

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

CAMILA CABRAL RAPOSO

CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA DE *PLASMODIUM* spp. PARA USO
NO CONTROLE DE QUALIDADE DO KIT NAT PLUS – BIO-
MANGUINHOS

Rio de Janeiro
2021

CAMILA CABRAL RAPOSO

CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA DE *PLASMODIUM* spp. PARA USO
NO CONTROLE DE QUALIDADE DO KIT NAT PLUS – BIO-
MANGUINHOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica, do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Pesquisa Clínica.

Orientador: Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Co-Orientadora: Vanessa da Silveira dos Santos Pacheco

Rio de Janeiro
2021

Raposo, Camila Cabral .

Caracterização de cultura de *Plasmodium spp.* para uso no controle de qualidade do kit NAT PLUS - Bio-Manguinhos / Camila Cabral Raposo. - Rio de Janeiro, 2021.

56 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, 2021.

Orientador: Manoel Marques Evangelista de Oliveira.

Co-orientadora: Vanessa da Silveira dos Santos Pacheco.

Bibliografia: f. 54-56

1. Malária. 2. Pannel de malária. 3. Amostra de referência. 4. Biologia molecular. 5. Controle de qualidade. I. Título.

CAMILA CABRAL RAPOSO

CARACTERIZAÇÃO DE CULTURA DE *PLASMODIUM* spp. PARA USO
NO CONTROLE DE QUALIDADE DO KIT NAT PLUS – BIO-
MANGUINHOS

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica, do
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas,
para a obtenção do título de Mestre em Pesquisa
Clínica.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Alexandre Gomes Vizzoni

Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Josué da Costa Lima Junior

Doutor em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz

Dr^a Danielly Corrêa Moreira

Doutora em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz

Dr^a Gisela Lara da Costa (Suplente)

Doutora em Medicina Veterinária
Instituto Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por terem me concedido esta oportunidade em cursar o mestrado e me darem forças para concluí-lo, mesmo neste período de pandemia onde todos os processos se tornaram mais complicados e mais demorados.

Aos meus pais que me deram a vida, sempre estão ao meu lado, me incentivando e oferecendo todo o apoio necessário para que possa atingir meus objetivos e conseguir realizar os meus sonhos.

Aos meus avós (*in memoriam*) que sempre me desejaram o melhor e me tornaram a pessoa que sou hoje.

Ao meu orientador Dr. Manoel pela orientação no trabalho, apoio e incentivo e por acreditar no meu potencial.

A minha co-orientadora Vanessa, pelo apoio, pela ajuda e críticas construtivas oferecidas durante todo o período.

As minhas colegas de trabalho, do LACORE, pelo companheirismo e paciência neste período conturbado do mestrado.

A minha turma do mestrado profissional pelas risadas constante, amizade e companheirismo durante todo o curso, que mesmo com a adversidade do período da pandemia construiu uma amizade.

A Bio-Manguinhos por me apoiar e me conceder a oportunidade de cursar e defender um projeto para melhoria das nossas atividades no controle de qualidade de reativos para diagnóstico.

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) pelo aceite no programa de mestrado.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente com o meu trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê” (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A malária é uma doença causada pelo protozoário da classe *Sporozoa*, família *Plasmodiidae*, gênero *Plasmodium* e espécies *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malarie*. Outras espécies podem causar malária humana como *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, porém estas não foram identificadas no Brasil. Em indivíduos com quadro febril a esclarecer e história de deslocamento para regiões endêmicas ou entrada em região de Mata Atlântica deve-se investigar a associação ao quadro de malária por transmissão natural. Em caso de hemotransusão, transplante de órgãos ou acidentes com material perfurocortante deve-se considerar uma possível transmissão da doença. O diagnóstico padrão da doença é realizado pela visualização microscópica do protozoário do gênero *Plasmodium* em exame da gota espessa de sangue, corada pela técnica de Giemsa ou de Walker, e em distensão sanguínea, que permite a identificação da espécie, mas apresenta menor sensibilidade. Com o desenvolvimento da tecnologia de amplificação do DNA dos plasmódios usando a reação em cadeia da polimerase (PCR), o diagnóstico da malária baseado na detecção de ácido nucleico mostrou grande progresso em termos de eficácia. Nos últimos anos vem sendo desenvolvidos kits para diagnóstico molecular visando atendimento a uma demanda solicitada pelo Ministério da Saúde para ser aplicada na testagem de sangue a ser doado. Segundo a RDC 16/13, cada fabricante detentor de uma autorização de fabricação deve possuir um departamento de controle de qualidade (CQ). As atribuições do CQ se resumem em estabelecer, validar e implementar todos os procedimentos para garantia da qualidade, assim como avaliar, manter e armazenar os padrões de referência, garantir a rotulagem correta dos reagentes, padrões e outros materiais de sua utilização, garantir que a estabilidade dos ingredientes ativos e medicamentos seja monitorada, participar da investigação de reclamações relativas à qualidade do produto e participar do monitoramento ambiental. Todas essas operações devem ser realizadas em conformidade com procedimentos estabelecidos e registrados, mantendo assim a rastreabilidade das atividades. Para as análises de CQ, são necessárias que as amostras sejam padronizadas e sejam utilizadas como referência, visto que tem que se ter algo para comparar com o resultado obtido na análise, evitando assim viés nessa análise. Sendo assim, se faz necessária a padronização das amostras a serem utilizadas como padrões de referência nas análises de CQ de kits para diagnóstico afim de atender as normas de boas práticas de fabricação requisitadas pela ANVISA. Para a elaboração de painel de amostra, foi utilizada cultura do parasita, que foi avaliada e padronizada afim de gerar reprodutibilidade e linearidade nos lotes analisados e liberados pelo LACORE.

Palavras chave: Malária, painel de malária, controle de qualidade, biologia molecular, amostras de referência

ABSTRACT

Malaria is a disease caused by the protozoan of the class *Sporozoa*, family *Plasmodiidae*, genus *Plasmodium* and species *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malarie*. Other species can cause human malaria such as *Plasmodium ovale* and *Plasmodium knowlesi*, but these have not been identified in Brazil. In individuals with febrile conditions to be clarified and history of displacement to endemic regions or entry into the Atlantic Forest region, the association with malaria due to natural transmission should be investigated. In the case of blood transfusions, organ transplants or accidents with sharps, a possible transmission of the disease should be considered. The standard diagnosis of the disease is performed by microscopic visualization of the protozoan of the genus *Plasmodium* in examination of the thick drop of blood, stained by the Giemsa or Walker technique, and in blood distention, which allows the identification of the species, but has less sensitivity. The standard diagnosis of the disease is performed by microscopic visualization of the protozoan of the genus *Plasmodium* in examination of the thick drop of blood, stained by the Giemsa or Walker technique, and in blood distention, which allows the identification of the species, but has less sensitivity. With the development of plasmodium DNA amplification technology using polymerase chain reaction (PCR), the diagnosis of malaria based on the detection of nucleic acid has shown great progress in terms of effectiveness. In recent years, kits for molecular diagnosis have been developed in order to meet a demand requested by the Ministry of Health to be applied in the testing of blood to be donated. According to RDC 16/13, each manufacturer holding a manufacturing authorization must have a quality control (QC) department. The QC's duties are summarized in establishing, validating and implementing all procedures for quality assurance, as well as assessing, maintaining and storing reference standards, ensuring the correct labeling of reagents, standards and other materials for its use, ensuring that the the stability of active ingredients and medicines is monitored, participate in the investigation of complaints related to product quality and participate in environmental monitoring. All of these operations must be carried out in accordance with established and registered procedures, thus maintaining the traceability of activities. For QC analyzes, it is necessary that the samples be standardized and used as a reference, since there must be something to compare with the result obtained in the analysis, thus avoiding bias in this analysis. Therefore, it is necessary to standardize the samples to be used as reference standards in the QC analysis of diagnostic kits in order to meet the standards of good manufacturing practices required by ANVISA. For the preparation of the sample panel, culture of the parasite was used, which was evaluated and standardized in order to generate reproducibility and linearity in the batches analyzed and released by LACORE.

Keywords: Malaria, malária panel, quality control, molecular biology, reference samples

SUMÁRIO

1 Introdução.....	14
1.1 Malária.....	14
1.1.1 Malária no Mundo.....	14
1.1.2 Malária no Brasil.....	15
1.1.3 Transmissão da Malária.....	17
1.1.4 Ciclo do Parasita.....	17
1.1.5 Incidência da Malária.....	19
1.1.6 Malária Transfusional.....	20
1.1.7 Sintomas da doença.....	22
1.1.8 Tratamento.....	22
1.1.9 Diagnóstico.....	24
1.2 PCR em tempo Real.....	26
1.3 Bio-Manguinhos.....	27
1.4 Kit NAT - Bio-Manguinhos.....	28
1.5 Kit NAT Plus - Bio-Manguinhos.....	29
1.6 Amostras para Controle de Qualidade.....	31
2 Objetivo	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos.....	33
3 Materiais e Métodos.....	34
3.1 Revisão da Literatura.....	34
3.2 Local de realização do estudo.....	34
3.3 Obtenção das Amostras.....	34
3.4 Controle e desenvolvimento do painel controle para detecção de malária.....	35
3.5 Teste de Linearidade da Amostra.....	35
3.6 Extração do DNA.....	35
3.7 Preparo da Mistura de RT-PCR.....	36
3.8 Etapa de Amplificação e Detecção.....	36
3.9 Análise de Resultados.....	37
3.10 Teste de estabilidade da cultura diluída e congelada (-80°C) por 30 dias.....	37
3.11 Análise Estatística.....	38
4 Aspectos éticos.....	39
5 Resultados e Discussão.....	40
6 Conclusão.....	53
7 Referências Bibliográficas.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C	Antes de Cristo
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês Human Immunodeficiency Virus)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CQ	Controle de Qualidade
Cp/mL	Cópias/mL
Ct	Ciclo de Threshold
DEQUA	Departamento de Qualidade
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DI	Documento Interno
DIPPS	Divisão de Produção de Painéis Sorológicos
DIPRE	Divisão de Produção de Reativos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPP	Plataforma de Duplo Percurso (do inglês Dual Path Platform)
ELISA	Ensaio Sorológico Imunoenzimático
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMT	Fundação Medicina Tropical/AM
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
IFI	Imunofluorescência Indireta
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPA	Incidência Parasitária Anual
LACORE	Laboratório de Controle de Reativos para Diagnóstico
LH	Leishmaniose Humana
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LOOP	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop
LTBBF	Laboratório de Taxonomia Bioquímica e Bioprospecção de Fungos
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAL	Malária
NAT	Teste de Detecção de Ácido Nucleico
P	Desvio Padrão
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNI	Política Nacional de Imunizações
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	PCR em Tempo Real
SAC	Serviço de Atendimento ao Cliente
TR	Teste Rápido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa com distribuição da Malária no Mundo.....	15
Figura 2a: Casos de Malária no período de 2007 a 2020.....	16
Figura 2b: Casos de Malária no período de 2007 a 2020, por Estado no Brasil.....	17
Figura 3: Ciclo de vida das espécies de <i>Plasmodium</i> spp. causadoras de malária em humanos.....	19
Figura 4: Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2019.....	20
Figura 5: Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos.....	29
Figura 6: Kit NAT PLUS NAT HIV/HCV/HBV/Malária Bio-Manguinhos.....	30
Figura 7: Fluxo de processamento do produto Kit NAT PLUS HIV/HCV/HBV/Malária Bio-Manguinhos e plataforma/equipamentos.....	30
Figura 8: Esquema reação de RT-PCR – kit NAT Plus Bio-Manguinhos.....	37
Figura 9: Fluxo de processamento de análise das diluições da cultura de <i>Plasmodium</i> spp.....	37
Figura 10: PCR em tempo real da diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra de cultura bruta de <i>P.falciparum</i>	42
Figura 11: PCR em tempo real da diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra de cultura bruta de <i>P.falciparum</i>	44
Figura 12: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> a partir da diluição 10^{-1} (Teste 1).....	44
Figura 13: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> a partir da diluição 10^{-1} (Teste 2).....	44
Figura 14: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> a partir da diluição 10^{-1} (Teste 3).....	45
Figura 15: Análise Estatística Descritiva – Teste de Reprodutibilidade.....	47
Figura 16: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T0).....	48
Figura 17: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T1).....	49
Figura 18: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T2).....	49
Figura 19: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T3).....	49
Figura 20: Análise Estatística Descritiva – Teste de Estabilidade.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tecnologias para diagnóstico da Malária.....	26
Tabela 2: Diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} a partir da cultura bruta de <i>P.falciparum</i>	42
Tabela 3: Resultado com valores de Ct obtidos para a diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra de cultura bruta de <i>P.falciparum</i>	42
Tabela 4: Diluição seriada para padronização da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i>	43
Tabela 5: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> a partir da diluição 10^{-1} (Teste 1).....	45
Tabela 6: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> a partir da diluição 10^{-1} (Teste 2).....	45
Tabela 7: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> a partir da diluição 10^{-1} (Teste 3).....	46
Tabela 8: Análise Estatística – Teste de Reprodutibilidade.....	47
Tabela 9: Análise Estatística – Teste de Levene – Teste de Reprodutibilidade.....	48
Tabela 10: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T0).....	49
Tabela 11: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T1).....	50
Tabela 12: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T2).....	50
Tabela 13: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de <i>P.falciparum</i> (T3).....	50
Tabela 14: Análise Estatística – Teste de Estabilidade.....	51
Tabela 15: Análise Estatística – Teste de Levene – Teste de Estabilidade.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária

