra-se cefaleia, febre, náuseas, vômitos, dor abdominal, hepatoesplenomegalia, diarreia, tosse, icterícia, urina escura, taquicardia, colapso hemodinâmico, são sintomas característicos da forma grave da doença (28). Na prática clínica, alguns pacientes podem não apresentar paroxismo febril, sendo os casos assintomáticos, são indivíduos que podem contribuir com a transmissibilidade do *Plasmodium* por não haver diagnóstico e intervenção terapêutica (29).

1.5 Diagnóstico da Malária

A confirmação diagnóstica da malária ocorre por meio da gota espessa (30). O diagnóstico hemoscópio, é bastante específico, porém a sensibilidade desta técnica pode ser comprometida diante de baixas densidades parasitárias e infecções mistas, embora microscopistas experientes e bem treinados sejam capazes de detectar intervalos de 5-50 parasitos/microlitro(31).

Nos últimos anos, o desafio em detectar a baixa parasitemia vem motivando a busca por métodos auxiliares, entre os métodos alternativos encontram-se os protocolos moleculares em PCR, que apresenta sensibilidade superior a microscopia padrão (32).

1.5.1 Diagnóstico Microscópico

O exame padrão ouro é a gota espessa corada por Giemsa analisada por microscopia óptica, é uma técnica de baixo custo e simples, podendo quantificar a densidade parasitária, e possibilita o monitoramento da resposta ao tratamento contra formas sanguíneas do parasito em casos de infecção positiva (33).

Mesmo sendo o método referência, apresenta leitura difícil de ser realizada pois é necessário tempo considerável para análise, além de equipamentos e insumos de boa qualidade e pessoas capacitadas, tanto para o preparo quanto para leitura das lâminas (34).

Estudos relatam que o número de indivíduos com baixa parasitemia tem sido maior do que com alta parasitemia, podendo persistir por vários meses (35). As pessoas imunes ao *Plasmodium* permanecem em situação de infecção sub-patente, estes casos diminuem a sensibilidade de detecção através do método de gota espessa, o que torna difícil a identificação de espécies por conta de densidades parasitárias abaixo do limite de detecção pela Gota Espessa, e permite a manutenção do ciclo do parasito, pelo qual estes indivíduos atuam como reservatórios (36).

Para complementar a microscopia óptica tem-se buscado novos métodos que possam aprimorar no diagnóstico da malária. Dentre esses, são encontrados os métodos moleculares que são bastantes promissores, detectam o material genético dos parasitos e possibilitam a identificação e diferenciação das espécies e infecções, sendo altamente sensíveis e específicos (37).

1.5.2 Diagnóstico Molecular

A PCR tem como princípio o uso de um par de iniciadores que reconhecem uma sequência alvo do DNA ou RNA de uma determinada espécie que, juntamente com a enzima *Taq polimerase*, permite a amplificação do material genético em uma amostra (38). Por conta disso, o diagnóstico molecular da malária vem se destacando como uma das ferramentas mais promissoras, considerando as altas sensibilidade e especificidade podendo alcançar até mesmo as infecções subclínicas (39).

A PCR para o diagnóstico de malária foi descrita em 1989 por Waters e McCutchan, baseados na região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal dos plasmódios, gene *18S* (*18rRNA*). A partir daí, o diagnóstico molecular para malária tem se baseado principalmente nessa sequência, baseada por regiões polimórficas enfraquecidas por regiões conservadas (40). Como o estudo de Almeida et al., (2018) que utilizou a metodologia de qPCR com o alvo *18S* e detectou *plasmodium* spp. e identificou a presença de gametócitos de *P. vivax* na maioria dos indivíduos estudados.(41).

Estudos com foco na detecção de *P. vivax* em órgãos também tem sido realizado como o de Lacerda et al. (2012), que realizaram um estudo retrospectivo e descritivo, em que autopsiou 19 óbitos de pacientes com diagnóstico de infecção por *P. vivax*. Na análise laboratorial, foram usadas 20 seções

de tecido de parafina de 10 µm do baço, do pulmão e cérebro para extração de DNA. Foi realizado Nested PCR usando concentração final de 200 ng de DNA para confirmar a infecção por *P. vivax* e descartar infecção por *P. falciparum*, nove pacientes foram classificados como portadores de *P. vivax* em que foi um dos principais contribuintes para levar estes pacientes a óbito. nos outros quatro, a espécie *P. vivax* mostrou ser um achado incidental e o restante não obtiveram *P. vivax* confirmado por PCR em amostras de tecido (42).

Outros estudos têm buscado melhorar o diagnóstico da malária através de método molecular como o desenvolvido por Gama et al. (2006) que padronizou um protocolo de PCR convencional e em tempo real para detecção de parasitos da malária gênero-específicas em indivíduos pauciparasitados. Para extração de DNA, utilizaram a técnica de Fenol-Clorofórmio e a PCR de gênero demonstrou que os resultados apresentaram 100% de concordância em comparação com as PCR espécie-específicas e exame de microscopia realizado em laboratório próprio (43).

Salwa et al. (2011) realizaram a validação da qPCR para caracterização de esplenomegalia maciça relacionada à infecção malárica, em que realizavam o exame de gota espessa e, posteriormente, a qPCR em sangue periférico e relacionavam a parasitemia com o tamanho do baço, e mostrou que o baço teve redução significativa após o tratamento de antimalárico. E que o uso de PCR apresentou taxa parasitária significativamente maior em infecções por *P. vivax* e mistas, em comparação com a microscopia (44).

Tem sido evidenciado que o DNA extraído a partir de tecidos emblocados em parafina pode ser utilizado para diagnóstico pela PCR, existindo inclusive estudos baseados em análises de sequências genômicas ou mitocondriais desse tipo de amostras (45). O avanço do diagnóstico molecular fez com que esse tipo de material que, anteriormente, era apenas utilizado em estudo histomorfológico, fosse também solicitado para estudos moleculares. A obtenção de macromoléculas a partir desse tipo de amostra possibilita estudos de genes terapêuticos e estudos retrospectivos para a avaliação de várias doenças (46).

A PCR permite amplificação rápida e específica da sequência de ácidos nucléicos a partir de vários materiais como sangue, cabelo e tecidos frescos ou congelados, etc (47). A PCR, mesmo sendo bastante empregada, deve sempre passar por padronização para adequar às condições de amplificação. Para material parafinado deve haver atenção especial aos fatores endógenos e exógenos à reação, iniciando dos métodos de fixação até o tempo de vida útil do bloco de parafina (48).

Tecidos emblocados em parafina apresentam um valioso recurso que possibilita aplicar tecnologias modernas para verificar diversas patologias em várias populações, porém, existem poucos estudos que relatem sobre o controle de qualidade. Sendo assim, não se sabe se o armazenamento dessas amostras está em condições de temperatura adequada para impedir a degradação dos ácidos nucleicos (49).

1.7 A Importância do Baço

O baço é o maior órgão linfóide do organismo, localizado no hipocôndrio esquerdo, sob a proteção da arcada costal (Figura 4). Possui duas estruturas distintas, mas funcionalmente associadas. É constituído pela polpa branca, que tem como composição células do sistema imunológico, e pela polpa vermelha formada por filtrações e pela deposição de células do sangue (50).

Possui função de remover da circulação sanguínea as hemácias em processo de envelhecimento, anormais, imunologicamente comprometidas e outros elementos particulados do sangue. Também é responsável pela destruição de parasitos, que acontece mediante a rede de filtração localizada na polpa vermelha (51). É um órgão elemento chave para remoção de hemácias durante a infecção por *Plasmodium*, devido a isso a malária em pacientes esplenectomizados pode evoluir para forma grave (52).

As duas funções mais importante do baço são as imunológicas e fagocitárias. A filtração mecânica auxilia na fagocitose e destruição de patógenos dentro dos eritrócitos, na remoção de bactérias e/ou vírus que não foram ingeridos e opsonizados na circulação, na destruição de microrganismo para quais o hospedeiro não apresenta anticorpos específicos e na manutenção de hemácias (53).

Outra função importante é a manutenção da função imunológica normal do hospedeiro contra agentes infecciosos. Os indivíduos com ausência do baço são mais suscetíveis a infecções graves, com risco elevado para evolução com quadros de bacteremia e septicemia (54). Em infecções por *Plasmodium*, o aumento da carga parasitária resulta na necessidade de uma grande e rápida ampliação desta rede para divergir a parasitemia para poder garantir a resolução da infecção (55).

As indicações de esplenectomia pode ser de origem traumática ou não traumática. As indicações de causas traumáticas apresentam como principal causador os acidentes automobilísticos e os atropelamentos, e as indicações não traumáticas são ocasionadas por patologias que impedem a função normal do baço (53).

O trauma abdominal é um dos mais frequente, por conta do seu potencial lesivo, está relacionado a múltiplas complicações, o que aumentam as taxas de morbidade e mortalidade, e por esse motivo, vem sendo cada vez mais estudado. Acredita-se quando acometido por algum patógeno como o *Plasmodium*, podendo ficar mais vulnerável a sofrer ruptura em caso de algum evento traumático(56).

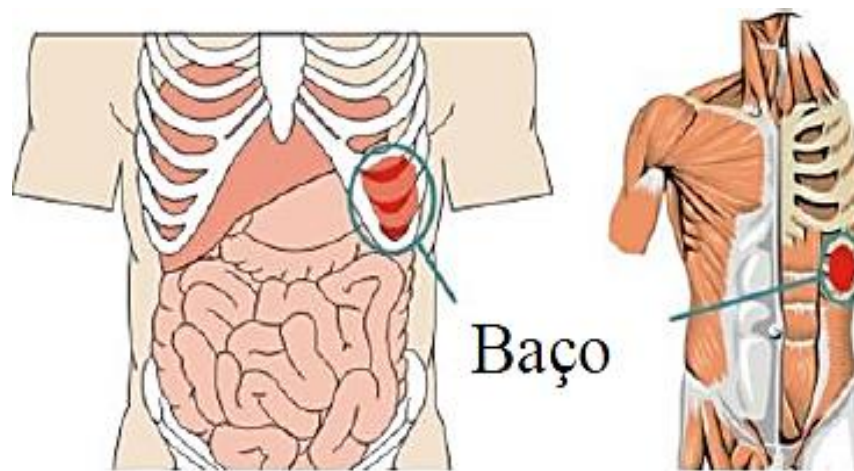


Figura 4 - Localização do Baço: espaço superior esquerdo da região abdominal, atrás do estômago e abaixo do diafragma, medindo aproximadamente 10 a 15 cm de diâmetro e com aspecto semelhante ao punho cerrado, estando protegido pelas costelas. Fonte: Health hype. Adaptado:(59).