A malária, também conhecida como paludismo, febre terçã (benigna ou maligna), febre quartã, tremedeira, batedeira ou, simplesmente, febre, é uma doença causada por espécies de protozoários intracelulares do gênero *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie* e *Plasmodium ovale*), pertencentes à classe *Sporozoa*, família *Plasmodiidae* (ALAN F. COWMAN et al., 2016).

A doença é um grande problema de saúde pública na história da humanidade desde a antiguidade. Em 2007 a.C. o Cânon Chinês de medicina, Nei Ching, discutia sintomas da malária e as relações entre febres e melancolias prolongadas. Também existem manuscritos do século VI a.C que mencionam febres mortais semelhantes a malária na população da antiga Mesopotâmia (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A primeira denominação como malária foi descrita no século XIV pelos italianos que chamavam como “mal aire”, pois se acreditava que vinha do ar sujo dos pântanos e este termo entrou para a língua inglesa 200 anos depois. De forma semelhante, os franceses criaram o termo “paludismo”, cuja raiz significa pântano, para se referir à malária (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

É a doença de alto impacto mundial, com maior prevalência em países tropicais e subtropicais, transmitida aos humanos pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* infectada (HONG LIN et al., 2017).

1.1.1 Malária no Mundo

É uma doença de notificação obrigatória, sendo a protozoose de maior impacto no mundo, colocando sob risco aproximadamente 40% da população mundial (cerca de 2,4 bilhões de pessoas), em mais de 100 países. Distribui-se por extensas regiões tropicais e subtropicais, flagelando expressivo contingente da população, sobretudo nas nações em desenvolvimento e subdesenvolvidas (REGINA M. ALHO et al., 2017).

Há casos de malária na África, na Região Amazônica da América do Sul e no Sudeste Asiático, sendo que sua maior incidência é no continente africano, em países ao sul do deserto do Saara, conforme a Figura 1 (REGINA M. ALHO et al., 2017).

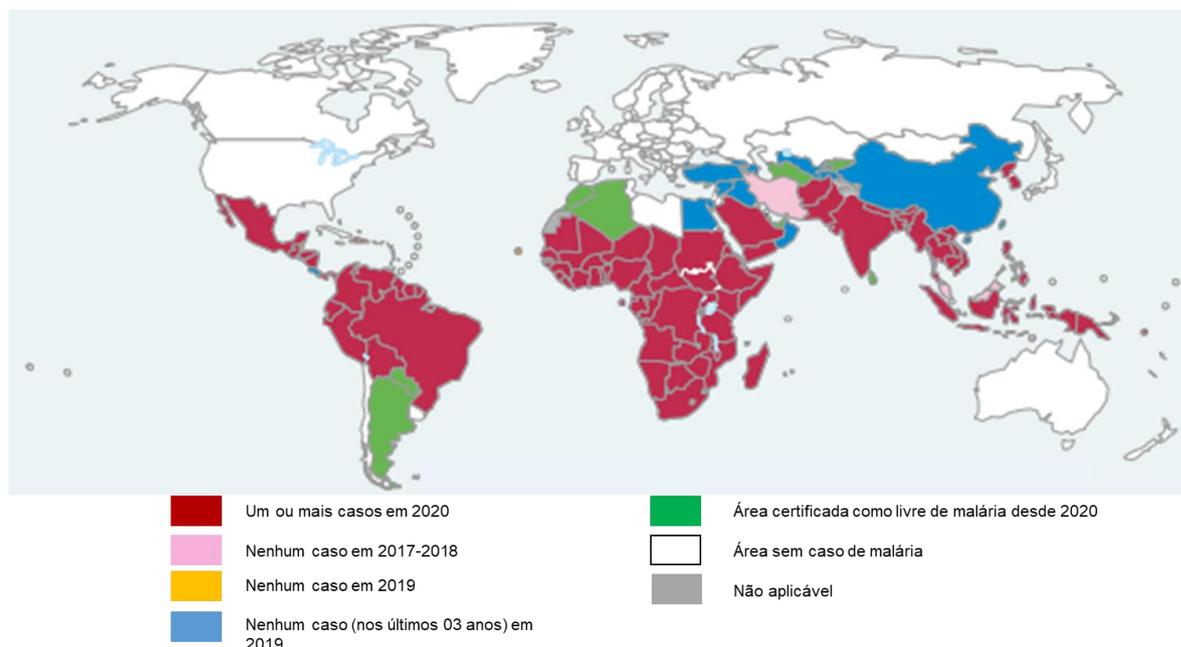


Figura 1: Mapa com distribuição da Malária no Mundo. Fonte: Adaptado a partir de (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020)

Os relatos mais atuais da OMS estimavam 229 milhões de casos novos em 87 regiões endêmicas e 238 milhões em 2020. Os casos na África correspondem a 94% dos casos no mundo, totalizando 215 milhões de casos em 2019, ainda de acordo com a OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Na região das Américas, cerca de 138 milhões de pessoas em 19 países estão em risco para malária, onde Brasil, Colômbia e Venezuela respondem por mais de 86% dos casos. Nessa região os casos de malária reduziram em 40% e incidência de casos em 57% (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

1.1.2 Malária no Brasil

No Brasil, a Malária permanece como grande problema de saúde pública, e incide predominantemente na região amazônica, que engloba os Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, sendo esta região a responsável por 99% dos casos autóctones do país (REGINA M. ALHO et al., 2017).

Em 2020 a espécie com maior prevalência era *P.vivax* correspondendo a 84,2% dos casos e *P.falciparum* a 15,8% dos casos no país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A ocupação desordenada da região amazônica, incentivada por diversos órgãos governamentais, a construção de usinas hidroelétricas, o desenvolvimento de projetos agropecuários e a instalação de inúmeros garimpos, provocaram um aumento considerável da transmissão da malária no início da década de 1980 (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A doença é endêmica na Amazônia, cujas características climáticas e ecológicas que são favoráveis a transmissão da doença, além do processo desorganizado de ocupação da região a partir da década de 70 (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

Devido ao fluxo migratório de pessoas da região amazônica para outros estados do Brasil, tem surgido surtos de malária no Paraná e em áreas de mata atlântica nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Nessas regiões extra-amazônicas, aproximadamente 55% dos casos são derivados de estados pertencentes a Amazônia e cerca de 9% dos casos provenientes de países vizinhos da América do Sul e da África. (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, em 2020 foram registrados 140.974 casos no Brasil, sendo que o total de casos por *Plasmodium vivax* foi de 118.651 e de *Plasmodium falciparum* foi de 22.182 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021)

A figura 2a demonstra o número de casos de malária notificados no Brasil, no período de 1959 a 2020, e a figura 2b indica os casos confirmados, por estados, conforme dados do Datasus.

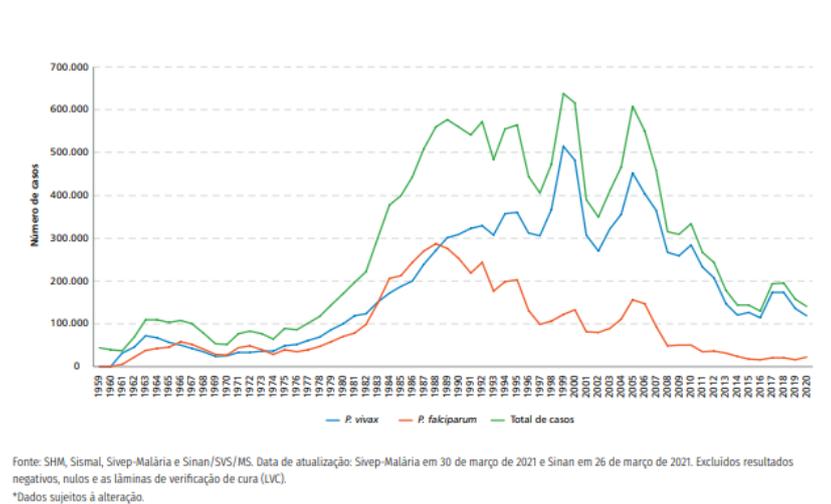


Figura 2a: Casos de Malária no período de 1959 a 2020. Fonte: (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021)



Figura 2b: Casos de Malária no período de 2007 a 2020, por Estado no Brasil – Região Extra Amazônica. Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sinan Net

1.1.3 Transmissão da Malária

Os transmissores da malária são insetos da ordem *Diptera*, da família *Culicidae* e do gênero *Anopheles*. Apenas as fêmeas exercem hematofagia. No Brasil, temos quatro espécies de *Anopheles* transmissores: *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, *A. (Nyssorhynchus) aquasalis*, *A. (Kerteszia) cruzii* e *A. (Kerteszia) bellator*. *A. darlingi* é a espécie transmissora da malária mais importante no Brasil, sendo o mais frequente no domicílio devido a sua acentuada antropofilia, domesticidade e suscetibilidade ao plasmódio (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

A malária pode ser acidentalmente transmitida por transfusão de sangue ou de forma congênita (KÁTIA LUZ TORRES et al., 2006; REGINA M. ALHO et al., 2017).

No caso de transmissão transfusional, o concentrado de hemácia é o principal componente sanguíneo envolvido, porém existem relatos de que a transmissão transfusional pode ocorrer pelo plasma fresco congelado, crioprecipitado, sangue total, leucócitos e concentrado de plaquetas (BATISTA-DOS-SANTOS et al., 2018; SÁEZ-ALQUÉZAR et al., 1998).

1.1.4 Ciclo do Parasita

Os agentes causadores da malária apresentam um ciclo de vida complexo que alterna entre o inseto vetor e o hospedeiro humano, no qual são infectadas tanto células do fígado quanto do sangue (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A infecção pelo *Plasmodium* spp. requer a formação de uma única forma zoíta que invade diferentes tipos de células em um estágio específico. Nos anofelinos, que são vetores obrigatórios da malária humana, ocorre o ciclo sexuado dos plasmódios (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012). Quando os esporozoítas invadem o hospedeiro, infectam os hepatócitos e, a partir daí, se segue o ciclo assexuado no sangue. Formas sexuais que foram desenvolvidas no estágio do sangue são ingeridas pelo mosquito, completando o ciclo (ALAN F. COWMAN et al., 2016).