1.7.1 Baço e Malária

A esplenomegalia é um indicador importante na endemicidade da malária, porém o conhecimento tem progredido lentamente, devido ao risco da punção esplênica. Mesmo assim, houve avanços em relação ao conhecimento sobre o papel do baço, principalmente, sobre controle inato da infecção (57)

A esplenomegalia é uma característica comum da malária, porém a ruptura esplênica representa uma complicação grave da malária, e é ocasionada principalmente pelo *P. vivax* (58). Uma grande biomassa de parasitos intactos da malária em estágios assexuados pode se acumular em baços de humanos assintomáticos infectados com *P. vivax*. Os mecanismos relacionados a essa afinidade não são claros. Há hipótese de que os reticulócitos imaturos, em que *P. vivax* se desenvolve, podem manifestar altas densidades no baço, sendo um nicho para a sobrevivência do parasito (59).

A zona marginal e a polpa vermelha são locais potenciais para a remoção dos eritrócitos (60). O baço, além de remover as hemácias parasitadas da circulação, também retira os parasitos de seu interior e devolve-as a circulação intacta (61). Na infecção malárica, ocorrem disfunções hematopoiéticas, tornando o baço um sítio hematopoiético extramedular. Quando o sangue entra no baço, o fluxo é reduzido na zona marginal, os antígenos podem ser capturados pelos macrófagos. Durante a infecção, todas as estruturas do baço se rearranjam, ocorre uma interação nessas estruturas, e migram de uma região para outra capacitando o baço para combater a infecção. Durante esse processo, os limites entre as polpas branca e vermelha e zona marginal praticamente somem (62).

O baço retém uma proporção de eritrócitos com trofozoítos e esquizontes, mas a retenção dos eritrócitos com esquizontes pode apresentar um leve impacto patogênico, uma vez que a maioria das formas maduras são sequestradas (citoaderência) em outros órgãos do corpo, o que impede a filtração pelo baço (63).

Em um estudo realizado em Manaus, paciente de 19 anos do sexo masculino deu entrada em um hospital da capital do estado do Amazonas com fortes dores abdominais após cair de uma árvore, através da ultrassonografia identificou-se ruptura esplênica, devido a isso foi submetido a esplenectomia, realizou-se PCR de fragmentos do baço, em que apresentou positividade para *P. vivax* (64).

Em outro estudo, com 55 casos de *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* foram analisados relatos de ruptura patológica do baço associada à malária publicados nos últimos 50 anos em cinco idiomas, A ruptura esplênica foi completa ($n = 50$), parcial ($n = 5$). A morte ocorreu em 12 pacientes (22%), 8 dos quais por colapso irreversível precoce ($n = 7$) ou morte inesperada ($n = 1$). A taxa de mortalidade foi maior entre os viajantes do que em outros pacientes, as características de ruptura em infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* foram meramente semelhante. (28). Na Amazônia brasileira, um paciente com ruptura esplênica espontânea diagnosticada com aparelho de ultrassom portátil logo após o início do tratamento e com parasitemia recorrente após esplenectomia em paciente do sexo masculino de 45 anos. Teve a monoinfecção confirmada por PCR do sangue periférico e de seções baço (65)

Na Indonésia, foi realizado uma coorte com exames microscópios e moleculares do baço e sangue periférico nos pacientes não tratados e submetidos a esplenectomia, infectados com *P. vivax* e *P. falciparum*, em comparação com o sangue periférico, eritrócitos não fagocitados se concentravam no baço (66). Esta observação traz informação importante para o papel da filtração do baço, porém

também sugere que o baço pode torba-se um abrigo para para os parasitos(63) e devido isso podem permanecer assintomáticos dificultando o diagnóstico (67). Outro estudo na Índia, a PCR apresentou taxa de parasitemia maior para *P. vivax* e infecções mistas em comparação com a microscopia e RDTs, sendo sugerido seu uso para investigar casos assintomáticos (68).

A incidência da malária esplênica ainda é, mais frequente em infecções primárias (69). Em infecções recorrentes, as alterações morfológicas no baço são graduais, resultando em tensão esplênica menos pronunciada. Para realizar o diagnóstico é necessário um elevado índice de suspeição clínica, o que pode ser associado a hipotensão, dor abdominal e diminuição nos valores de hematócritos, mas algumas pessoas podem permanecer quase assintomáticos, dificultando o diagnóstico, sendo necessário que indivíduos com infecção por *Plasmodium* sp. sempre realizem ultrassonografia para investigação de ruptura, em casos que o diagnóstico de ruptura seja confirmado e com indicação de esplenectomia, após a realização do procedimento é importante a realização da qPCR de seções do baço (67).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

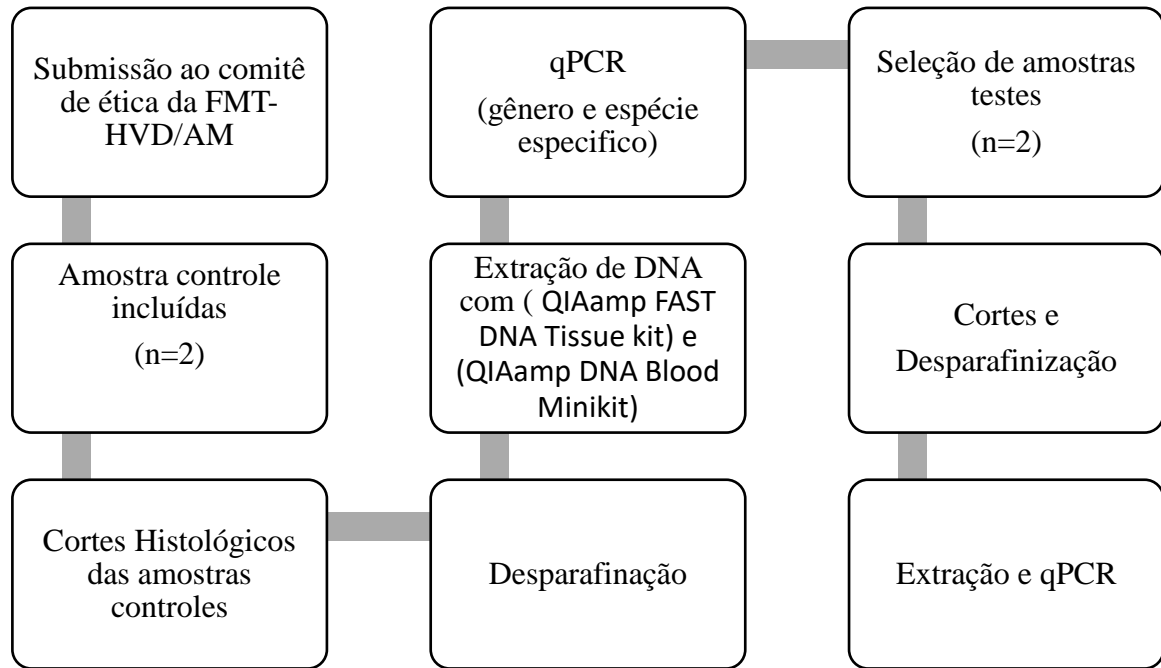
Padronizar cortes histológicos de baço a serem usados como fonte de material biológico para o diagnóstico molecular da malária humana.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer protocolo para extração de DNA de baço.
- Estabelecer protocolo de qPCR para detecção de malária utilizando alvo gênero específico.
- Estabelecer protocolo de qPCR para detecção de malária utilizando *PVMTOCX1* para *P. vivax*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo



3.2 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo transversal desenvolvido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) localizado na Fundação de Medicina Tropical (FMT-HVD) (Figura 5).



Figura 5 – Local de realização do estudo.

Fonte: Google imagens

3.3 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (CEP/FMT-HVD), sob o número de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) 31739220.4.0000.0005.

3.4 Amostra e coleta de dados

3.3.1 Coleta das amostras

Foi utilizado um controle de baço parafinado, proveniente de indivíduo sabidamente positivo para *P. vivax* diagnosticado por gota espessa e microscopia do baço infectado (70). Como critério de seleção, o bloco deveria estar em condições viáveis para uso contendo material suficiente e parafina conservada, armazenamento adequado em temperatura de 2°C a 37°C e em caixa de papelão anti-impacto.

3.4.2 Cortes Histológicos

Foram realizados cinco, seis, oito, dez, quinze, vinte e vinte e cinco cortes histológico com espessura 10 µm e outros cinco e dez cortes com espessura de 20 µm (71). O maior eixo do bloco foi colocado verticalmente ao fio da navalha para acertar o bloco, em seguida foi retirado o excesso da parafina até alcançar o material, aparado o bloco e resfriado em gelo para endurecer a parafina e umedecer o tecido. Em seguida ao resfriamento, foi realizado a microtomia propriamente dita, obtendo os cortes com o auxílio da pinça. Posteriormente, foram adicionados em microtubos identificados como controle positivo, em seguida foi realizada a desparafinação.

3.4.3 Desparafinação

Para cinco, dez, quinze, vinte cortes foram feitas lavagens com xilol com o volume de 1 mL em cada, foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm, sempre desprezando o sobrenadante cuidadosamente, posteriormente foi realizado uma lavagem com 1 mL de álcool absoluto e centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm e desprezado o sobrenadante, e mais uma lavagem com álcool 70%, logo após deixou-se o tecido secar. Para vinte e cinco cortes foi feito uma lavagem com 1 mL de xilol centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm, e posteriormente com uma de álcool absoluto, sendo secos em temperatura ambiente. O restante dos cortes realizados foram desparafinados com duas lavagens de xilol e duas de álcool absoluto a cada lavagem, sendo centrifugado por 5 minutos a

14.000 rpm e desprezando o sobrenadante (Anexo 1). Após estarem secos foram pesados, da seguinte forma: foi zerado o peso da balança com microtubo equivalente ao que continha o tecido, após fazer isso foi adicionado o microtubo contendo o tecido na balança, o peso do tecido foi dado em miligrama.

3.4.4 Extração de DNA

Após secagem das amostras, realizou-se a extração com dois kits de extração da QIAGEN, com Kit QIAamp FAST DNA Tissue kit Qiagen adicionou-se os tampões disponibilizados no kit que foram 200µL de Buffer AVE, 40µL de Buffer VXL, e 1µL de Buffer DX, com estes tampões colocou-se para incubar em banho-maria por 6 a 8 horas, posteriormente podendo ser incubado em thermomixer ou estufa por mais 12 horas. Após o período de incubação, adicionou-se 20µL de Proteinase K e 4µL de RNAase e homogeneizando em vórtex. Em seguida, deixou-se em temperatura ambiente por 72 horas. Após foi transferido cuidadosamente para o tubo filtro disponibilizado pelo fabricante, daí em diante foi seguido as instruções do fabricante.

Com o QIAamp DNA Blood Minikit adicionou-se 20 µL de proteinase K sobre a amostra e homogeneizou-se em vórtex. Incubou-se por 6 a 8 horas em banho-Maria. Após a incubação adicionar 200 µL do Tampão AL e deixou-se em temperatura ambiente por 72 horas. Posteriormente foi adicionado 200 µL de etanol (95% a 100%) e agitado no vórtex imediatamente. Removeu-se as bolhas por centrifugação. Cuidadosamente foi transferido o conteúdo do tubo para o tubo filtro. A partir daí seguiu-se as instruções do fabricante (ANEXO 2). Em seguida, foi realizado a quantificação do DNA através de espectrofotometria (NANODROP) na unidade de g/µL sendo este limpo com um lenço adequado, adicionado 1 µL de água destilada no local de leitura, e depois limpo novamente com lenço, em seguida adicionou-se 1 µL da eluição contendo material genético, a quantificação fotométrica por medidas de absorbância foi A250/A280 e A250/A230, os valores considerados aceitáveis foram a partir de 10 ng/ µL, não foi necessário fazer a diluição do DNA.