Conforme figura 3, a malária é transmitida para o hospedeiro pela picada da mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, quando o esporozoíto é inoculado durante a alimentação. O esporozoíto infecta os hepatócitos e se transforma na forma merozoíto e esta fase do ciclo se denomina como estágio pré eritrocítico, que é uma etapa clínica silenciosa e dura de 1 a 2 semanas antes do lançamento de merozoítas na corrente sanguínea. Nos hepatócitos, ocorre a esquizogonia onde ocorre a divisão celular gerando vários merozoítas, que são liberados na corrente sanguínea. Se faz necessário dizer que para *P.vivax* e *P.ovale* hipnozoítos (estágio dormente) podem persistir no fígado e se não tratados causar recaídas invadindo a corrente sanguínea semanas ou mesmo anos depois. Os merozoítas rapidamente infectam as células vermelhas do sangue (hemácias), onde encontramos os trofozoítas jovens. Nesta etapa, os trofozoítas jovens se alimentam da hemoglobina, transformando-se em trofozoítas maduros que sofrem reprodução assexuada por esquizogonia e formam os merozoítos, que são liberados na corrente sanguínea e infectam hemácias. Em determinado momento, os merozoítas em vez de realizar o ciclo eritrocitário, viram gametócito masculino e feminino. O gametócito masculino sofre exflagelação, onde o núcleo se divide, fragmenta formando gametas masculinos flagelados e o gametócito feminino se transforma em gameta feminino arredondado, o qual é fecundado pelo gameta masculino na luz intestinal do mosquito fêmea, formando o oocineto. O oocineto se movimenta da luz intestinal para o epitélio intestinal, onde incista e gera o oocisto. No oocisto, ocorre a esquizogonia, gerando os esporozoítas que são liberados na hemocele e acumulados nas glândulas salivares do mosquito fêmea (SCHINDLER et al., 2019).

Afim de intensificar as ações de controle da transmissão da malária, os municípios foram estratificados de acordo com o risco de transmissão, por meio da Incidência Parasitária Anual (IPA), que expressa o número de exames positivos para malária por mil habitantes em determinado lugar e período, sendo alto risco ($IPA \geq 50$ casos de malária por mil habitantes); médio risco (IPA entre 10 e 49,9 casos de malária por mil habitantes); e baixo risco: (IPA $\leq 9,9$ casos de malária por mil habitantes) (LIMA, 2016).

O risco de transmissão no Brasil pode ser visualizado na figura 4.

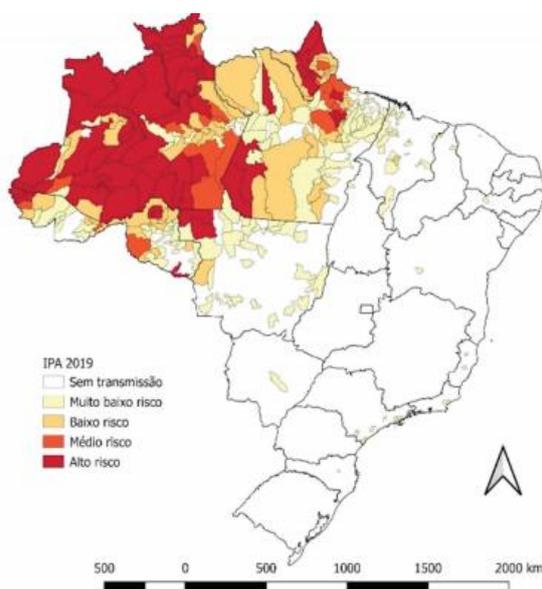


Figura 4: Mapa de risco da malária por município de infecção, Brasil, 2019. Fonte: (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020)

1.1.6 Malária Transfusional

Em todo o mundo há relatos de transmissão de malária durante a transfusão sanguínea. Como a quantidade de parasitas transfundidos por uma unidade de sangue pode ser substancial e o paciente que recebe geralmente está debilitado, a malária pode ser fatal (BRITISH BLOOD TRANSFUSION SOCIETY, 2017).

A malária transfusional pode ser considerada um desafio para os serviços de banco de sangue por causa da ocorrência de infecções assintomáticas e tem sido um risco tanto em áreas endêmicas quanto não endêmicas devido à presença dos indivíduos assintomáticos, semi-imunes de áreas endêmicas e com imunidade parcial (LIMA et al., 2018).

O primeiro relato de malária transmitida por transfusão de sangue ocorreu em 1882, nos Estados Unidos, quando Gerhardt empiricamente demonstrou a transmissão da malária em humanos por sangue infectado, porém o primeiro caso de transmissão acidental por transfusão de sangue foi descrito em 1911 (BATISTA-DOS-SANTOS et al., 2012).

Embora doadores de sangue apenas possam doar se estiverem saudáveis e sem febre, em áreas endêmicas, doadores com essas características podem estar infectados e apresentarem baixa parasitemia. Tradicionalmente, todos os doadores de sangue dessas áreas devem ser examinados e obrigatoriamente ser realizado o teste de gota espessa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016, p. 158) que é o padrão ouro para o diagnóstico da parasitemia da malária em áreas endêmicas, porém não consegue identificar doadores com níveis muito baixos de parasitemia (HONG LIN et al., 2017) .

Os indivíduos assintomáticos e portadores de malária subclínica constituem uma população significativa até mesmo em áreas de baixa transmissão. Além das pessoas que vivem em região endêmica para malária e desenvolvem imunidade parcial para a doença, que possuem baixo grau de parasitemia. Essa redução na carga parasitária ocorre devido a hemostasia existente entre a imunidade do hospedeiro e o parasita. Todos esses indivíduos, na ausência de um bom teste de rastreio diagnóstico, são potenciais doadores de sangue e funcionam como reservatórios da doença, pois servem de fonte de infecção para novos indivíduos (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012; NAVEEN AGNIHOTRI; AJJU AGNIHOTRI, 2018)

Existem diferentes estratégias para reduzir a transmissão transfusional de malária, que incluem a triagem dos doadores de sangue por questionário ou detecção direta do parasita, testagem antígeno/anticorpo e teste utilizando metodologias de detecção de ácido nucleico (HONG LIN et al., 2017).

No Brasil, políticas de doadores de sangue diferem entre regiões endêmicas e não endêmicas para malária. Em áreas não endêmicas, candidatos não podem ser aceitos se tiverem estado em áreas endêmicas a menos de 30 dias ou se tiveram malária nos últimos 12 meses, enquanto candidatos provenientes de área endêmica devem ser testados. Em áreas endêmicas, candidatos são considerados inaptos caso tenham tido malária nos 12 meses antes da doação, com febre ou suspeita de malária nos últimos 30 dias ou que tenham deslocamento de área de alto risco (IPA >49,9) há menos de 30 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016, p. 158).

A frequência de transmissão transfusional de malária tem sido estimada a 01 caso a cada 4 milhões de unidades de bolsas doadas em áreas não endêmicas. Estudos sugerem que o inóculo poderá conter aproximadamente 1000 parasitas em uma bolsa com aproximadamente

500mL e a maioria dos doadores infectados é assintomática (BATISTA-DOS-SANTOS et al., 2018).

A infecção assintomática é caracterizada por baixa densidade de parasitemia e requerem métodos mais sensíveis para detecção do parasita, visto que a microscopia apresenta baixa sensibilidade e os testes rápidos, apesar de confiáveis e de fácil execução, não apresentam uma melhoria considerável da sensibilidade quando comparada a microscopia (REGINA M. ALHO et al., 2017).

Sendo assim, métodos diagnósticos com maior sensibilidade, como os testes moleculares, são uma alternativa eficaz na identificação das infecções assintomáticas por malária (FOLEGATTI et al., 2017; HANALYDIA DE MELO MACHADO, 2017).

1.1.7 Sintomas da doença

Os primeiros sintomas da malária ocorrem de 8-25 dias após a infecção. O período de incubação da doença varia de acordo com a espécie do gênero *Plasmodium*, sendo de 8 a 12 dias para *P.falciparum*, 13 a 17 dias para *P.vivax* e 28 a 30 dias para o *P.malariae* (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

Após a incubação, durante a qual o indivíduo pode apresentar quadro clínico semelhante ao da gripe, com náuseas, vômitos, cefaleias, dores musculares e abdominais, anemia, falta de apetite e distúrbios gastrointestinais. Pode haver elevação da temperatura corporal, e durante o período de febre alta pode surgir um quadro de esplenomegalia. Quando a temperatura começa a reduzir, o doente apresenta intensa sudorese, sendo estes sintomas característicos da malária não grave (TÂNIA REIS et al., 2018).

A malária grave ocorre quando há falência de órgãos vitais e alterações metabólicas, bioquímicas e clínicas com alta parasitemia, tais como anemia grave, hemoglobinúria, alteração na coagulação, acidose metabólica, hipoglicemia, dificuldade respiratória, perda de consciência, convulsão, ou outras alterações neurológicas derivadas da infecção por *P. falciparum* (TÂNIA REIS et al., 2018).

1.1.8 Tratamento

Os fármacos antimaláricos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium*. Existem fármacos chamados eritrocíticos, que atuam nas formas presentes nos

eritrócitos do homem, os fármacos gametocíticos que matam as formas sexuadas do parasita (gametócitos) de um indivíduo infectado, de forma que quando esse é picado por outro mosquito se evita a transmissão da doença para o inseto e assim a disseminação da doença para outras pessoas e, por último, os fármacos esporonticidas (ou esporoitocidas), que atuam contra esporozoítos e são capazes de matar os parasitas assim que eles entram na corrente sanguínea, após a picada do mosquito, ou ainda destruí-los quando são liberados pelos esquizontes hepáticos ou sanguíneos. É importante mencionar que os fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes contra outras (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Os principais fármacos antimaláricos são classificados, de acordo com o modo de ação, em dois grandes grupos: O primeiro grupo inclui os alcalóides derivados da cinchona, as aminoquinolinas e as acridinas. Acredita-se que esses fármacos podem interferir no metabolismo da glicose em diferentes pontos e também na habilidade do parasita de digerir a hemoglobina, impedindo, assim, que ele se alimente ou intoxicando-o com altos níveis de ferriprotoporfirina IX, que é um subproduto tóxico da digestão da hemoglobina. O segundo grupo inclui as pirimidinas e biguanidas e envolve a interferência na síntese do ácido tetra-hidrofólico, importante cofator no processo de síntese de DNA e de aminoácidos (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A utilização de fármacos e esquemas de tratamentos seguros e eficazes são pressupostos básicos para a efetividade e alcance da meta de redução da morbimortalidade por malária, principalmente considerando que a estratégia atual de controle está baseada no diagnóstico precoce e no tratamento adequado e oportuno dos casos (TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR, 2008).

O tratamento da malária deve ser a base de cloroquina, que é ativa contra as formas sanguíneas e gametócitos. Também é necessária a associação da primaquina, um esquizonticida tecidual que atua sobre os hipnozoítas (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

Pode-se optar por utilizar na eliminação dos sintomas do parasitismo, o artemisinina, substância da planta *Artemisia annua*, que alivia os sintomas em menos tempo que os medicamentos citados anteriormente (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

No Brasil, o tratamento da malária é objeto de constante vigilância pela Fundação Nacional de Saúde (FNS), a qual distribui gratuitamente os antimaláricos (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

O parasito da malária mantém-se na cadeia epidemiológica devido ao atraso e à inadequação do diagnóstico e tratamento, pela sua resistência as drogas e pela fragilidade da vigilância epidemiológica (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012).

1.1.9 Diagnóstico

O diagnóstico da doença é realizado em amostras de sangue. A visualização microscópica do *Plasmodium* em exame da gota espessa de sangue, corada pela técnica de Giemsa ou de Walker, e em distensão sanguínea, que permite a identificação das diferentes espécies e quantificação da infecção (SCHINDLER et al., 2019).

O exame da gota espessa permite diferenciação das espécies de *Plasmodium* e do estágio de evolução do parasito circulante. Pode-se ainda calcular a densidade da parasitemia em relação aos campos microscópicos examinados. A lâmina corada pode ser armazenada por tempo indeterminado, possibilitando o futuro controle de qualidade do exame. A técnica demanda cerca de 60 minutos, entre a coleta do sangue e o fornecimento do resultado (SEAN C. MURPHY et al., 2013).

O exame de gota espessa é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da parasitemia da malária em áreas endêmicas, porém não consegue identificar doadores com níveis muito baixos de parasitemia. Outro ponto negativo é que esta técnica necessita de profissionais qualificados para execução e interpretação dos resultados (HONG LIN et al., 2017).

A variedade de testes disponíveis e a falta de um guia para o diagnóstico dificulta o desenho de uma triagem diagnóstica para a malária. O histórico padrão ouro continua a oferecer vantagens, por ser útil na identificação de espécies, quantificações e parasitemia (SEAN C. MURPHY et al., 2013).

Considerando-se esses fatores, realizar o diagnóstico específico de malária torna-se difícil em muitos locais, seja pela precariedade dos serviços de saúde, ou pela dificuldade de acesso da população aos centros de diagnóstico. Por esta razão, métodos rápidos, práticos e sensíveis vêm sendo desenvolvidos (SEAN C. MURPHY et al., 2013).

Os testes imunocromatográficos (testes rápidos) contam com a detecção de antígenos parasita-específicos em amostra de sangue utilizando anticorpo monoclonal imobilizado em membrana de teste, com tecnologia de fluxo capilar lateral. Esses testes são vantajosos quando comparados a microscopia, pois precisam de menor estrutura e treinamento reduzido para sua

utilização. Fornecem resultados qualitativos e são muito adequados para triagem de infecção por malária, em populações endêmicas, permitindo detectar infecções em curso ou recentes (SEAN C. MURPHY et al., 2013).

Já existe no mercado testes rápidos imunocromatográficos fundamentados na detecção de antígenos dos parasitos por anticorpos monoclonais, revelados por método imunocromatográfico. A sensibilidade para *P. falciparum* é maior que 90%, comparando-se com a gota espessa, para densidades maiores que 100 parasitos por μL de sangue. São de fácil execução e interpretação de resultados, dispensam o uso de microscópio e de treinamento prolongado de pessoal. Tem como desvantagens não distinguem a espécie do agente etiológico, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*; assim como não determinam o nível de parasitemia (THEODOOR VISSER et al., 2015).

Testes rápidos para malária foram desenvolvidos utilizando anticorpos monoclonais e policlonais e estes testes têm como vantagem a diferenciação do *P. falciparum* das demais espécies que são identificadas como não-*P. falciparum*. (MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E DIRETORIA TÉCNICA DE GESTÃO, 2005)

Os custos dos testes rápidos são ainda mais elevados que a metodologia da gota espessa e pode apresentar perda de qualidade do teste, quando o kit é armazenado por muitos meses em condições inadequadas (THEODOOR VISSER et al., 2015).

Nos últimos anos, vários estudos têm utilizado a reação da polimerase em cadeia (PCR) como método de detecção de DNA (ácido desoxirribonucleico) de *Plasmodium* spp. circulante, revelado resultados promissores para detecção da malária (BATISTA-DOS-SANTOS et al., 2018; KÁTIA LUZ TORRES et al., 2006; SCHINDLER et al., 2019). A PCR para malária foi introduzida em 1990. Com o desenvolvimento dessa tecnologia de amplificação do DNA dos plasmódios usando a PCR, o diagnóstico da malária baseado na detecção de ácido nucleico mostrou grande progresso em termos de eficácia (KÁTIA LUZ TORRES et al., 2006). Ao longo dos anos foram desenvolvidos novos métodos de amplificação como a PCR em tempo real e amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) (CHRISTEL G HAANSHUUS et al., 2013).

A alta sensibilidade também foi alcançada usando alvos existentes para amplificação em múltiplas cópias no genoma do gênero *Plasmodium*. O alvo geralmente utilizado é a pequena subunidade ribossomal conservada de RNA, 18S pois diferencia as espécies de *Plasmodium* (CHRISTEL G HAANSHUUS et al., 2013; GRUENBERG et al., 2018).

A utilização da reação de PCR em tempo real possui maior sensibilidade e especificidade que a microscopia e os testes rápidos sendo uma ferramenta útil para confirmar a identificação das espécies de *Plasmodium* e poderia ser utilizada como uma metodologia para garantir a qualidade dos resultados obtidos por outras metodologias como a microscopia e outros métodos de diagnóstico afim de garantir que os resultados estejam em conformidade (JIANHAI YIN; MEI LI, HE YAN; SHUISEN ZHOU, 2018).

A tabela 1 compara a sensibilidade dos diferentes testes diagnóstico utilizados para detecção do plasmódio.

Tabela 1: Tecnologias para diagnóstico da Malária:

Método Diagnóstico	Vantagens	Desvantagens	Sensibilidade
Microscopia	Visualização direta do parasita utilizando microscópio e lâminas coradas; consegue detectar o tipo de parasita	Requer técnicos treinados; infraestrutura adequada; não consegue detectar baixos níveis de parasitemia;	5-20 parasitas/ μ L
Teste rápido	Detecta antígenos produzidos pelo plasmódio; requer treinamento mínimo; teste qualitativo; fácil execução e interpretação;	Baixa sensibilidade; não distinguem espécie; não detectam nível de parasitemia;	500 parasitas/ μ L
PCR	Detecção do DNA do parasita; teste qualitativo e/ou quantitativo; maior sensibilidade e especificidade; útil para detecção de espécies	Requer laboratório sofisticado, instrumentos e técnicos treinados	0.01-0.02 parasitas/ μ L

Fonte: Adaptado THEODOOR VISSER et al., 2015 e SEAN C. MURPHY et al., 2013.

1.2 PCR em Tempo Real

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é uma técnica de biologia molecular idealizada e desenvolvida pelo bioquímico Kary Banks Mullis, nos EUA que consiste na cópia de fragmentos de ácidos nucleicos onde uma sequência de DNA serve de molde, sendo possível gerar muitas moléculas similares em uma reação (HAAS; TORRES, 2016).

Já a PCR em tempo real associa a técnica da PCR convencional a um processo de identificação e quantificação pela fluorescência gerada no decorrer dos ciclos de amplificação, permitindo, em um único procedimento, amplificar, detectar e quantificar o material genético, otimizando os resultados e reduzindo sobremaneira o aparecimento de contaminações. A potencialidade em monitorar, no decorrer da reação, o volume de produto adquirido a cada ciclo de amplificação e de quantificação deste, ao longo da fase exponencial de produção, dá maior

reprodutibilidade e precisão à PCR em Tempo Real em comparação com a PCR convencional, reduzindo e otimizando os procedimentos laboratoriais, bem como o tempo de reação (HAAS; TORRES, 2016).

A PCR em tempo real gera um ciclo limiar (Cycle Threshold - CT) para cada amostra. Este é o ponto em que o produto (fluorescência) cruza um limite (limiar) pré-determinado (threshold). Quanto maior a quantidade de DNA alvo (sequência a ser amplificada) de partida na reação, mais baixo será o CT, pois serão necessários menor número de ciclos à reação para ultrapassar o limiar (HAAS; TORRES, 2016).

1.3 Bio-Manguinhos

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) foi criado em 1976, sendo Unidade da Fiocruz responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, kits reativos para diagnóstico e biofármacos que atendem prioritariamente às demandas da saúde pública nacional através da Política Nacional de Imunizações (PNI), convênios que permitem a distribuição de seus kits aos laboratórios públicos e também à demanda externa através da exportação da vacina contra a febre amarela.

Em seu organograma possui o Departamento de Reativos de Diagnóstico (DERED) responsável pela produção dos kits para diagnóstico oferecidos pela unidade. Por meio da sua Divisão de Produção de Reativos para Diagnóstico (DIPRE), possui uma linha diversificada de reativos para diagnóstico de doenças virais, bacterianas e causadas por protozoários (ALMEIDA, 2014).

Os kits produzidos são os Testes Rápidos (TR) DPP (Plataforma de Duplo Percurso – do inglês Dual Path Platform) para triagem sorológica das doenças Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), Sífilis, Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e Leptospirose; Imunoblot Rápido DPP HIV-1/2; Ensaio Sorológico imunoenzimático (ELISA) para triagem sorológica da doença LVC, Imunofluorescência Indireta (IFI) como testes confirmatórios de diagnóstico de Leishmaniose Humana (LH) e Doença de Chagas; exame parasitológico Helm-Test que permite revelar ovos de helmintos presentes nas amostras de fezes e o Teste de Ácido Nucléico (NAT), que complementa os testes sorológicos oferecidos nos hemocentros do país, ampliando a segurança transfusional para detecção de HIV, Hepatite

B (HBV), Hepatite C (HCV), além de teste molecular para detecção de Zika vírus, Chikungunya e Dengue e teste molecular para detecção de SARS-CoV2 (BIO-MANGUINHOS, 2021).

1.4 Kit NAT – Bio-Manguinhos

A portaria 158, de 04 de fevereiro de 2016 do Ministério da Saúde, define o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos e torna obrigatória a testagem do sangue doado no Brasil em teste NAT para detecção de HIV, HCV e HBV (BRASIL, 2016).

Na Fundação Oswaldo Cruz, na unidade Bio-Manguinhos, nos últimos anos vem sendo desenvolvido kits moleculares para atendimento a essa demanda do Ministério da Saúde.

Os testes de ácidos nucleicos (NAT) são baseados em técnicas de amplificação de ácidos nucleicos que permitem a identificação muito mais rápida do agente infeccioso, antes da formação da resposta imunológica. O grande objetivo é reduzir a janela imunológica, definida como o tempo exigido para a formação de anticorpos pelo corpo humano, que são, por sua vez, os alvos dos testes sorológicos (KOICHI KAMEDA; MARILENA C. D. V. CORRÊA; MAURICE CASSIER, 2018).

A janela imunológica é o período compreendido entre o momento que se dá a introdução do agente infeccioso no hospedeiro suscetível e o início da detecção dos anticorpos produzidos frente aos antígenos ou a detecção desses antígenos. Dessa forma, durante a fase de janela imunológica ou indetecção, um doador poderá ter em seu sangue um número considerável de partículas virais na ausência de marcadores sorológicos e/ou sinais e sintomas de uma infecção em curso, o que poderá ocasionar a contaminação do receptor (ANDREA PETRY, 2013).

Em 2004, a Portaria no 112 do Ministério da Saúde, estabeleceu que a implantação do NAT deveria ocorrer em etapas e de forma gradativa no Brasil. Essa decisão do Ministério da Saúde se deu de forma associada a uma consulta ao laboratório de biotecnologia oficial do MS – o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, ligado à Fiocruz – para verificar se o país seria capaz de produzir uma versão local do NAT em escala industrial (projeto “NAT brasileiro”). Um consórcio tecnológico foi estabelecido por Bio-Manguinhos, com a inclusão de pesquisadores do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), responsável pelo registro de produtos de saúde no Brasil, com a iniciativa de

incorporar um teste para aumentar a qualidade do sangue no país (KOICHI KAMEDA; MARILENA C. D. V. CORRÊA; MAURICE CASSIER, 2018).

O consórcio foi iniciado em 2005 e incluiu o desenvolvimento tecnológico, produção do kit, implantação dos equipamentos nos bancos de sangue, formação dos técnicos e serviço de assistência técnica (KOICHI KAMEDA; MARILENA C. D. V. CORRÊA; MAURICE CASSIER, 2018).

O NAT Brasileiro para detecção de HIV e HCV foi registrado na ANVISA em 2010 e um novo registro foi obtido em 2014 para inclusão da detecção de HBV, com 14 sítios testadores implantados, formando assim uma rede centralizada de testagem de sangue (figura 5) (KOICHI KAMEDA; MARILENA C. D. V. CORRÊA; MAURICE CASSIER, 2018).



Figura 5: KIT NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos. Fonte: Bio-Manguinhos, 2021

1.5 Kit NAT Plus – Bio-Manguinhos

Devido a uma demanda do Ministério da Saúde, afim de aumentar a busca diagnóstica da Malária no Brasil, Bio-Manguinhos incorporou em seu portfólio o kit NAT PLUS HIV/HCV/HBV/Malária, aprimorando assim o kit já existente.