3.4.5 PCR em Tempo Real

Primers e sondas para detecção de *Plasmodium* spp. e detecção de espécies específicas, PvmtCOX1 (Tabela 1) (44,71). Todas as amostras foram testadas em triplicata o volume foi de 24 µL incluindo o mix de reagente e o material genético, com concentração de *primers* e sondas de 10 µM. Também foi adicionado na reação e plasmídeos contendo o fragmento do gene que será amplificado. Três diluições foram usadas em triplicata: 10², 10⁴ e 10⁶ cópias/ µL, e também foi utilizado controle negativo testado em triplicata. As medidas de amplificação e qPCR foram

realizadas utilizando o Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, com versão 2.3 Todas as análises, incluindo a definição dos valores do limiar e do ciclo de quantificação (Cq), foram estabelecidas automaticamente usando as configurações padrão (ANEXO 3). Os procedimentos foram realizados em placas de 96 poços. Para o formato de sonda TaqMan, os ensaios foram realizados no fundo do QuantiFast Probe. Os seguintes perfis térmicos descritos abaixo são para cada master mix usado:

Plasmodium sp. Taqman

Stage 1(Holding Stage): 95°C for 5 min

Stage 2 (Cycling Stage): 95°C for 10 sec, 60°C for 30 sec } 45 Cycles

P. vivax PvmtCOX1 TaqMan:

Stage 1(Holding Stage): 95°C for 5 min

Stage 2 (Cycling Stage): 95°C for 10 sec, 60°C for 30 sec } 45 Cycles

Tabela 1: Iniciadores e sondas usados para amplificação de genes 18S rRNA.

Assay	Primers	Sequence 5'- 3'
QMAL	For	TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG
	Rev	TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA
	Probe	6FAM – TCA ATT CTT TTA ACT TTC TCG CTT GCG CGA – BHQ1
Pv Mt	PvMt_cox1_Fw	TTATATCCACCATTAAGTACATCACTT
	PvMt_cox1_Rev	AACCTTTAGATCTTAGATGCATTACA
	PvMt_cox1_Probe	FAM-CCTGTTGCAGTAGATGTTATCATTG- BHQ1

Fonte:(41)(72).

3.4.6 Amostras de baço

Foram selecionadas amostras de baço em bloco de parafina do ano de 2021 de um laboratório referência para exame histopatológico em Manaus, Amazonas. As amostras selecionadas foram de

indivíduos vítimas de trauma submetido a esplenectomia de qualquer idade e ambos os sexos, foram incluídas amostras com armazenamento adequado em caixa anti-impacto e em temperatura ambiente, com material suficiente para obtenção dos cortes. Não foi possível obter história clínica dos indivíduos que tiveram a amostra selecionada.

3.4.7 Histórico da inclusão em parafina das amostras selecionadas.

A inclusão em parafina foi precedida com o xilol, posteriormente miscível em álcool. após a remoção do álcool, o tecido passou por uma infiltração em parafina líquida, mantida em estufa a 56°C (ponto de fusão) e posteriormente o mesmo foi transferido para o molde contendo parafina líquida. Em poucos minutos a parafina passou a ser sólida, obtendo-se o bloco de parafina contendo o fragmento do tecido em seu interior.

3.4.8 Microtomia, desparafinação, extração e qPCR.

Foram feitos dez cortes com espessura de 20µM, foi desparafinado com duas lavagens de xilol e duas de etanol a cada lavagem foi realizado a centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm e desprezado o sobrenadante. a Extração foi realizada com o kit QIAamp FAST DNA Tissue kit e QIAamp DNA blood minikit conforme a adaptação realizada. Na qPCR foram testadas para gênero e espécie específico de *Plasmodium*. E também foi realizada a qPCR para DNA humano.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Mediante os resultados obtidos foi gerado 01 artigo, disposto a seguir, de acordo com as normas de publicação da revista *Malaria Journal* para artigos de métodos.

ARTIGO 01

Standardization of histological slices of the spleen to be used as a source of biological material for the molecular diagnosis of human malaria

Protocol of spleen DNA extraction for detection of human malaria by qPCR

Raimunda Sandra Pacheco Souza¹

Email: r.sandrapacheco03@gmail.com

Monique F. Santana³

Email: monique.freire20@gmail.com

Luiz Carlos de Lima Ferreira^{4 5}

Email: ferreira.luiz@gmail.com

Manuela C. Morais²

Email: manuabrcm@gmail.com

Antonio Kassio.S. Lima²

Email: kassiosilvalima1@gmail.com

Gisely Cardoso de Melo⁴⁵

Email: cardosogisely@gmail.com

Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda¹⁵

Email: marcuslacerda.br@gmail.com

1. Leonidas & Maria Deane Institute (ILMD), Fiocruz. Manaus, Amazonas, 69057-070, Brazil

2. Federal University of Amazonas. Manaus, Amazonas, 69080-900, Brazil

3. Oncology Foundation (FCECON), Manaus, Amazonas 69040-010, Brazil.
4. State University of Amazonas (UEA). Manaus, Amazonas, 69040-000, Brazil
5. Doctor Heitor Vieira Dourado Tropical Medicine Foundation, Manaus, Amazonas, 69040-000, Brazil.

*Corresponding author: Marcus Vinicius Guimaraes de Lacerda

E-mail: marcuslacerda.br@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: *Plasmodium vivax* is the main specie responsible for human malaria, and one of its manifestations is splenic malaria, but there are still challenges in diagnosis. The present study aimed to standardize DNA extraction from *Plasmodium* sp. in spleens for diagnosis by qPCR. **Methods:** We performed a microtomy of a paraffin-embedded spleen as a positive control for *P. vivax*. It was deparaffinized with xylol and ethanol. Then, DNA extraction was performed with two commercial kits. qPCR was performed with the *Taqman* system for detection of *Plasmodium* sp. (Qmal) and species-specific focusing on conserved regions of the PvmtCOX1 gene. Then, 200 samples of spleen from traumatic patients for splenectomy in Manaus, Amazonas, were selected from 2015 to 2019 from a reference laboratory. **Results:** The deparaffinization and DNA extraction method of *Plasmodium vivax* was successfully standardized. An extracted DNA sample using this qPCR protocol was positive for *P. vivax*. Of the 200s, all qPCRs were negative. **Conclusion:** Paraffinization is practical and efficient for the preservation of samples, but the formation of bonds between proteins and DNA makes extraction difficult. Despite this, in this study it was possible to identify a possible method of identifying and identifying the species of *Plasmodium vivax*.

Background

Malaria is one of the main public health problems in the world, due to the high rate of morbidity and mortality, it is an infectious parasitic disease, caused by protozoa

of the genus *Plasmodium* by the bite of female mosquitoes of the genus *Anopheles* (73). Currently, seven species that cause malaria have been reported: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*, *P. simium* and *P. cynomolgi* (13).

Between 200 and 400 million cases of malaria are reported annually in the world, and, approximately 500.00 deaths. (2). In Brazil, most cases of malaria occur in the Amazon region and approximately 82% are *P. vivax* (5).

Asymptomatic cases are worrisome because they can maintain transmission (31). These asymptomatic individuals may not be diagnosed by the thick smear (45), because this method does not have a sufficient sensitivity to detect low parasitemia (34). Then, molecular methods, for being extremely specific, are very promising to detect the genetic material of the parasites and allow the identification and differentiation of species. (39).

Studies report that the enlarged spleen is related to the accumulation of immature reticulocytes, in which *P. vivax* develops, but it is still unclear. Thereby providing a niche for the survival of the parasite (9).

Amazonas state is an endemic area for malaria and may have a large number of individuals with low parasitemia and there is a probability that these individuals are not being diagnosed, becoming carriers of *Plasmodium* sp. in the spleen. The present study aimed to standardize a technique for extracting DNA from spleens for detection of *Plasmodium* sp. by qPCR.

Results

Table 1 shows differences in the number of tissue slices and thickness. In addition, 1-2 washes with xylol and ethanol were adapted for deparaffinization. It was observed in the standardization that the best result was with 10 cuts of 20 μm , 2 washes of xylol and 2 of absolute alcohol, weighing 40 mg and DNA concentration of 50 ng/ μL for the QIAamp DNA Blood Minikit kit and 55 ng/ μL for QIAamp FAST DNA Tissue Kit, with positive qPCR result for specific genus and species.

In figure 1A, it is shown qPCR result for gender-specific QMAL. The DNA samples extracted with both kits amplified in triplicate, the sample extracted with the

blood kit had a copy number of 75.01 [CI: 73.8-76.4] and for the tissue kit 86.03 [CI: 84.2-87.9]. In figure 1B, qPCR result for specific mitochondrial target species *PvMTCox1*. The sample extracted with the blood kit had a copy number of 89.2 [CI: 87.4-91.1] and tissue kit 106.06 [CI: 105.2-108] for *P. vivax*. It was observed that the sample extracted with the tissue kit showed better results in qPCR for specific genus and specific species.

Of the two samples selected and analyzed as a test, all were negative positive in the qPCR.

Discussion

The spleen may play an important role in malaria with hematoma, splenic infarctions, ruptures and abscess formation (74). According Mohamed *et al.* (2012), most cases of splenic rupture were caused by *P.vivax* and *P.falciparum* (11,13). The spleen's participation in parasite loads is reinforced by high parasitemias and clinical severity in splenectomy patients (63).

This study provides information on the diagnosis of splenic malaria by *P. vivax* on real time PCR. The molecular diagnosis of malaria has been one of the most promising tools in the detection with high sensitivity and specificity (39). Siqueira *et al.* 2012, showed a patient with *P. vivax* detected in blood and spleen which was the splenectomy due to spleen rupture (64).

Saraiva *et al.* (2019), standardized a technique for extracting DNA from *Plasmodium* sp. on filter paper, In the study, the IBMP (Institute of Molecular Biology of Paraná) treatment kit, used in the diagnosis of treatment, was adapted to obtain *Plasmodium* DNA (77). Lacerda et al (2012) conducted a study in which 19 deceased patients diagnosed with *P.vivax* infection were autopsied. Laboratory analysis of twenty 10 µm paraffin tissue sections from the spleen, brain and lung were used for DNA analysis. Nested PCR was performed using 200 µL of DNA to confirm *P. vivax* infection. (42).

Kho *et al.*, (2021) worked with DNA from frozen spleen biopsies (59). In this study, the methodology wasn't able to be reproduced because the spleen samples were in a paraffin block. Some factors can influence the quality of the DNA in paraffin blocks, such as: time of prefixation, fixation and decalcification (78). PCR performed from genetic material extracted from a paraffin-embedded sample is widely used, however, standardization must always be carried out to suit the amplification conditions. For this type of material, special attention must be paid to endogenous and exogenous factors to the reaction, starting from the fixation methods until the useful life of the paraffin block. (79).