O Kit NAT PLUS HIV/HCV/HBV/Malária Bio-Manguinhos, figura 6, destina-se a complementar a triagem sorológica em Serviços de Hemoterapia, através da detecção de ácido nucléico do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV) e do protozoário *Plasmodium* spp. (causador da doença malária), visando ampliar a segurança transfusional e, conseqüentemente, diminuir o risco transfusional causado por esses agentes. O kit é composto por três módulos: módulo controle armazenado de -80°C a -60°C, módulo de extração armazenado de 15°C a 25°C e módulo de amplificação armazenado a -30°C a -10°C (BIO-MANGUINHOS, 2021).



Figura 6: Kit NAT PLUS HIV/HCV/HBV/Malária Bio-Manguinhos. Fonte: Bio-Manguinhos, 2021

O produto se baseia na tecnologia de PCR em tempo Real, assim como o kit NAT HIV/HCV, e é indicado para o processamento, na plataforma de equipamentos NAT PLUS, de amostras de doadores de sangue, através das etapas de extração de ácidos nucleicos (RNA/DNA), transcrição reversa, amplificação, detecção e diferenciação do material genético (RNA/DNA) do HIV, HCV e HBV e/ou *Plasmodium* spp.. (BIO-MANGUINHOS, 2021).

A plataforma de equipamentos NAT PLUS é composta pelos equipamentos Chemagic Prime (PerkinElmer) e ABI 7500 (Thermo Fisher). Para análise das amostras, adicionamos no Chemagic Prime as amostras que podem ser analisadas em pool de 6 ou single, e os módulos controle e de extração do kit, e nesta etapa ocorre a preparação das amostras e extração do material genético. Após isso, adicionamos o módulo de amplificação onde é realizada a etapa de PCR Setup e após essa etapa, as placas são inseridas no equipamento ABI 7500 para que a etapa de amplificação e detecção seja realizada. Na figura 7, pode-se visualizar o fluxo de processamento de amostras com o kit NAT Plus. (BIO-MANGUINHOS, 2021).

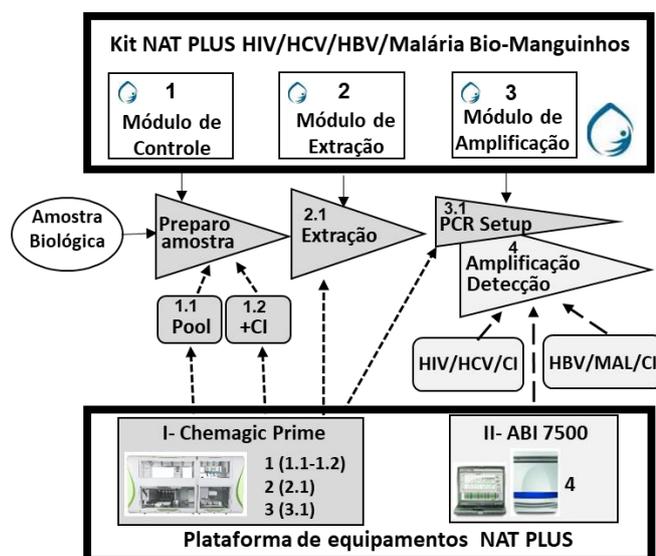


Figura 7: Fluxo de processamento do produto Kit NAT PLUS HIV/HCV/HBV/Malária Bio-Manguinhos e plataforma/equipamentos; Fonte: Bio-Manguinhos, 2019

1.6 Amostras para Controle de Qualidade

A RDC 16, de 28 de março de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), determina que todos os estabelecimentos que fabriquem produtos para diagnóstico de uso "*in vitro*", cumpram as diretrizes de boas práticas de fabricação (BPF) e controle estabelecidas nesse regulamento e que todos os produtos para diagnóstico sofram análise de controle de qualidade (CQ) (BRASIL, 2013).

O capítulo 5 da RDC 16 de 2013, contempla as ações de controle de processo e produção. Segundo a normativa, cada fabricante deverá estabelecer e manter procedimentos de inspeção, testes ou outros meios de verificação de forma a assegurar conformidade aos requisitos especificados em toda a cadeia de fabricação. Os resultados das atividades de aceitação durante o recebimento de componentes e materiais de fabricação, assim como etapas intermediárias de produção e aceitação final do produto acabado deverão ser documentados, incluindo sua conclusão (aceitação ou rejeição) (BRASIL, 2013).

Em Bio-Manguinhos, a análise de CQ dos produtos para diagnóstico é realizada no laboratório de controle de reativos para diagnóstico (LACORE), pertencente ao departamento de qualidade (DEQUA) onde se tem as análises de matéria prima, controle de processo e produto acabado, além das atividades de estabilidade, validação de método e suporte ao atendimento ao consumidor (SAC).

As atribuições do CQ se resumem em estabelecer, validar e implementar todos os procedimentos de controle de qualidade, assim como avaliar, manter e armazenar os padrões de referência, garantir a rotulagem correta dos reagentes, padrões e outros materiais de sua utilização e participar da investigação de reclamações relativas à qualidade do produto. Todas essas operações devem ser realizadas em conformidade com procedimentos escritos e registradas (BRASIL, 2013).

Os painéis sorológicos são uma forma de realizar a avaliação externa da qualidade dos laboratórios ou serviços (HANALYDIA DE MELO MACHADO, 2017).

Se faz necessária a padronização das amostras a serem utilizadas como padrões nas análises de controle de qualidade de kits para diagnóstico e essa padronização se dá através de procedimentos escritos e registrados (BRASIL, 2013).

Para que as análises de controle de qualidade sejam realizadas, precisa-se obter amostras padrão (painéis) para serem utilizadas como referência nas análises de liberação de produtos, conforme RDC 16 de 28 de março de 2013 da ANVISA (BRASIL, 2013).

Devido ao controle de qualidade para os alvos HIV, HCV e HBV já estarem estabelecidos pelo CQ desde o registro do primeiro kit NAT por Bio-Manguinhos, se faz necessária o estabelecimento de análises de amostra padrão para malária.

Sendo assim, se faz necessária a elaboração de um painel contendo amostra caracterizada e padronizada para detecção de *Plasmodium* spp., a ser utilizada nas análises de controle de qualidade do kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar amostra de cultura de *Plasmodium* spp., para utilização na realização de análises de controle de qualidade do kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

2.2 Objetivos específicos

- Controlar o painel controle para detecção de malária;
- Testar a linearidade da cultura frente ao kit NAT Plus Bio-Manguinhos;
- Testar a reprodutibilidade da cultura de *Plasmodium* spp.;
- Analisar os resultados das diluições obtidas;
- Testar a estabilidade da cultura diluída e congelada (-80°C) por 30 dias;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Revisão da Literatura

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre a prevalência da malária no mundo e no Brasil, forma de transmissão, sintomas e tipos de diagnóstico. Assim como foi avaliada a incidência de transfusão de amostras positivas para malária em banco de sangue.

Essa pesquisa bibliográfica foi realizada nos sites de busca científica (PUBMED, SCIELO, Google Acadêmico) e todo o material foi armazenado no aplicativo Zotero, o que auxiliou a classificação e rastreabilidade dos documentos.

Durante a busca foram utilizadas as palavras chaves: malária, malária e/ou banco de sangue, malária e/ou PCR, malária e/ou NAT, malária e/ou controle de qualidade, malária e/ou painel.

Também foi realizada busca no site da ANVISA, Organização Mundial de Saúde (OMS) afim de verificar dados de legislação e dados estatísticos sobre a malária.

3.2 Local de Realização do Estudo

Toda a parte de experimentação foi realizada no Laboratório de Controle de Reativos (LACORE) pertencente ao Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ e no Laboratório de Taxonomia Bioquímica e Bioprospecção de Fungos (LTBBF) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

Todos os procedimentos foram descritos em método analítico e registrados em protocolos de trabalho. A documentação gerada foi registrada na Divisão de Documentação do Departamento de Controle de Qualidade, sob a forma de Documentos Internos (DI).

3.3 Obtenção das Amostras

O Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) disponibilizou cultura caracterizada de *P. falciparum*.

O diluente negativo, foi fornecido pela Divisão de Produção de Painéis Sorológicos (DIPPS/Bio-Manguinhos/FIOCRUZ). Sua produção compreende uma série de procedimentos

que vão desde a matéria prima até a triagem das amostras escolhidas, toda documentação de produção é de uso institucional.

3.4 Controle e desenvolvimento do painel controle para detecção de malária

A padronização do painel foi realizada da seguinte maneira: diluições seriadas da cultura utilizando o diluente negativo e análise do comportamento da mesma frente ao kit NAT Plus, conforme manual de instrução do kit NAT Plus Bio-Manguinhos avaliando a positividade da amostra.

3.5 Teste de Linearidade da Amostra

A amostra de cultura foi diluída em diluente negativo nas seguintes concentrações: 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , para o primeiro teste, utilizando o kit NAT Plus. A partir do resultado do primeiro teste, outras diluições em diferentes concentrações foram realizadas até atingir o limite de sensibilidade descrita no manual do produto Kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

Após as diluições, cada amostra foi analisada em 8 replicatas, extraído o DNA e realizada a amplificação pela RT-PCR, com o objetivo de verificar o perfil (detecção de todas as replicatas até o limite de sensibilidade) descrito no manual de instrução do Kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

3.6 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de forma automatizada na Plataforma NAT Plus de equipamentos (Chemagic Prime/PerkinElmer e ABI 7500/Thermo Fisher) utilizando o kit de extração NAT Plus Bio-Manguinhos, sendo esta uma extração mecânica por *beads* magnéticas.

Antes da utilização do equipamento o mesmo foi previamente preparado, as partes removíveis, ponteiras, placas e insumos de utilização exclusiva foram colocados no equipamento, conforme o manual de instruções do kit NAT Plus Bio-Manguinhos, aguardando a colocação dos tubos contendo as amostras para iniciar a extração de DNA. Foram pipetados nos tubos secundários para o equipamento e alocados no mesmo 1200µL das amostras diluídas e 10µL de Controle Interno do kit NAT Plus (que tem o objetivo de controlar a condição da

reação (intra-ensaio) validando o resultado das determinações). Após o término da extração, foi obtido em torno de 55 μ L de DNA na placa de eluição.

3.7 Preparo da Mistura de RT-PCR

Na etapa de preparo da mistura dos reagentes para a PCR, foram utilizados os insumos dos lotes 198NP004Z, 206NP001Z e 206NP002Z do kit NAT Plus Bio-Manguinhos e os procedimentos foram realizados de acordo com o manual de instrução do kit, onde só foi utilizado o conjunto referente a detecção de malária.

Toda a pipetagem foi realizada pela plataforma NAT Plus de forma automatizada, sendo transferido 10 μ L da mistura de RT-PCR para cada um dos poços da placa de amplificação adicionados 10 μ L do DNA extraído. A placa foi vedada com selo óptico e encaminhada para a etapa de amplificação e detecção.

3.8 Etapa de Amplificação e Detecção

A metodologia para detecção molecular do *Plasmodium spp.* tem como base a plataforma de RT-PCR, a reação de amplificação é baseada em alvo DNA, porém o controle interno do kit NAT Plus é derivado de um vírus de RNA. Por este motivo, requer uma etapa de transcrição reversa (RT) para a amplificação de vírus com genoma RNA. A amplificação é específica do alvo com sondas marcadas com fluorescência para determinar a presença do parasita de forma discriminatória.

O kit NAT Plus utiliza as seguintes fluorescências: CYE 5 para *Plasmodium spp.* e Dye3 para o Controle Interno. As sequencias dos oligonucleotídeos e sondas não foram fornecidas devido ao caráter sigiloso da composição do kit ainda sob patente.

O ciclo de amplificação realizado na reação consiste em uma primeira etapa de 15 minutos a 49°C, correspondente a transcrição reversa realizada pela enzima transcriptase reversa, uma segunda etapa correspondente a uma desnaturação inicial por 7 minutos a 85°C. As etapas seguintes consistem em 50 ciclos de 30 segundos a 95°C e 40 segundos a 60°C, correspondente às etapas de desnaturação, anelamento e extensão conforme figura 8.

A detecção foi realizada pela determinação da presença da curva de amplificação no RT-PCR.

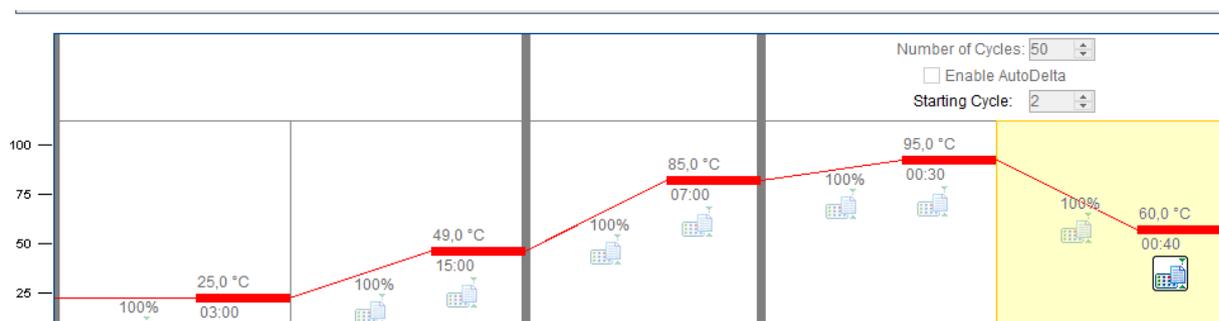


Figura 8: Esquema reação de RT-PCR – kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

3.9 Análise de Resultados

Os resultados foram analisados poço a poço, avaliando os valores de Ct (Ciclo *threshold*) para a cultura.

A cada etapa de diluição realizada todos os procedimentos foram repetidos, conforme figura 9.



Figura 9: Fluxo de processamento de análise das diluições da cultura de *Plasmodium* spp.

3.10 Teste de Estabilidade do painel de controle congelado a -80° por 30 dias

O teste de estabilidade foi realizado afim de verificar a estabilidade das amostras controles com o painel de diluente negativo após o congelamento a -80°C por até 30 dias, observando se a amostra controle mantém o mesmo perfil do momento que foi preparada, ou seja, diluída, processada pelo kit no mesmo dia afim de se diminuir o viés de diluição.

Foi realizada diluição seriada da amostra de *P. falciparum* e uma alíquota de 3 mL de cada concentração de uso foi retirada para o primeiro teste (T0). Os volumes restantes foram aliqüotados em frações com 3 mL em tubos cônicos tipo falcon de 15mL e congelados a -80°C para os testes posteriores.

Após uma semana do congelamento, ocorreu o segundo teste (T1), os controles armazenados em tubos cônicos foram descongelados, as amostras extraídas, o DNA

amplificado conforme protocolo do kit NAT Plus e assim sucessivamente transcorridos 15 dias após o congelamento (T2) e 30 dias após o congelamento (T3).

3.11 Análise Estatística

Para análises dos dados foi utilizado o software Statistica. 9. (OGLIARI; PACHECO, 2004).

O coeficiente de variação (CV) é útil para especificar com exatidão os resultados experimentais. A princípio, quanto menor o CV, mais homogêneos são os dados (CV%)

Foi adotado o intervalo de confiança de 95% e os valores considerados significativos quando desvio padrão (p) for maior que 0,05. Também foi considerado o coeficiente de variação menor que 10% (CV%).

Afim de verificar se todas essas replicatas detectadas são homogêneas, decidiu-se aplicar o teste estatístico, teste de homogeneidade de variância, ou teste de Levene.

O teste de Levene é uma estatística inferencial usada para avaliar a igualdade de variâncias para uma variável calculada para dois ou mais grupos (RIBOLDI; BARBIAN, 2014).

Com esse teste determinamos se a média dos desvios são iguais para todos os tratamentos (concentração). Se os desvios médios forem iguais, as variâncias das observações em todos os tratamentos serão iguais. O teste estatístico aplicado foi o F ANOVA para testar a igualdade das médias aplicada aos desvios absolutos (RIBOLDI; BARBIAN, 2014).

O procedimento de Análise da Variância, ou ANOVA, consiste basicamente em decompor a variação total dos dados em diversas fontes de variação (tempo; tempo e concentração). Com esta decomposição, permitiu avaliar quais destas fontes são significativas. As variações são expressas em termos de somas de quadrados dos valores em torno da média (PAESE; CATEN; RIBEIRO, 2001). Sendo uma ferramenta utilizada para comparar vários grupos de interesse. Permite investigar diferenças significativas entre os grupos estudados e as conclusões obtidas apresentam um nível de confiança determinado pelo analista (PAESE; CATEN; RIBEIRO, 2001).

Em nosso estudo aplicamos a hipótese nula, na qual não existe diferença entre as médias e a hipótese 1 considerada é que pelo menos uma média foi diferente, conforme equação abaixo.

$$H0: \mu1 = \mu2 = \mu3 = \mu4$$

$$H1: \text{pelo menos } \mu1 \neq$$

4 ASPECTOS ÉTICOS

Foi realizada uma consulta junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INI, e foi dispensada a apreciação ética, em virtude do projeto não desenvolver uma pesquisa envolvendo seres humanos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A malária é um problema de saúde pública, de notificação obrigatória que tem ocorrência em todo mundo. Apesar de ser uma doença com maior incidência no continente americano, observamos casos de malária na América do Sul e Sudeste Asiático (REGINA M. ALHO et al., 2017).

No Brasil, a região endêmica é a região amazônica, porém temos a ocorrência de casos em outras regiões devido ao fluxo migratório da população (MIOTO; GALHARDI; AMARANTE, 2012)

A transmissão da malária é uma preocupação mundial, assim como a ocorrência de transmissão sanguínea devido aos indivíduos assintomáticos, pois estes podem ser considerados aptos a doação (KÁTIA LUZ TORRES et al., 2006; REGINA M. ALHO et al., 2017)

Os testes disponíveis atualmente no mercado apresentam algumas desvantagens tanto com relação à sensibilidade quanto à necessidade de técnico especializado e equipamento padronizado.

O teste diagnóstico “padrão ouro” para a malária, é a gota espessa. No entanto, para se ter uma boa detecção de parasitas por esta metodologia são necessários profissionais muito qualificados, tanto para o preparado do exame quanto a leitura da lâmina.

De acordo com a revisão de literatura, no mercado de diagnóstico, existem testes com baixa sensibilidade para detectar indivíduos assintomáticos e com baixa parasitemia, como os testes rápidos (HONG LIN et al., 2017).

Os testes rápidos disponíveis, ainda não possuem sensibilidade adequada para baixos níveis de parasita (quadro 1), e por isso há o investimento nos testes moleculares.

A PCR como método de detecção de DNA alcança alta sensibilidade para a detecção da doença, conforme descrito por Theodoor Visser et al (2015) e Sean C. Murph et al (2013), com a faixa de detecção entre 0.01-0.02 parasitas/ μ L.

Quando comparamos o teste de gota espessa, os testes rápidos e a PCR em tempo real, em estudos anteriores (SEAN C. MURPHY et al., 2013) avaliando a sensibilidade dos três métodos, verificamos que a PCR em tempo real consegue detectar uma quantidade mínima de parasita de 0,01 parasitas/ μ L, possuindo uma maior capacidade de detecção, e conseqüentemente, uma maior sensibilidade, sendo de grande valia ser implementada em bancos de sangue visto que nestes locais temos maior probabilidade de ocorrência de indivíduos assintomáticos, com baixa densidade de parasitas no sangue.

Sendo assim, um teste para detecção molecular do parasita acessível aos serviços de hemoterapia e o Sistema Único de Saúde em sua totalidade, seria mais adequado para a detecção de malária devido a alta sensibilidade da metodologia empregada.

Neste trabalho, estabelecemos um padrão de controle positivo a partir de amostra de cultura positiva para malária para realizar suas análises de desenvolvimento do novo painel, contrapondo o painel comercial para detecção de malária disponível no mercado. Esse painel é vendido a um alto custo e em pequeno volume, o que resulta na necessidade de compras dos mesmos em grande quantidade. Devido ao alto custo, seria bem oneroso para as análises de controle de qualidade necessárias para atender as demandas do Ministério da Saúde anualmente, o que poderia reduzir o acesso aos usuários do SUS.

Durante a etapa de revisão de literatura foram encontrados 114 documentos, entre artigos, teses, dissertações, livros, resoluções e guias da ANVISA e do Ministério da Saúde e publicações da Organização Mundial da Saúde.

Do total de 114 documentos lidos, 36 foram utilizados como referência bibliográfica neste trabalho.

Analisando os artigos encontrados, verificou-se a inviabilidade de utilização de cultura de *Plasmodium vivax* para a realização dos testes de padronização de amostra de cultura positiva, para utilização como controle positivo da reação, devido a ausência de um sistema de cultivo *in vitro* para o *P. vivax* até o momento, em virtude da preferência do *P. vivax* em invadir os reticulócitos que totalizam apenas 2% do total de glóbulos vermelhos. Assim, o cultivo contínuo dependeria de reticulócitos para maturação dos parasitos em grande volume (COSTA, 2016) e por esta razão, não foi possível realizar os testes com essa espécie. Sendo assim, decidimos utilizar somente o *P. falciparum* para a realização dos testes desenhados para este trabalho.

Ressalta-se que durante a busca, não foram encontrados trabalhos semelhantes ao nosso que relatasse a padronização de uma amostra de cultura positiva de *P. falciparum* para ser utilizada como padrão para as amostras de controle de qualidade.

O LATED forneceu a amostra de cultura de *P. falciparum* com parasitemia (percentual de eritrócitos parasitados) de 5,8%. A análise da amostra de cultura de *P. falciparum* concentrada e apresentou um valor de Ct de ± 13 .

O LATED emitiu um parecer sobre a correlação da concentração da amostra em valor de Ct afim de que as análises realizadas tenham correlação com o limite de detecção, descrito no manual de instrução do kit NAT Plus Bio-Manguinhos (200 cp/mL). De acordo com o

resultado obtido por uma amostra quantificada pela Fundação de Medicina Tropical/AM (FMT) obteve-se a carga parasitária da amostra de cultura em $\pm 1E+08$ cp/mL. O limite de detecção de 200cp/mL corresponde ao Ct ± 32 .

No primeiro teste foi realizada uma diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} a partir da cultura bruta e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2, 3 e na figura 10, abaixo.

Tabela 2: Diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} a partir da cultura bruta de *P. falciparum*.

Plasmodium sp. (MALÁRIA)			
1	2	3	4
	Fator 10	Fator 10	Fator 10
Bruta	10x	100x	1000x
	8	8	8
Vol Inicial	1110	1100	1000
Vol PN	9990	9900	9000
	11100	11000	10000

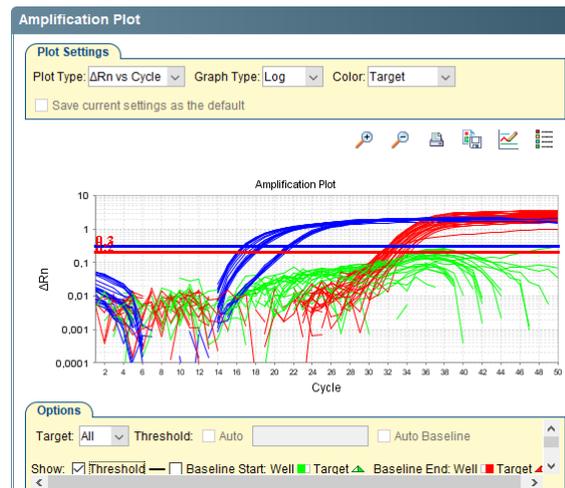


Figura 10: PCR em tempo real da diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra de cultura bruta de *P. falciparum*.

Tabela 3: Resultado com valores de Ct obtidos para a diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra de cultura bruta de *P. falciparum*.