Salwa *et al.* (2011) performed a qPCR validation study for splenomegaly related to malarial infection which were performed the thick blood smear and qPCR in peripheral blood and related it to the size of the spleen (44). In this study, the same methodology was not performed because qPCR was performed directly on spleen samples, showing that in fact the parasite can be present in the spleen and be diagnosed by a highly sensitive method.

Aleix *et al.* (2018) shows a splenic rupture by *P. vivax*, identified by ultrasound, electron microscopy and conventional PCR (65). In the present study, a conventional PCR was not performed because it is a more time-consuming method compared to real time PCR. We show an optimized methodology in deparaffinization with xylol and ethanol, and that it is necessary to obtain DNA and that qPCR is possible without previous DNA purification. There are still few studies focused on methodologies for diagnosing malaria in the paraffinized spleen, most of which are focused on frozen samples and PCR of peripheral blood.

The present study was limited by the number of positive controls, no fresh spleen, we can't have steel preserved in other ways to compare, more samples to help shape.

Conclusion

There was the standardization of the qPCR protocol for detection of Plasmodium and *P. vivax* DNA. The contribution of this study was to broaden the understanding of the influence of prefixation, fixation and post-fixation steps and to reduce the variability

of the processes involved in each step. As well as contributing to the proper interpretations of these findings and alternatives to solve or minimize the problem.

Methods

Samples

This study was developed at Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) in Manaus, Amazonas. A spleen paraffinized from an individual known to be positive for *Plasmodium vivax* infected by thick blood smear and spleen microscopy was used as control (64). As an inclusion criterion, the block should be in a viable condition for use, adequate storage, and there should be enough material to carry out the analyses.

Histological sections and dewaxing.

There were five, six, eight, ten, fifteen, twenty and twenty-five cuts with a thickness of 10 μm and another five and ten cuts with a thickness of 20 μm . (71). The largest axis of the block was placed vertically to the knife edge to hit the block, then the block was removed from the paraffin to the material, the block was trimmed and cooled on ice to support the paraffin and moisten the tissue. After the cooling, it was performed, making the cuts with the aid of the forceps. Where they were added in microtubes identified as a positive control, dewaxing was later performed (80).

Deparaffinization

For five, ten, fifteen, twenty cuts, only washes with xylol were performed with a volume of 1 mL each, centrifuged for 5 minutes at 14,000 rpm, then a wash with 1 mL of absolute alcohol and centrifuged for 5 minutes at 14,000 rpm and discarded the supernatant, and another wash with 70% alcohol, after which the tissue was left to dry. Twenty-five samples were washed with 1 ML sections of xylol, centrifuged for 5 minutes at 14,000 rpm, and then with absolute alcohol, being dried at room temperature. The rest of the cuts were deparaffinized with two washes of xylol and two of absolute alcohol at

each wash, being centrifuged for 5 minutes at 14,000 rpm and discarding the supernatant. They were dried, and afterwards weighed, as follows: the weight of the scale was *zeroed* with a microtube equivalent to that containing the tissue, after doing this, the microtube with the tissue was added to the scale, the weight of the tissue was given in milligrams (24).

Selection of samples for testing

Spleen samples from 2015 to 2019 were selected from a reference laboratory for histopathological examinations to be used as a test. As per selection, for all subjects of any sex, all samples were in appropriate time for use, as well as with enough material and with enough material. Those that didn't fit were discarded

List of abbreviations

AVE (Not informed by manufacturer)*

MVL (Not informed by manufacturer)*

DX (Not informed by manufacturer)*

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (CEP/FMT-HVD) under the Certificate of Presentation of Ethical Assessment (CAAE) 31739220.4.0000.0005.

Availability of data and materials

Datasets from the current study are available upon reasonable request to the corresponding author.

Competitive interests

The author declares that there are no competing interests.

Financing

RSPS has a scholarship from FAPEAM. GCM and MVGL are CNPq fellows.

Author contributions

The author RSPS participated in all stages of the study and wrote the paper, MFS collaborated in the elaboration of the methodology together with LCLF, MCM and AKSL collaborated in the laboratory, GCM collaborated in the execution of the study and correction, MVGL guided the execution of the study. All authors read and approved the final manuscript.

Recognitions

Not applicable

References

1. Organization WH. WHO expert consultation on rabies: third report. Vol. 1012. World Health Organization; 2018.
2. Organization WH. World Malaria Report 2019. Geneva.[Internet]. 2019.
3. World Health Organization. WHO Guidelines for Malaria 2021. WHO/UCN/GMP/2022.01. World Heal Organ. 2022;
4. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020;
5. Palma Cuero M. Epidemiologia da Malária no Município de Atalaia do Norte, Amazonas, Brasil. 2020.
6. Wolfarth-Couto B, Filizola N, Durieux L. Padrão sazonal dos casos de malária e a relação com a variabilidade hidrológica no Estado do Amazonas, Brasil. Rev Bras

- Epidemiol. 2020;23:e200018.
7. de Andrade SM, Cunha MA, Holanda EC, Taminato RL, de Oliveira EH. Malária na região amazônica: análise dos indicadores epidemiológicos essenciais ao controle. *Res Soc Dev.* 2020;9(10):e9279109283–e9279109283.
 8. Wyrepkowski CDC, Saraiva M das GG, da Silva AC, de Souza AP, Villacrez ZR. Registro de casos de malária na última década em Manaus, Amazonas, Amazônia Brasileira. *Brazilian J Dev.* 2021;7(1):9592–600.
 9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim. 2020;
 10. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Bol Epidemiológico.* 2022;53:1–17.
 11. FVS-AM F de V em S do A. Portal FVS_AM. 2020.
 12. Lapouble OMM, Santelli ACF, Muniz-Junqueira MI. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev Panam Salud Pública.* 2015;38:300–6.
 13. Sai-ngam P, Pidtana K, Suida P, Poramathikul K, Lertsethtakarn P, Kuntawunginn W, et al. Case Series of Three Malaria Patients From Thailand Infected With the Simian Parasite, *Plasmodium Cynomolgi*. 2022;
 14. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(43):18640–5.
 15. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9).
 16. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol.* 2017;47(2–3):145–52.
 17. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(11):744–57.
 18. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* 2007;9(5):1215–22.
 19. França TCC, Santos MG dos, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nov.* 2008;31(5):1271–8.
 20. Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug

- discovery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(10):2829–43.
21. CAMELO DMF. Influência do perfil de citocinas e da superóxido dismutase sobre a carga parasitária na infecção aguda por *Plasmodium vivax*. 2015;
 22. da Silva Ventura AMR, Fernandes AAM, Zanini GM, Pratt-Riccio LR, Sequeira CG, do Monte CRS, et al. Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with *Plasmodium vivax* malaria in the Pará State, Brazilian Amazon. *Acta Trop*. 2018;181:122–31.
 23. Lima AGBB de S. Extratos proteicos de *Plasmodium falciparum* induzem hemólise de eritrócitos humanos via sistema complemento. Brasil; 2018.
 24. Gomes AP, Vitorino RR, Mendes TA, de Oliveira Pereira S, Miguel PSB, Braga LM, et al. A infecção pelo gênero *Plasmodium*: epidemiologia, profilaxia e controle no Brasil. *VITTALLE-Revista Ciências da Saúde*. 2018;30(2):47–58.
 25. Torres L de M. Antígenos envolvidos na invasão dos reticulócitos pelo *Plasmodium vivax*: variabilidade genética do hospedeiro vertebrado e modulação da resposta imune humoral. 2017.
 26. da Fontoura GP. Recidiva de Malária: relato de caso. *RBAC*. 2018;50(1):90–3.
 27. Reis T, Martins S, Ferreira I, Vilares A, Gargate MJ. Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção por *Plasmodium sp* entre 2010-2017. *Bol Epidemiológico Obs*. 2018;7(22):52–7.
 28. Imbert P, Rapp C, Buffet PA. Pathological rupture of the spleen in malaria: analysis of 55 cases (1958–2008). *Travel Med Infect Dis*. 2009;7(3):147–59.
 29. Cavalcante MWG. Malária: estudo da prevalência *Plasmodium Falciparum* e *Plasmodium Vivax* em Rondônia. 2019;
 30. SVS/MS. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. 2009;112p.
 31. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(6):701–18.
 32. Amaral LC. Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por *Plasmodium Vivax* e *Plasmodium falciparum*. 2014.
 33. Cortés LJ, Muñoz L, Ayala MS. Comparación entre metodologías para el diagnóstico microscópico de malária. *Biomédica*. 2018;38(2):244–52.
 34. Paz ÉRS, Santiago SB. Diagnóstico de Malária—A Importância da Habilidade em

- Microscopia. SAÚDE CIÊNCIA EM AÇÃO. 2015;1(1):1–12.
35. Niang M, Thiam LG, Sane R, Diagne N, Talla C, Doucoure S, et al. Substantial asymptomatic submicroscopic Plasmodium carriage during dry season in low transmission areas in Senegal: implications for malaria control and elimination. PLoS One. 2017;12(8):e0182189.
 36. Glória JC, de Almeida MEM, Caroline K, Alves S, Araújo F, de Ávila RAM, et al. Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios1. 2018;
 37. FONSECA IEFB. ESTUDO DA MALÁRIA COM RELAÇÃO AOS ASPECTOS DE CLÍNICA, DIAGNÓSTICOS E TRATAMENTOS. 2017;
 38. MORGANTE C V, BLAWID R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. Embrapa Semiárido- Documentos (INFOTECA-E). 2016;
 39. Amorim T de ML. Desenvolvimento e validação de kit diagnóstico NAT utilizando PCR em tempo real para detecção de parasitas protozoários. 2018;
 40. Wahab A, Shaukat A, Ali Q, Hussain M, Khan TA, Khan MAU, et al. A novel metabarcoded 18S ribosomal DNA sequencing tool for the detection of Plasmodium species in malaria positive patients. Infect Genet Evol. 2020;82:104305.
 41. 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(1):1–13.
 42. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? Clin Infect Dis. 2012;55(8):e67–74.
 43. Gama BE. Padronização de reações de polimerização em cadeia (PCRs) convencional e em tempo real gênero-específicas para a detecção dos parasitas da malária em indivíduos pauciparasitados. 2006;
 44. A-Elgayoum SME, El-Rayah E-A, Giha HA. Validation of PCR for detection and characterization of parasitaemia in massive splenomegaly attributed clinically to malaria infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(2):207–12.
 45. Rudzki Z, Zazula M, Stachura J. A technical note on microsatellite DNA instability