Análise MAL			
	1	2	3
A	16,88	18,51	21,54
B	17,16	18,40	21,52
C	16,83	18,12	21,49
D	16,69	18,41	21,20
E	16,70	18,37	21,58
F	16,60	18,40	21,36
G	17,46	18,61	21,66
H	17,95	18,86	21,92
Média	17,03	18,46	21,54

Analisando os resultados obtidos, e seguindo o racional do LATED para quantificação estimada da amostra de cultura, pode-se dizer que a cultura diluída 1000x possui uma carga de $\pm 2e+05$ cp/mL, obtendo-se assim um valor de Ct de média para as oito replicatas analisadas de 21,54.

Os testes de linearidade para a amostras, foram realizadas a partir do resultado do primeiro teste, com diluições seriadas a partir da amostra diluída 10^{-1} , realizada em diluente negativo, no qual cada amostra foi analisada em 8 replicatas, até atingir o limite de detecção descrito no manual de instrução do kit NAT Plus Bio-Manguinhos, conforme tabela abaixo, tabela 4.

Tabela 4: Diluição seriada para padronização da amostra de cultura de *P. falciparum*.

Plasmodium sp. (MALÁRIA)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Fator 10	Fator 10	Fator 10	Fator 10	Fator 5	Fator 2					
	10x	100x	1000x = 2,00E+05	2,00E+04	4,00E+03	2,00E+03	1,00E+03	5,00E+02	2,50E+02	1,25E+02	6,25E+01
			8	8	8	8	8	8	8	8	8
Vol Inicial		500	3500	1400	3970	9850	9700	9375	8750	7500	5000
Vol PN		4500	31500	12600	15880	9850	9700	9375	8750	7500	5000
		5000	35000	14000	19850	19700	19400	18750	17500	15000	10000

Posteriormente , a extração de DNA de todos os testes foi realizada de forma automatizada na Plataforma NAT Plus de equipamentos, utilizando o kit de extração NAT Plus Bio-Manguinhos, sendo esta uma extração mecânica por beads magnéticas.

O equipamento foi preparado previamente seguindo o manual de instruções. Sucintamente foram pipetados nos tubos 1200uL de amostra diluída e 10uL de controle interno do kit NAT Plus, onde no final da extração obteve volume em torno de 55uL de DNA, na placa de eluição.

Determinamos a curva de amplificação no RT-PCR, conforme resumido nas figuras 10, 11, 12 e 13 para determinação do limite de amplificação e detecção, sendo verificada a detecção das 08 replicatas analisadas na concentração de 125 cópias/ml, valor esse abaixo do limite de detecção do kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

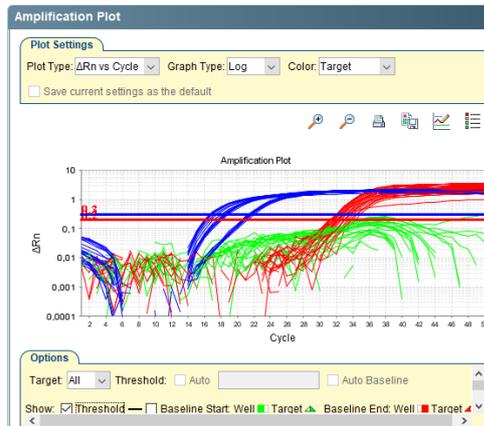


Figura 11: PCR em tempo real da diluição 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} da amostra de cultura bruta de *P. falciparum*.

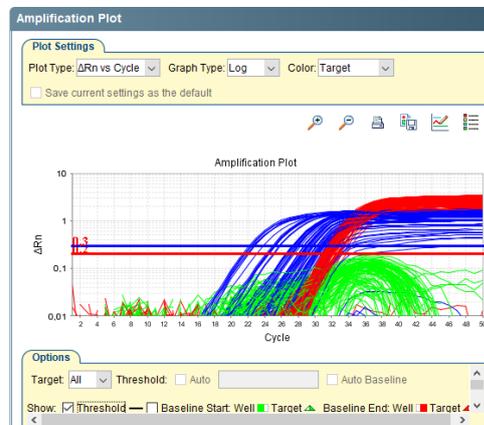


Figura 12: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P. falciparum* a partir da diluição 10^{-1} (teste 1).

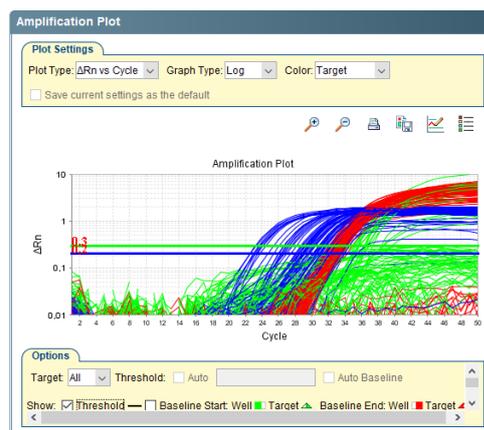


Figura 13: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P. falciparum* a partir da diluição 10^{-1} (teste 2).

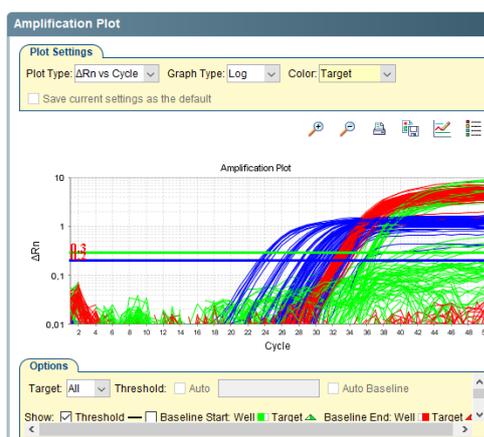


Figura 14: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* a partir da diluição 10^{-1} (teste 3).

Nos testes de reprodutibilidade na primeira análise a diluição foi realizada com o kit NAT Plus lote 198NP004Z, validade 02/20, onde foram obtidos os resultados abaixo (tabela 5):

Tabela 5: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* a partir da diluição 10^{-1} (teste 1)

ANÁLISE MAL									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	22,70	25,85	28,25	28,97	30,06	31,02	30,97	32,55	38,32
B	22,33	25,25	28,02	29,11	28,69	29,22	30,58	31,29	34,54
C	22,83	25,04	27,29	27,66	29,22	29,87	30,41	31,87	32,87
D	22,41	25,16	27,26	28,67	28,78	29,36	29,79	31,82	33,73
E	22,10	24,90	27,93	27,89	29,02	29,07	30,73	31,05	32,77
F	22,36	25,04	27,44	27,97	29,64	30,14	30,83	31,76	30,34
G	22,64	25,11	27,48	28,97	29,74	30,60	30,64	34,44	35,49
H	23,81	25,70	27,71	27,35	29,49	30,14	30,91	32,12	Undetermined
Média	22,65	25,26	27,67	28,32	29,33	29,93	30,61	32,11	34,01
Concentração	2,00E+05	2,00E+04	4,00E+03	2,00E+03	1,00E+03	5,00E+02	2,50E+02	1,25E+02	6,25E+01
Ct Esperado	21,5	24,5 / 25	26,5	27,5	28,5	29,5	30,5	31,5	32,5

Novas análises da diluição foram realizadas frente aos lotes 206NP001Z e 206NP002Z do kit NAT Plus afim de verificar a reprodutibilidade dos resultados das diluições da amostra de cultura, conforme tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* a partir da diluição 10^{-1} (teste 2)

Análise MAL									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	22,99	24,70	26,93	28,78	29,71	30,75	30,60	33,77	33,34
B	23,72	25,35	26,71	28,85	28,94	29,45	31,01	32,13	35,42
C	23,18	25,95	27,37	28,39	29,04	30,07	31,11	32,22	32,53
D	22,95	25,97	27,97	28,48	29,18	29,54	30,54	31,74	32,92
E	22,46	26,22	28,51	32,25	29,02	29,57	31,65	31,54	31,59
F	22,55	26,47	28,19	28,09	29,05	30,33	30,87	32,42	30,47
G	23,42	26,27	28,95	30,15	30,17	31,02	31,53	32,88	33,85
H	23,25	26,52	28,52	28,78	30,55	30,10	31,37	32,86	Undetermined
Média	23,07	25,93	27,89	29,22	29,46	30,10	31,09	32,45	32,87
Concentração	2,00E+05	2,00E+04	4,00E+03	2,00E+03	1,00E+03	5,00E+02	2,50E+02	1,25E+02	6,25E+01
Ct Esperado	21,5	24,5 / 25	26,5	27,5	28,5	29,5	30,5	31,5	32,5

Tabela 7: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* a partir da diluição 10^{-1} (teste 3)

Análise MAL									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	23,95	25,78	28,00	29,66	30,12	31,31	31,31	33,44	33,64
B	24,52	26,06	28,26	29,48	29,43	30,57	31,76	32,43	35,53
C	24,10	26,26	28,03	29,23	30,17	30,90	31,65	32,85	33,57
D	23,61	26,33	28,11	29,59	29,86	30,28	31,12	33,43	33,88
E	23,39	26,64	28,79	29,31	30,13	29,72	32,23	31,58	33,13
F	23,16	26,89	28,93	29,09	29,98	31,57	32,33	32,91	30,51
G	23,65	26,28	28,89	30,13	30,66	31,75	32,32	33,28	33,95
H	23,44	26,45	28,92	29,17	31,13	31,02	31,74	32,61	35,46
Média	23,73	26,34	28,49	29,46	30,19	30,89	31,81	32,82	33,71
Concentração	2,00E+05	2,00E+04	4,00E+03	2,00E+03	1,00E+03	5,00E+02	2,50E+02	1,25E+02	6,25E+01
Ct Esperado	21,5	24,5 / 25	26,5	27,5	28,5	29,5	30,5	31,5	32,5

Conforme resultados acima, na coluna 9 da tabela 4, que se refere a diluição 10, conseguiu-se obter valor de Ct de 32,1; 32,44 e 32,82 respectivamente, o que corresponderia ao limite de detecção do kit.

Calculando a sensibilidade pela concentração estimada, espera-se que a concentração do limite de sensibilidade encontrado seja em torno de $1,25E+02$ cópias/mL.

No primeiro teste realizado, onde a amostra de cultura bruta foi diluída em três concentrações, seguindo o racional informado pelo LATED, conseguiu-se determinar que a amostra possui uma carga parasitária de $\pm 2e+05$ cp/mL, e as replicatas analisadas, obtiveram valor de média de Ct de 21,54.

Após esse teste, foi realizado o teste de linearidade, no qual foram feitas diluições seriadas partindo da amostra diluída 10^{-1} , utilizando três lotes diferentes do kit NAT Plus Bio-Manguinhos.

Nesse teste, verificamos que todos os testes apresentaram 100% de detecção até a diluição 09 (coluna 08), onde se obteve valor de Ct em torno de 32, o que corresponderia ao limite de detecção do kit de 125 cópias/mL de parasitas.

A análise descritiva dos resultados obtidos no teste de reprodutibilidade, observou-se que os valores obtidos eram normais, e com coeficiente de variação de 2,88, considerando o intervalo de confiança de 95% e os valores significativos com desvio padrão (p) maior que 0,05, com coeficiente de variação menor que 10%. Sendo nosso resultado considerado baixo, conforme figura abaixo.

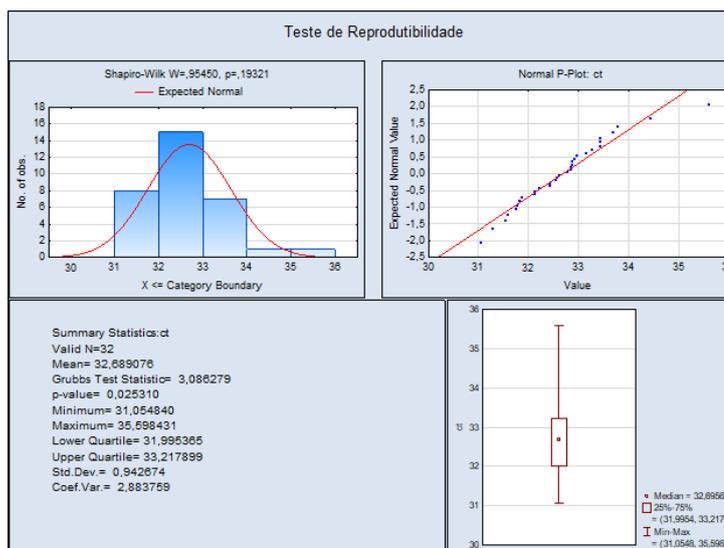


Figura 15: Análise Estatística Descritiva – Teste de Reprodutibilidade

Analisando os resultados obtidos, verificamos que todos os lotes analisados no teste de reprodutibilidade apresentaram coeficiente de variação com valor máximo de 3,3%, sendo assim considerado baixo e desvio padrão máximo de 1,05, sendo os valores obtidos considerados significativos.