- studied in archival paraffin-embedded tissues. *Polish J Pathol Off J Polish Soc Pathol*. 2001;52(4):225–30.
46. Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15(4):314–8.
 47. Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int*. 2010;194(1–3):e25–8.
 48. Barcelos D, Franco MF, Leão SC. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50:321–6.
 49. Funabashi KS, Iwamura ESM. Extração de DNA para análise da amelogenina em amostras fixadas em formalina, incluídas em parafina e armazenadas por 1 e 5 anos no Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo. *Saúde Ética & Justiça*. 2013;18:39–44.
 50. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol*. 2006;34(5):455–65.
 51. Krücken J, Mehnert LI, Dkhil MA, El-Khadragy M, Benten WPM, Mossmann H, et al. Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure. *Infect Immun*. 2005;73(10):6390–8.
 52. SOUZA L dos S de, ISHIKAWA BH, SANTOS HP dos, SANTINI ML, Souza F, Murad I. TRAUMA DE BAÇO E REPOSIÇÃO SANGUÍNEA. 2019;
 53. Pinheiro AO, de Araújo JC, Teixeira RA, Paiva LA, Emerich BT, Leite SA. ESPLENECTOMIA DE URGÊNCIA PÓS-TRAUMA E SUAS CONSEQUÊNCIAS AO PACIENTE: UM RELATO DE CASO. *An do Semin Científico do UNIFACIG*. 2019;(4).
 54. Oliveira MESA de, Baesso NL. Complicações de Anemia Falciforme em Pacientes Pediátricos-Revisão Sistemática. 2019;
 55. Hahn WO, Butler NS, Lindner SE, Akilesh HM, Sather DN, Kappe SHI, et al. cGAS-mediated control of blood-stage malaria promotes *Plasmodium*-specific germinal center responses. *JCI insight*. 2018;3(2).
 56. Parra-Romero G, Contreras-Cantero G, Orozco-Guinaldo D, Domínguez-Estrada A, del Campo M-M, de Jesús J, et al. Abdominal trauma: experience of 4961 cases

- in Western Mexico. *Cir Cir*. 2019;87(2):183–9.
57. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MVG. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol*. 2012;14(3):343–55.
 58. Rodríguez Perón JM, López Hernández LR, Columbié González R. Ruptura esplénica espontánea como complicación en la malaria aguda grave por *Plasmodium falciparum*. *Rev Cuba Med Mil*. 2019;48(1).
 59. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. *PLoS Med*. 2021;18(5):e1003632.
 60. Urban BC, Hien TT, Day NP, Phu NH, Roberts R, Pongponratn E, et al. Fatal *Plasmodium falciparum* malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infect Immun*. 2005;73(4):1986–94.
 61. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol*. 2005;21(2):75–80.
 62. Silva AFB. Estudo comparativo entre o esfregaço sanguíneo e de buffy-coat no diagnóstico de hemoparasitas. 2017;
 63. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011;117(2):381–92.
 64. Siqueira AM, Magalhaes BML, Melo GC, Ferrer M, Castillo P, Martin-Jaular L, et al. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(12):e1934.
 65. Elizalde-Torrent A, Val F, Azevedo ICC, Monteiro WM, Ferreira LCL, Fernández-Becerra C, et al. Sudden spleen rupture in a *Plasmodium vivax*-infected patient undergoing malaria treatment. *Malar J*. 2018;17(1):1–5.
 66. Kho S. A hidden biomass of non-phagocytosed asexual and sexual stages of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in the human spleen. In: 7th International Conference on *Plasmodium vivax* Research (ICPvR), Paris, France. 2019.
 67. Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):165–71.

68. Aggarwal V, Nagpal A, Agrawal Y, Kumar V, Kanwal SK, Dhingra B. Plasmodium vivax malaria complicated by splenic infarct. Paediatr Int Child Health. 2014;34(1):63–5.
69. Moura D, Couceiro A, Inácio A, Coelho M. Ruptura esplênica secundária à infecção por Plasmodium falciparum. Rev da Soc Bras Clínica Médica. 2017;15(1):43–5.
70. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Drakeley CJ, Braga ÉM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. Malar J. 2017;16(1):107.
71. Gitirana LDB, Paulo P, Manso DA. Capítulo 3. :89–188.
72. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman PA, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric Plasmodium species in field samples from Papua New Guinea. Malar J. 2010;9(1):1–8.
73. Organization WH. World malaria report 2015. World Health Organization; 2016.
74. Rabie ME, Al Hashemey A, El Hakeem I, Al Hakamy MA, Obaid M, Al Skaini M, et al. Spontaneous rupture of malarial spleen: report of two cases. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2010;2(3).
75. Osman MF, Elkhidir IM, Rogers Jr SO, Williams M. Non-operative management of malarial splenic rupture: the Khartoum experience and an international review. Int J Surg. 2012;10(9):410–4.
76. Kim A, Park Y-K, Lee J-S, Chung M-H, Kim ES. A case of symptomatic splenic infarction in vivax malaria. Korean J Parasitol. 2007;45(1):55.
77. Saraiva MJ de S. Padronização e avaliação de um protocolo para extração de dna em papel de filtro utilizando amostras de plasmodium spp. 2019;
78. Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. J Bras Patol e Med Lab. 2011;47:541–8.
79. Alves BR. Padronização da extração de DNA em tecidos de camundongos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) infectados experimentalmente com Angiostrongylus costaricensis. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2013.
80. Timm L de L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas.

Cad La Salle XI. 2005;2(1):231-9.

Table 1 - Results of the steps of tissue sections, deparaffinization, weight, DNA concentration and qPCR with copy number.

Slices/ thickness	Wash xylol	Wash alcohol absolute	Wash álcool 70%	Dry weight (mg)	DNA (Blood Kit) ng/μL	DNA (Tissue Kit) ng/μL	PCR <i>Plasmodium</i> sp	PCR <i>Plasmodium</i> <i>vivax</i>	Copy number <i>Plasmodium</i> 1	Copy number <i>Plasmodium</i> 2	Copy number <i>P.</i> <i>vivax</i> 1	Copy number <i>P.</i> <i>vivax</i> 2
5/10 μm	One 1'	One 1'	One 1'	70	5	8	Negative	Negative	0	0	0	0
10/10 μm	One 1'	One 1'	One 1'	84.8	9	7	Negative	Negative	0	0	0	0
15/10 μm	One 1'	One 1'	One 1'	125	2	15	Negative	Negative	0	0	0	0
20/10 μm	One 1'	One 1'	One 1'	122.3	15	20	Negative	Negative	0	0	0	0
25/10 μm	One 1'	One 1'	-	177	47	32	Negative	Negative	0	0	0	0
6/10 μm	Two 1'	Two 1'	-	62	61.8	70	Negative	Negative	0	0	0	0
8/10 μm	Two 1'	Two 1'	-	41	35	41	Negative	Negative	0	0	0	0
5/20 μm	Two 1'	Two 1'	-	23	40	32	Negative	Negative	0	0	0	0
10/20 μm	Two 1'	Two 1'	-	40	50	55	Positive	Positive	75.01 [73.8-76.4]	86.03 [84.2-87.9]	89.2 [87.4-91.1]	106.06 [105.2-108]

DNA concentration obtained per ng/μL (DNA) number of samples selected in qPCR for samples taken with the sample collection kit (copy number *plasmodium* 1) number of copies collected in qPCR for use sampled using tissue kit (copy number *plasmodium* 2) number of samples collected in qPCR for samples selected using blood kit (copy number *p.vivax* 1). number of copies collected in qPCR for samples selected using tissue kit (copy number *p.vivax*). confidence interval (CI).

Table 2 - Primers and probes used for amplification of 18S rRNA genes.

Assay	Primers	Sequence 5' - 3'
QMAL	For	TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG
	Rev	TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA
	Probe	6FAM – TCA ATT CTT TTA ACT TTC TCG CTT GCG CGA – BHQ1
Pv Mt	PvMt_cox1_Fw	TTATATCCACCATTAAGTACATCACTT
	PvMt_cox1_Rev	AACCTTTAGATCTTAGATGCATTACA
	PvMt_cox1_Probe	FAM-CCTGTTGCAGTAGATGTTATCATTG-BHQ1

Fonte: (41)(72).

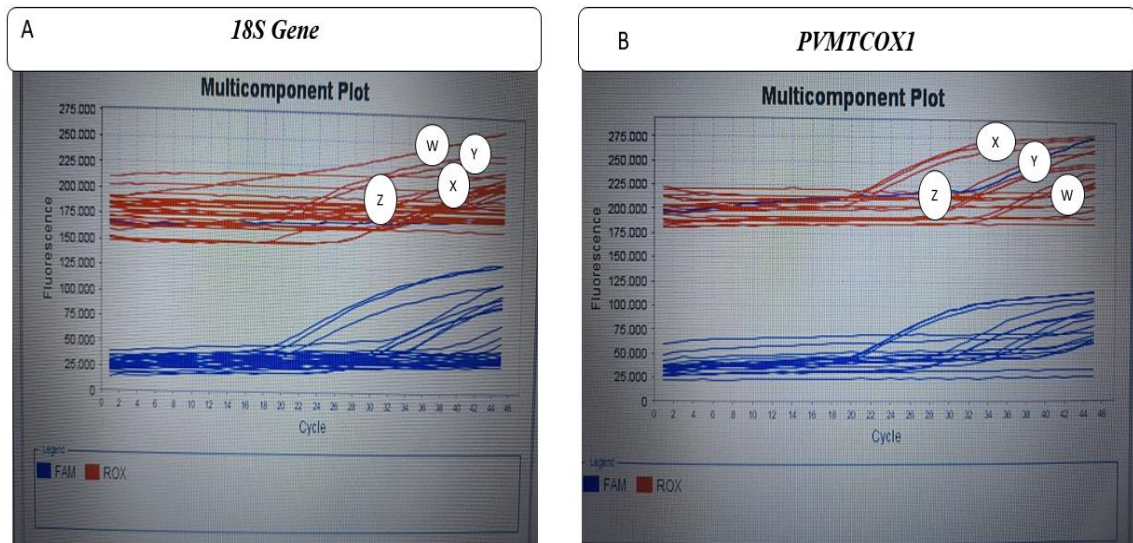


Figure 1- Result da qPCR for gender specific target *18S* and specie specific target *PVMTCOX1*. A- Shows the qPCR result for a specific gender. On the X) it is observed amplification of plasmids Y) of DNA samples extracted with the tissue specific kit W) Samples extracted with the blood specific kit and in Z) Negative controls. B- Shows the qPCR result for specific species. On the X) it is observed of DNA samples extracted with the tissue specific kit Amplification of plasmids Y) Amplification of plasmids W) Samples extracted with the blood specific kit and in Z) Negative controls.

4. CONCLUSÃO

- Houve a padronização de protocolo de qPCR para detecção de DNA de *Plasmodium* e *P. vivax*.
- Contribuição desse estudo foi ampliar a compreensão da influência das etapas de prefixação, fixação e pós-fixação e a redução da variabilidade dos processos envolvidos em cada etapa.
- Bem como contribuir para as devidas interpretações sobre esses achados e alternativas para solucionar ou minimizar o problema.

6. REFERÊNCIAS GERAIS (DA DISSERTAÇÃO) – Vancouver ou NBR 6023/2018

1. Organization WH. WHO expert consultation on rabies: third report. Vol. 1012. World Health Organization; 2018.
2. Organization WH. World Malaria Report 2019. Geneva.[Internet]. 2019.
3. World Health Organization. WHO Guidelines for Malaria 2021. WHO/UCN/GMP/2022.01. World Heal Organ. 2022;
4. Organization WH. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. 2020;
5. Palma Cuero M. Epidemiologia da Malária no Município de Atalaia do Norte, Amazonas, Brasil. 2020.
6. Wolfarth-Couto B, Filizola N, Durieux L. Padrão sazonal dos casos de malária e a relação com a variabilidade hidrológica no Estado do Amazonas, Brasil. *Rev Bras Epidemiol.* 2020;23:e200018.
7. de Andrade SM, Cunha MA, Holanda EC, Taminato RL, de Oliveira EH. Malária na região amazônica: análise dos indicadores epidemiológicos essenciais ao controle. *Res Soc Dev.* 2020;9(10):e9279109283–e9279109283.
8. Wyrepkowski CDC, Saraiva M das GG, da Silva AC, de Souza AP, Villacrez ZR. Registro de casos de malária na última década em Manaus, Amazonas, Amazônia Brasileira. *Brazilian J Dev.* 2021;7(1):9592–600.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim. 2020;
10. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. *Bol Epidemiológico.* 2022;53:1–17.
11. FVS-AM F de V em S do A. Portal FVS_AM. 2020.
12. Lapouble OMM, Santelli ACF, Muniz-Junqueira MI. Situação epidemiológica da malária na região amazônica brasileira, 2003 a 2012. *Rev Panam Salud Pública.* 2015;38:300–6.
13. Sai-ngam P, Pidtana K, Suida P, Poramathikul K, Lertsethtakarn P, Kuntawunginn W, et al. Case Series of Three Malaria Patients From Thailand Infected With the Simian Parasite, *Plasmodium Cynomolgi*. 2022;
14. Gueirard P, Tavares J, Thiberge S, Bernex F, Ishino T, Milon G, et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(43):18640–5.
15. Gething PW, Elyazar IRF, Moyes CL, Smith DL, Battle KE, Guerra CA, et al. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9).
16. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what’s new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol.* 2017;47(2–3):145–52.
17. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat*

- Rev Immunol. 2014;14(11):744–57.
18. Yamauchi LM, Coppi A, Snounou G, Sinnis P. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol.* 2007;9(5):1215–22.
 19. França TCC, Santos MG dos, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim Nov.* 2008;31(5):1271–8.
 20. Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(10):2829–43.
 21. CAMELO DMF. Influência do perfil de citocinas e da superóxido dismutase sobre a carga parasitária na infecção aguda por Plasmodium vivax. 2015;
 22. da Silva Ventura AMR, Fernandes AAM, Zanini GM, Pratt-Riccio LR, Sequeira CG, do Monte CRS, et al. Clinical and immunological profiles of anaemia in children and adolescents with Plasmodium vivax malaria in the Pará State, Brazilian Amazon. *Acta Trop.* 2018;181:122–31.
 23. Lima AGBB de S. Extratos proteicos de Plasmodium falciparum induzem hemólise de eritrócitos humanos via sistema complemento. Brasil; 2018.
 24. Gomes AP, Vitorino RR, Mendes TA, de Oliveira Pereira S, Miguel PSB, Braga LM, et al. A infecção pelo gênero Plasmodium: epidemiologia, profilaxia e controle no Brasil. *VITTALLE-Revista Ciências da Saúde.* 2018;30(2):47–58.
 25. Torres L de M. Antígenos envolvidos na invasão dos reticulócitos pelo Plasmodium vivax: variabilidade genética do hospedeiro vertebrado e modulação da resposta imune humoral. 2017.
 26. da Fontoura GP. Recidiva de Malária: relato de caso. *RBAC.* 2018;50(1):90–3.
 27. Reis T, Martins S, Ferreira I, Vilares A, Gargate MJ. Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção por Plasmodium sp entre 2010-2017. *Bol Epidemiológico Obs.* 2018;7(22):52–7.
 28. Imbert P, Rapp C, Buffet PA. Pathological rupture of the spleen in malaria: analysis of 55 cases (1958–2008). *Travel Med Infect Dis.* 2009;7(3):147–59.
 29. Cavalcante MWG. Malária: estudo da prevalência Plasmodium Falciparum e Plasmodium Vivax em Rondônia. 2019;
 30. SVS/MS. Manual de diagnostico laboratorial da malaria. 2009;112p.
 31. Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(6):701–18.
 32. Amaral LC. Desenvolvimento de um protocolo de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por Plasmodium Vivax e Plasmodium falciparum. 2014.
 33. Cortés LJ, Muñoz L, Ayala MS. Comparación entre metodologías para el diagnóstico microscópico de malaria. *Biomédica.* 2018;38(2):244–52.

34. Paz ÉRS, Santiago SB. Diagnóstico de Malária—A Importância da Habilidade em Microscopia. SAÚDE CIÊNCIA EM AÇÃO. 2015;1(1):1–12.
35. Niang M, Thiam LG, Sane R, Diagne N, Talla C, Doucoure S, et al. Substantial asymptomatic submicroscopic Plasmodium carriage during dry season in low transmission areas in Senegal: implications for malaria control and elimination. PLoS One. 2017;12(8):e0182189.
36. Glória JC, de Almeida MEM, Caroline K, Alves S, Araújo F, de Ávila RAM, et al. Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios1. 2018;
37. FONSECA IEFB. ESTUDO DA MALÁRIA COM RELAÇÃO AOS ASPECTOS DE CLÍNICA, DIAGNÓSTICOS E TRATAMENTOS. 2017;
38. MORGANTE C V, BLAWID R. Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos. Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E). 2016;
39. Amorim T de ML. Desenvolvimento e validação de kit diagnóstico NAT utilizando PCR em tempo real para detecção de parasitas protozoários. 2018;
40. Wahab A, Shaukat A, Ali Q, Hussain M, Khan TA, Khan MAU, et al. A novel metabarcoded 18S ribosomal DNA sequencing tool for the detection of Plasmodium species in malaria positive patients. Infect Genet Evol. 2020;82:104305.
41. 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(1):1–13.
42. Lacerda MVG, Fragoso SCP, Alecrim MGC, Alexandre MAA, Magalhães BML, Siqueira AM, et al. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of Plasmodium vivax malaria: to what extent does this parasite kill? Clin Infect Dis. 2012;55(8):e67–74.
43. Gama BE. Padronização de reações de polimerização em cadeia (PCRs) convencional e em tempo real gênero-específicas para a detecção dos parasitas da malária em indivíduos pauciparasitados. 2006;
44. A-Elgayoum SME, El-Rayah E-A, Giha HA. Validation of PCR for detection and characterization of parasitaemia in massive splenomegaly attributed clinically to malaria infection. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(2):207–12.
45. Rudzki Z, Zazula M, Stachura J. A technical note on microsatellite DNA instability studied in archival paraffin-embedded tissues. Polish J Pathol Off J Polish Soc Pathol. 2001;52(4):225–30.
46. Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. Pesqui Odontol Bras. 2001;15(4):314–8.
47. Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol

- on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int.* 2010;194(1–3):e25–8.
48. Barcelos D, Franco MF, Leão SC. Effects of tissue handling and processing steps on PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2008;50:321–6.
 49. Funabashi KS, Iwamura ESM. Extração de DNA para análise da amelogenina em amostras fixadas em formalina, incluídas em parafina e armazenadas por 1 e 5 anos no Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo. *Saúde Ética & Justiça.* 2013;18:39–44.
 50. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):455–65.
 51. Krücken J, Mehnert LI, Dkhil MA, El-Khadragy M, Benten WPM, Mossmann H, et al. Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure. *Infect Immun.* 2005;73(10):6390–8.
 52. SOUZA L dos S de, ISHIKAWA BH, SANTOS HP dos, SANTINI ML, Souza F, Murad I. TRAUMA DE BAÇO E REPOSIÇÃO SANGUÍNEA. 2019;
 53. Pinheiro AO, de Araújo JC, Teixeira RA, Paiva LA, Emerich BT, Leite SA. ESPLENECTOMIA DE URGÊNCIA PÓS-TRAUMA E SUAS CONSEQUÊNCIAS AO PACIENTE: UM RELATO DE CASO. *An do Semin Científico do UNIFACIG.* 2019;(4).
 54. Oliveira MESA de, Baesso NL. Complicações de Anemia Falciforme em Pacientes Pediátricos- Revisão Sistemática. 2019;
 55. Hahn WO, Butler NS, Lindner SE, Akilesh HM, Sather DN, Kappe SHI, et al. cGAS-mediated control of blood-stage malaria promotes *Plasmodium*-specific germinal center responses. *JCI insight.* 2018;3(2).
 56. Parra-Romero G, Contreras-Cantero G, Orozco-Guinaldo D, Domínguez-Estrada A, del Campo M-M, de Jesús J, et al. Abdominal trauma: experience of 4961 cases in Western Mexico. *Cir Cir.* 2019;87(2):183–9.
 57. Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MVG. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol.* 2012;14(3):343–55.
 58. Rodríguez Perón JM, López Hernández LR, Columbié González R. Ruptura esplénica espontánea como complicación en la malaria aguda grave por *plasmodium falciparum*. *Rev Cuba Med Mil.* 2019;48(1).
 59. Kho S, Qotrunnada L, Leonardo L, Andries B, Wardani PAI, Fricot A, et al. Evaluation of splenic accumulation and colocalization of immature reticulocytes and *Plasmodium vivax* in asymptomatic malaria: A prospective human splenectomy study. *PLoS Med.* 2021;18(5):e1003632.
 60. Urban BC, Hien TT, Day NP, Phu NH, Roberts R, Pongponratn E, et al. Fatal *Plasmodium*

- falciparum malaria causes specific patterns of splenic architectural disorganization. *Infect Immun.* 2005;73(4):1986–94.
61. Engwerda CR, Beattie L, Amante FH. The importance of the spleen in malaria. *Trends Parasitol.* 2005;21(2):75–80.
 62. Silva AFB. Estudo comparativo entre o esfregaço sanguíneo e de buffy-coat no diagnóstico de hemoparasitas. 2017;
 63. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood.* 2011;117(2):381–92.
 64. Siqueira AM, Magalhaes BML, Melo GC, Ferrer M, Castillo P, Martin-Jaular L, et al. Spleen rupture in a case of untreated *Plasmodium vivax* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12):e1934.
 65. Elizalde-Torrent A, Val F, Azevedo ICC, Monteiro WM, Ferreira LCL, Fernández-Becerra C, et al. Sudden spleen rupture in a *Plasmodium vivax*-infected patient undergoing malaria treatment. *Malar J.* 2018;17(1):1–5.
 66. Kho S. A hidden biomass of non-phagocytosed asexual and sexual stages of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in the human spleen. In: 7th International Conference on *Plasmodium vivax* Research (ICPvR), Paris, France. 2019.
 67. Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):165–71.
 68. Aggarwal V, Nagpal A, Agrawal Y, Kumar V, Kanwal SK, Dhingra B. *Plasmodium vivax* malaria complicated by splenic infarct. *Paediatr Int Child Health.* 2014;34(1):63–5.
 69. Moura D, Couceiro A, Inácio A, Coelho M. Ruptura esplênica secundária à infecção por *Plasmodium falciparum*. *Rev da Soc Bras Clínica Médica.* 2017;15(1):43–5.
 70. Folegatti PM, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG, Drakeley CJ, Braga ÉM. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malar J.* 2017;16(1):107.
 71. Gitirana LDB, Paulo P, Manso DA. Capítulo 3. :89–188.
 72. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman PA, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J.* 2010;9(1):1–8.
 73. Organization WH. World malaria report 2015. World Health Organization; 2016.
 74. Rabie ME, Al Hashemey A, El Hakeem I, Al Hakamy MA, Obaid M, Al Skaini M, et al. Spontaneous rupture of malarial spleen: report of two cases. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2010;2(3).

75. Osman MF, Elkhidir IM, Rogers Jr SO, Williams M. Non-operative management of malarial splenic rupture: the Khartoum experience and an international review. *Int J Surg*. 2012;10(9):410–4.
76. Kim A, Park Y-K, Lee J-S, Chung M-H, Kim ES. A case of symptomatic splenic infarction in vivax malaria. *Korean J Parasitol*. 2007;45(1):55.
77. Saraiva MJ de S. Padronização e avaliação de um protocolo para extração de dna em papel de filtro utilizando amostras de plasmodium spp. 2019;
78. Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol e Med Lab*. 2011;47:541–8.
79. Alves BR. Padronização da extração de DNA em tecidos de camundongos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) infectados experimentalmente com *Angiostrongylus costaricensis*. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2013.
80. Timm L de L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. *Cad La Salle XI*. 2005;2(1):231–9.

ANEXOS

DESPARAFINIZAÇÃO DE TECIDOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP			
Título	Desparafinação de tecidos para extração de DNA		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Raimunda Sandra Pacheco de Souza	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões			
Nome	Assinatura	Data (DD/MMM/ AA)	Alterações realizadas

1. OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo desparafinização de tecidos conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico, biomédicos ou qualquer outro membro da equipe apto e treinado para manejo e processamento de amostras biológicas.

3. DEFINIÇÕES

- A parafina tem por finalidade conservar e fornecer maior resistência aos tecidos possibilitando análises futuras.

4. RESPONSABILIDADES

As pessoas responsáveis pela implantação e pelo treinamento nos procedimentos presentes deste POP são o PI, farmacêuticos-bioquímicos, biomédicos e os demais profissionais por ele designados.

5. MÉTODO

Desparafinização de tecidos para extração de DNA.

6. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Desparafinização tem como princípio remover a parafina do *tecido* após a microtomia, utilizando dois banhos de xilol e dois de álcool absoluto.

7. AMOSTRA

Tipo de amostra: Tecido parafinizado

Volume da amostra: 8 a 15 cortes de tecidos

Estabilidade da amostra: A amostra deve ser processada o mais rapidamente possível após a desparafinização.

Amostras inaceitáveis: Amostras com material insuficiente, amostras sem condições de uso.

8. MATERIAIS

- a) Pipetas e ponteiros com capacidade para 1000µL
- b) Tubos de Falcon
- c) Xilol
- d) Álcool absoluto

9. REAGENTES

Xilol	Remove a Parafina
Álcool absoluto	Remove o Xilol

Preparação dos reagentes

Os reagentes já vêm pronto para uso.

Armazenamento e Estabilidade

Quando fechado o álcool deve ser armazenado em temperatura ambiente. Eles são estáveis até a data de validade. Após abertos devem ser armazenados sob refrigeração (2-8°C) são estáveis até a data da validade. O Xilol deve ser armazenado em temperatura ambiente quando fechado e aberto.

Observações sobre os reagentes

Sobre o Xilol evite a ingestão ou contato com a pele ou mucosas. Em caso de contato com a pele, lavar a área afetada com grandes quantidades de água. Em caso de contato com os olhos ou se ingerido, procurar atendimento médico imediato. Ao descartar esse reagente, descartar com grandes volumes de água para evitar a acumulação.

10. EQUIPAMENTOS

- a) Capela de exaustão
- b) Centrifuga

11. CONTROLE DE QUALIDADE

Limpar a Capela com álcool 70% e deixar na UV por 15 minutos, limpar a bancada da sala de extração para evitar contaminação.

12. PROCEDIMENTOS

Inicialização dos equipamentos

- a) Ligar a capela e exaustor

- b) Inicializar a Centrifuga, ajustar a temperatura a 37°C, colocar a 14.000 rpm em 5 minutos

Desparafinização

- a) Transferir o volume desejável de xilol e álcool para o tubo Falcon.
- b) Adicionar 1 ML de Xilol no tubo de 2 ML contendo a amostra;
- c) Centrifugar durante 5 min a 14.000 rpm;
- d) Descartar sobrenadante de forma cuidadosa, para que não se perca material no fundo do tubo;
- e) Repetir por 3 vezes os passos a, b e c;
- f) Após a última lavagem com Xilol, retirar o sobrenadante com a pipeta utilizando ponteira de 1000µL
- g) Adicionar 1 ML de álcool absoluto;
- h) Centrifugar durante 5 min a 14.000 rpm;
- i) Descartar sobrenadante de forma cuidadosa, para que não se perca material no fundo do tubo;
- j) Repetir por 3 vezes os passos f, g e h;
- k) Deixar a os tubos com tampa aberta em temperatura ambiente para que ocorra a evaporação do álcool.

13. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- a) Excesso de parafina pode dificultar a realização do procedimento.
- b) Se o sobrenadante não for removido imediatamente pode voltar a fase sólida.

14. Anexos

Título	Mudanças ou traduções realizadas
--------	----------------------------------

**PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE
TECIDOS**

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP			
Título		Procedimento operacional padrão para extração de DNA de tecidos	
Idioma da versão original		PT	
Elaborado por: Raimunda Sandra Pacheco de Souza	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões

Nome	Assinatura	Data (DD/MMM/ AA)	Alterações realizadas

1.OBJETIVO

Determinar os procedimentos a serem seguidos no processo extração de DNA de tecidos conduzido no Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema (IPCCB) da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

2.CAMPO DE APLICAÇÃO

Pesquisador responsável, co-pesquisadores, farmacêutico-bioquímico, biomédicos ou qualquer outro membro da equipe apto e treinado para manejo e processamento de amostras biológicas.

3.DEFINIÇÕES

- Extração de DNA- A partir da extração do DNA que é possível realizar análises que permitem a detecção de doenças, distúrbios e anomalias genéticas, além da identificação da identificação de patógenos.

4.RESPONSABILIDADES

As pessoas responsáveis pela implantação e pelo treinamento nos procedimentos presentes deste POP são o PI, farmacêuticos-bioquímicos, biomédicos e os demais profissionais por ele designados.

5. MÉTODO

Extração de DNA de tecidos parafinizados

6. PRINCÍPIO DO MÉTODO

O método de extração de DNA é o processo inicial para muitas aplicações de biologia molecular, o DNA de tecidos pode ser obtido tanto para identificação de DNA humano quanto de patógenos.

7. AMOSTRA

Tipo de amostra: Tecido

Volume da amostra: 8 a 15 cortes

Estabilidade da amostra: Realizar a extração somente quando as amostras estiverem secas depois do processo de desparafinização

Amostras inaceitáveis: Amostras úmidas.

8. MATERIAIS

- a) Pipetas e ponteiros com capacidade para 200 μ L e 1000 μ L
- b) Tubo de microcentrífuga de 1.5mL
- c) Tubo coletor
- d) Tubo filtro

9. REAGENTES

Reagentes Kit QIAamp FAST DNA Tissue kit Qiagen
AVE
VXL
DX
PROTEINASE K

RNAase
MVL
AW1
AW2
ATE

Reagentes Kit (DNA blood minikit Qiagen)
Proteinase K
Tampão AL
Etanol
AW1
AW2
AE

Preparação dos reagentes

Os reagentes são diluídos de acordo com as instruções do fabricante dos kits.

Armazenamento e Estabilidade

Para o armazenamento deve ser como indicado em cada frasco dos reagentes.

Observações sobre os reagentes

- a) . Evite a ingestão ou contato com a pele ou mucosas. Em caso de contato com a pele, lavar a área afetada com grandes quantidades de água. Em caso de contato com os olhos ou se ingerido, procurar atendimento médico imediato.

Equipamentos

- a) Microcentrífuga

10.CONTROLE DE QUALIDADE

Limpar a bancada da sala de extração e microcentrífuga com álcool a 70% para evitar contaminação.

11.PROCEDIMENTOS

Kit QIAamp FAST DNA Tissue kit Qiagen

- a) Após as amostras estarem secas da desparafinização adiciona-se 200µL de AVE, 40µL de VXL, e 1µL de DX e levar ao vótex.
- b) Colocar para incubar em banho-maria por 6 a 8 horas
- c) Retirar do banho-maria e incubar em thermomixer ou estufa por mais 12 horas.
- d) Após o período de incubação adicionar 20µL de Proteinase K e 4µL de RNAase e vórtexar.
- e) Deixar em temperatura ambiente por 72 horas.
- f) Após as 72 horas, adiciona-se 265µL de MVL e vórtexar
- g) Transferir cuidadosamente o conteúdo para o tubo filtro, tampar e centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos. Descartar o filtrado, e transferir o tubo filtro para um novo tubo coletor.
- h) Cuidadosamente adicionar 500µL do Tampão AW1 e centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos. Colocar o tubo filtro em novo tubo coletor.
- i) Cuidadosamente adiciona-se 500µL do tampão AW2 e centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos. Descartar o filtrado.
- j) Recomendado: Colocar o tubo filtro em um tubo coletor e centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos. Transferir o tubo filtro para um microtubo de 1.5ml (Eppendorf).
- k) Cuidadosamente adiciona-se 25µL do Tampão ATE e centrifuga por 1 minuto a 14.000 rpm (Repetir esse passo) para aumentar o rendimento e ter como volume final 50µL.
- l) Descartar o tubo filtro, tampar o microtubo (Eppendorf).
- m) Armazenar -20°C.

Kit QIAamp DNA blood Minikit Qiagen

- a) Adicionar 20 µL de proteinase K sobre a amostra e Vórtexar.

- b) Incubar por 6 a 8 horas em banho-Maria.
- c) Após a incubação adicionar 200 μL do Tampão AL e deixar em temperatura ambiente por 72 horas.
- d) Adicionar 200 μL de etanol (95% a 100%) e agitar no vórtex imediatamente. Remover as bolhas por centrifugação.
- e) Cuidadosamente transferir o conteúdo do tubo para o tubo filtro, tampar e centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos. Colocar o tubo filtro em um novo tubo coletor.
- f) Cuidadosamente adicionar 500 μL de tampão AW1 e centrifugar a 14.000 rpm por 2 minutos.colocar o tubo filtro em um novo tubo coletor.
- g) Cuidadosamente adicionar 500 μL de tampão AW2 e centrifugar a 14.000 rpm por 3 minutos.
- h) Recomendado: Coloque o tubo filtro em um novo tubo coletor e centrifugue a 14.000 rpm por 2 minutos.
- i) Colocar o tubo filtro em um tubo eppendorf e descartar o tubo coletor contendo o filtrado.
- j) Cuidadosamente adicionar 25 μL do tampão AE e centrifugar por 1 minuto a 14.000 rpm (repetir esse passo) para obter o volume final de 50 μL e aumentar o rendimento.
- k) Descartar o tubo filtro, tampar o eppendorf e armazenar -20.

12.Anexos

Título	Mudanças ou traduções realizadas

13.Declaração

Este documento se refere à versão final deste POP e encontra-se em vigor a partir da data estipulada no cabeçalho.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA QPCR.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP			
Título		Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR) em amostras de baço	
Idioma da versão original		PT	
Elaborado por: Raimunda Sandra Pacheco de Souza	Revisado por:	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data e assinatura	Data e assinatura	Data e assinatura	Data da próxima revisão:

Histórico de revisões

Nome	Assinatura	Data (DD/MMM/ AA)	Alterações realizadas

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento de realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR) em amostra de baço.

2. Definições

PCR: a reação em cadeia da polimerase é definida como uma técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde do DNA, usando uma reação enzimática simples, sem um organismo vivo. O limiar de detecção da técnica é muito superior ao da gota espessa (técnica padrão utilizada no diagnóstico rotineiro da malária): cerca de 0,004 parasitos/mL.

PCR Tempo Real (qPCR): Variação da técnica de PCR para detecção de sinal fluorescente permitindo a quantificação de ácidos nucleicos em tempo real, assim como a detecção qualitativa de seqüências de ácidos nucleicos utilizando análises de curvas de dissociação ou por meio de sondas marcadas. Não requer tratamento pós-PCR para visualização do resultado.

Iniciador (primer): uma pequena sequência de DNA ou RNA a partir da qual pode começar a replicação do DNA.

3. ApLICÁVEL A

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa clínica;

Todos os laboratórios e ou grupos de pesquisa que constituem REDIMA (Rede Amazônica da Dinâmica de Infecção Experimental com Malária).

4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização da PCR em tempo real.

5. POP'S RELACIONADOS

Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir da cabeça e/ou tórax dos mosquitos. (versão atual de POP_MAL_LB_004);

Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho e Ipiranga, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004);

Procedimento para Extração de DNA em placa utilizando Favor prep 96-well genomic DNA kit (FAVORGEN) (versão atual do POP_MAL_LB_018);

Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®) (versão atual do POP_MAL_LB_003).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Recursos necessários

6.1.1 Amostra

DNA obtido por extração de amostras de tecido de baço parafinado

6.1.2 Materiais

Pipetas automáticas de 10 µL, 100 µL e 1000 µL

Ponteiras com filtro para pipetas automáticas

Pipeta multicanal 0,5 – 10 µL

Multipipetador

Ponteiras para multipipetador (0,5 ml)

Tubos de 1,5 e 2,0 mL

Microplacas de 0,1mL, com 96 poços, para sistema de PCR em Tempo Real (MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, n° de referência: 4346907)

Adesivo óptico para vedar as microplacas (MicroAmp Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, n° de referência 4311971)

6.1.3 Equipamentos

Vortex

Centrífuga

Sistema de PCR em Tempo Real 7500 Fast Applied Biosystems

6.1.4 Reagentes

Reagente	Fabricante	n° referência	Armazenamento
TaqMan GeneExpression MasterMix	Applied Biosystems	4369510	2-8°C
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems	4304437	2-8°C
Sondas (Taqman® Probe) para <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	Life Technologies	4316033	alíquota usada: 2-8°C; estoque: -20°C
Sondas (Taqman® Probe) para QMAL	IDT	-	alíquota usada: 2-8°C, estoque : -20°C
Iniciadores (primers) da reação	IDT – Integrated DNA Technologies	-	alíquota usada: 2-8°C; estoques (100 µM): -20°C
Água MiliQ	-	-	Temperatura ambiente
Tampão TE (diluição de iniciadores)	Ambion	AM9849	Temperatura ambiente

Tween 20 (diluição de iniciadores)	Sigma-Aldrich	P1379	Temperatura ambiente
------------------------------------	---------------	-------	----------------------

Iniciadores (5' – 3'):

Plasmodium spec. (“QMAL”)

QMAL-for: TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG*

QMAL-rev: TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA

* **Oligonucleotídeo contendo oscilação (R=A/G)**

Plasmodium vivax- mitocondrial

PvMt_cox1_Fw: TTA TAT CCA CCA TTA AGT ACA TCA CTT

PvMt_cox1_Rv: AAC CTT TAG ATC TTA GAT GCA TTA CA

Sondas (5' – 3'):

QMAL-probe: **6FAM** – TCA ATT CTT TTA ACT TTC TCG CTT GCG CGA – **BHQ1**

VIVAX-probeMGB: **VIC** – AGC AAC GCT TCT AGC TTA – **MGB – NFQ**

FALC-probeMGB: **6FAM** – ACG GGT AGT CAT GAT TGA GTT – **MGB – NFQ**

PvMt_cox1_Probe: **5'FAM**-CCTGTTGCAGTAGATGTTATCATTG-3'**BHQ1**

As diluições de iniciadores e das sondas de QMAL são preparadas com tampão TE (comprado); após a adição do TE, deixar incubar a solução por 5 min, em seguida vortexar e centrifugar. Preparar alíquotas de estoque (100 µM) e de uso (10 µM). A diluição de uso é feito com água de injeção ou melhor com água para PCR (comprado). Preparar alíquotas de volume menor, suficiente para uma placa (utilizando água de injeção).

Plasmídeos:

Os plasmídeos contêm o fragmento do gene que será amplificado. Três diluições são usadas: 10^2 , 10^4 e 10^6 cópias/ μL .

As diluições de plasmídeos são preparadas com tampão TE mais Tween (concentração final de Tween 0,01%) com um volume final de plasmídeo é de 1 mL. A partir destes diluições, devem ser preparadas alíquotas menores para uso (armazenadas a 2-8°C) e para estoque (armazenadas a -20°C).

6.2 PCR em Tempo Real

Para a detecção dos principais parasitos da malária que infectam humanos, foi padronizada uma reação de PCR em Tempo Real baseada no gene 18S rRNA (1,3,4). Os plasmídeos servem como controle positivo e como padrão para quantificação de DNA das amostras. Usando os plasmídeos é possível comparar a quantidade de DNA das amostras de várias placas.

6.2.1 Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

Mastermix QMAL (para 96 poços)

	Concentração	1x	110x
GeneEx Mix	2x	12 μL	1320 μL
Primer for + rev	10 μM	2 μL	220 μL
Probe	10 μM	1 μL	110 μL
Aqua MiliQ	-	1 μL	110 μL
Subtotal		16 μL	1760 μL
DNA /plasmidos		8 μL	
TOTAL		24 μL	

Etapa	Temp.	Tempo (Min)	Ciclos
1	50 °C	2:00	1
2	95 °C	10:00	1
3	95 °C	0:15	45
	58 °C	1:00	

Condições de amplificação Mastermix QMAL

Mastermix *P. vivax* Pv-Mt cox 1 (para 96 poços)

	Final	1x	100x
[]			
TaqMan Genexpression MasterMix (2x)	1x	12µL	1200 µL
Primer (fw/rv) (10 µM)	800 nM	1,92 µL	192 µL
Probe (10 µM)	400 nM	0,96 µL	96 µL
Aqua MiliQ	-	1,12 µL	112 µL
Subtotal		16 µL	1600 µL
DNA		8 µL	
Total		24 µL	

Condições de amplificação- *P. vivax* Pv-Mt cox 1

Etapa	Temp.	Tempo (min)	Ciclos
1	50°C	02:00	1
2	95°C	10:00	1
3	95°C	00:15	45
	60°C	01:00	

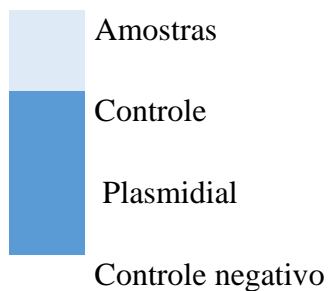
Modo de corrida: Standard 7500

O mastermix é preparado e distribuído na placa na área apropriada (*template-free*). Antes de abrir algum tubo, deve-se vortexar e centrifugar. Pipetar na placa o DNA genômico e o DNA do plasmídeo em área apropriada (sala de PCR em Tempo Real, área livre de amplicon). Depois de adicionar todos os reagentes, vedar a placa sem tocar o adesivo ótico, centrifugar e limpar a placa e o adesivo ótico com cuidado. Não usar luvas com talco!

Em cada placa, são pipetados três controles negativos (mastermix com mQH₂O em lugar de DNA) e três vezes cada diluição de plasmídeos padrão.

											0	1	2
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----------	----------	----------

	0^2	0^2	0^2		0^4	0^4	0^4		0^6	0^6	0^6	



As análises são realizadas pelo software distribuído pelo fabricante – Applied Biosystems “7500 Fast System SDS Software” (ver “Manual 7500 Fast Real-Time (TransEPI)”).

Os valores de CT dos plasmídeos padrão são usados para construir uma curva padrão com que podem ser determinados os números de cópias dos genes para cada amostra.

Para validar a sensibilidade de detecção dos genes 18S rRNA (gênero específicos e espécie-específicos) com plasmídeo padrão, um qPCR é realizado para cada par de iniciadores. As diluições dos plasmídeos são: 10^{-2} , 10^{-1} , $0,5 \times 10^{-1}$, 10^0 , $0,5 \times 10^1$, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 cópias/ μ L são usadas como template. As diluições $10^3 - 10^7$ copias/ μ L são testadas em triplicatas, e diluições de 10^{-2}

$2 - 10^2$ cópias/ μL são testadas em quintuplicatas. A última diluição com três reações positivas é considerada como limite de detecção.

6.3 Restrições e limitações do procedimento

Como se faz a amplificação de DNA, a técnica não permite distinguir as diferentes formas biológicas do parasito (trofozoíto, esquizonte, merozoíto ou gametócito). Existe a possibilidade de contaminação da reação no momento da extração do DNA e no momento do preparo da reação do PCR, devido à sensibilidade de amplificação da técnica.

6.4 Biossegurança e descarte de resíduos

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (3). Os resíduos serão descartados de acordo com as normas da Gerência de Malária: ponteiros usados para pipetar DNA ou plasmídeos, alíquotas de plasmídeos e placas contendo plasmídeos devem ser descartadas em recipiente plástico e posteriormente autoclavadas; restos de reagentes e ponteiros usados para reagentes são desprezadas em Descartech da área apropriada.

6.5 Registro de dados cru e análise de dados

O arquivo gerado pelo sistema de PCR em tempo real e o arquivo de Excel exportado deste arquivo são salvos com data do experimento e com referência às amostras usadas. O resultado da PCR será preenchido pelo responsável do procedimento em uma planilha específica, num arquivo separado.

7. REFERÊNCIAS

De Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human Plasmodium species and quantification of Plasmodium DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* (2003) 97:387–390.

Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman PA, del Portillo HA, Siba P, Mueller I, Felger I. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J.* (2010) 9:361.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* (2004) 42:1214-1219.