O objetivo é que a diluição tenha o menor coeficiente de variação possível, e com isso, o desvio padrão seja baixo. Sendo o coeficiente de variação baixo, temos alta reprodutibilidade, como analisamos neste gráfico os três testes realizados, o que é comprovado pelo teste de levene.

Tabela 8: Análise Estatística – Teste de Reprodutibilidade

	N° lotes	Média	Mínima	Máxima	Desvio Padrão	CV%
Lote 1	8	32,11	31,05	34,44	1,05	3,3%
Lote 2	8	32,44	31,54	33,77	0,72	2,2%
Lote 3	8	32,82	31,58	33,44	0,62	1,9%
Geral	24	32,69	31,05	35,60	0,94	2,9%

Já aplicando o teste de Levene, para avaliar a reprodutibilidade, verificou-se que o teste apresentou p valor de 0,84, sendo considerado assim os valores significativos, sendo as médias obtidas, consideradas sem variação significativa.

Tabela 9: Análise Estatística – Teste de Levene

Teste de Levene - Homogeneidade de Variância				
	MS	MS	F	P
ct	0,008244	0,332083	0,265728	0,849504

Finalizando os testes para padronização de uma amostras controle, realizamos o teste de estabilidade da amostra de cultura positiva diluída, afim de se diminuir o viés de diluição nas análises de controle de qualidade. As concentrações utilizadas foram as já empregadas para os demais patógenos nos testes de controle de qualidade do kit NAT Plus.

As amostras de *P. falciparum* que foram aliquotadas e congeladas a -80°C foram descongeladas e as amostras de DNA extraídas.

Abaixo, segue as figuras (15,16,17 e 18) e as tabelas (8,9,10 e 11) com os resultados obtidos durante o teste de estabilidade da diluição seriada da amostra de *P. falciparum*.

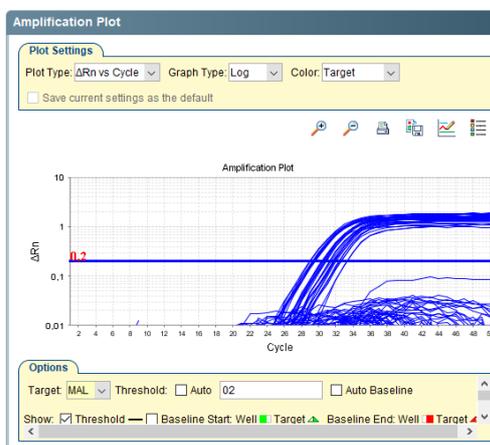


Figura 16: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T0).

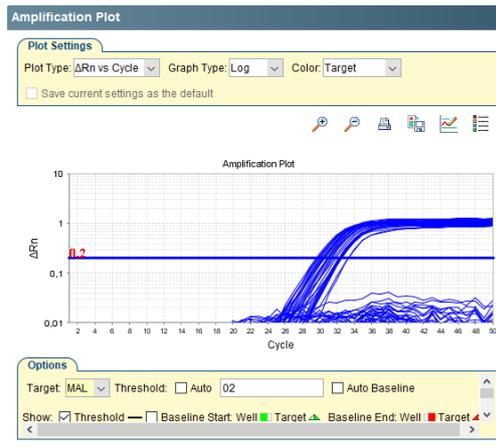


Figura 17: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T1).

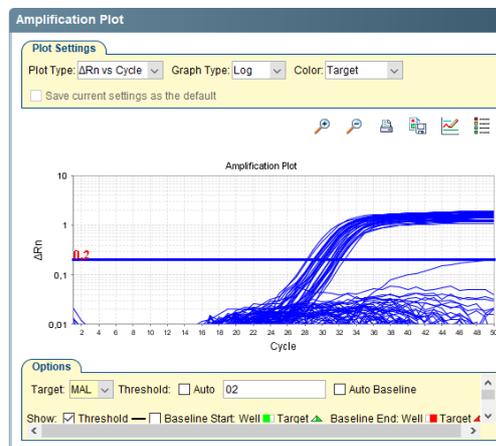


Figura 18: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T2).

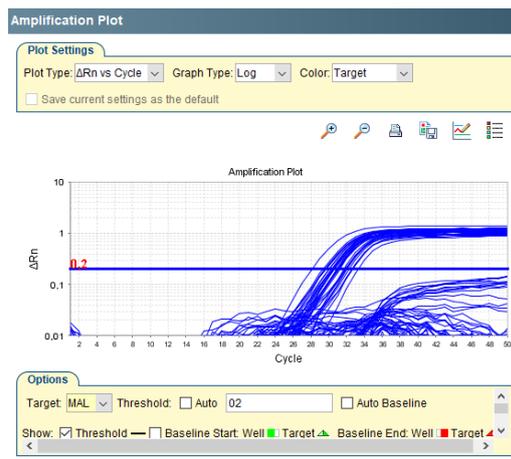


Figura 19: PCR em tempo real da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T3).

Tabela 10: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T0).

Análise MAL			
5	6	7	8
29,39	30,80	31,16	33,17
29,44	30,47	31,70	32,56
29,50	30,43	31,94	31,21
29,58	30,72	30,84	32,54
29,00	28,92	31,76	31,71
29,22	30,38	31,46	32,33
29,45	29,28	31,99	32,32
30,32	30,59	31,80	33,21

Tabela 11: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T1).

Análise MAL			
1	2	3	4
32,14	31,22	32,06	33,05
30,84	30,36	32,50	33,56
31,24	30,69	31,41	32,61
29,66	31,78	30,95	32,59
29,72	31,95	31,91	32,73
30,74	31,53	32,63	31,92
30,30	29,59	30,96	34,00
32,47	30,97	32,53	33,50

Tabela 12: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T2).

Análise MAL			
1	2	3	4
31,39	30,44	31,84	33,10
30,94	29,80	31,01	33,13
31,29	30,93	30,90	32,29
29,76	31,56	31,21	32,04
29,48	31,48	31,23	33,13
30,27	30,63	31,93	31,67
30,61	28,98	30,56	33,33
32,16	31,24	32,21	34,32

Tabela 13: Resultados obtidos da diluição seriada da amostra de cultura de *P.falciparum* (T3).

Análise MAL			
8	9	10	11
31,08	33,23	32,95	34,75
30,75	31,94	31,02	33,62
29,81	31,88	31,25	35,59
31,56	32,28	33,28	33,29
30,63	31,21	33,15	34,64
30,57	32,06	32,59	33,44
30,64	31,16	31,73	32,44
31,00	31,90	34,15	34,13

A análise do teste de estabilidade apresentou valores normais e coeficiente de variação de 4,26, sendo considerado baixo, conforme figura abaixo.

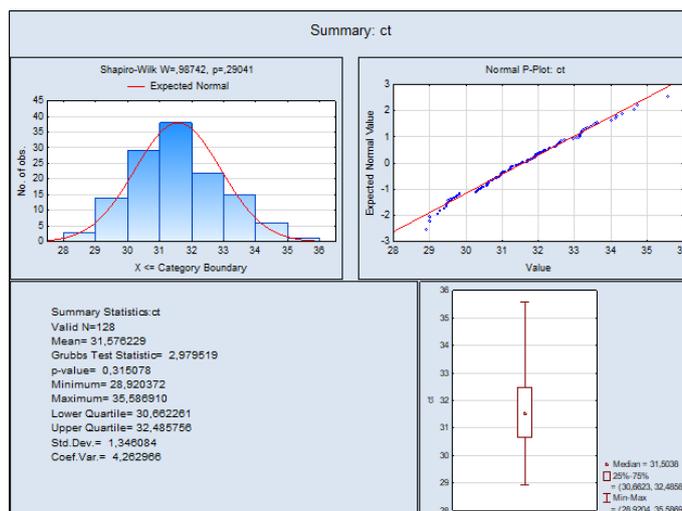


Figura 20: Análise Estatística Descritiva – Teste de Estabilidade

Verificamos que as diluições analisadas no teste de estabilidade apresentaram coeficiente de variação com valor máximo de 3,34%, sendo assim considerado baixo e desvio padrão máximo de 1,08, sendo os valores obtidos considerados significativos.

O objetivo é que a diluição tenha o menor coeficiente de variação possível, mesmo com o congelamento como viés, e com isso, nosso desvio padrão ser baixo. Foi admitido o CV de 10%. Sendo o coeficiente de variação baixo, temos alta reprodutibilidade, como analisamos neste gráfico os três testes realizados, o que é comprovado pelo teste de levene.

Tabela 14: Análise Estatística – Teste de Estabilidade

Variável	Replicatas	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	CV%
T0, C1	8	29,49	29,00	30,32	0,38	1,29
T0, C2	8	30,20	28,92	30,80	0,70	2,32
T0, C3	8	31,58	30,84	31,99	0,40	1,27
T0, C4	8	32,38	31,21	33,21	0,67	2,08
T1, C1	8	30,89	29,66	32,47	1,03	3,34
T1, C2	8	31,01	29,59	31,95	0,79	2,53
T1, C3	8	31,87	30,95	32,63	0,69	2,17
T1, C4	8	33,00	31,92	34,00	0,67	2,03
T2, C1	8	30,74	29,48	32,16	0,89	2,90
T2, C2	8	30,63	28,98	31,56	0,88	2,89
T2, C3	8	31,36	30,56	32,21	0,57	1,83
T2, C4	8	32,88	31,67	34,32	0,84	2,56
T3, C1	8	30,75	29,81	31,56	0,51	1,64
T3, C2	8	31,96	31,16	33,23	0,65	2,03
T3, C3	8	32,50	31,02	34,15	1,08	3,32
T3, C4	8	33,99	32,44	35,59	0,99	2,93
Geral	128	31,58	28,92	35,59	1,35	4,26

Dados confirmados pelo teste de Levene, para avaliação da reprodutibilidade, verificou-se que o teste apresentou p valor de 0,13, sendo considerado assim os valores significativos, sendo as médias obtidas, consideradas sem variação significativa.

Tabela 15: Análise Estatística – Teste de Levene – Teste de Estabilidade

Teste de Levene - Homogeneidade de Variância				
	MS	MS	F	P
ct	0,264739	0,180529	1,466468	0,13001

Diante dos resultados demonstrados, podemos afirmar que a amostra de cultura positiva para *P.falciparum* diluída e armazenada a -80°C , pode ser utilizada por até 30 dias e foram validadas no estudo para aplicação nas análises de controle de qualidade do kit NAT Plus Bio-Manguinhos. Ressaltamos que a cada novo recebimento de amostra de *P.falciparum*, a padronização deve ser refeita, visto que não há protocolo existente para quantificação parasitária direta da amostra.

6 CONCLUSÃO

A padronização da amostra de cultura de *P.falciparum* a ser utilizada nas análises de controle de qualidade do kit NAT Plus Bio-Manguinhos foi obtida.

A diluição da amostra apresentou estabilidade a -80°C por 30 dias, em todas as diluições.

A padronização deve ser realizada a cada novo recebimento de amostra de cultura de *P.falciparum*, para produção do painel para controle de qualidade.

A padronização da amostra de cultura positiva para malária tornou o controle de qualidade do kit NAT Plus Bio-Manguinhos viável e com custo reduzido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAN F. COWMAN et al. Malaria: Biology and Disease. *Cell*, v. 167, p. 15, 2016.

ALMEIDA, L. C. DE. Controle de qualidade de reativos para diagnósticos de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ. 2014.

ANDREA PETRY. **IMPLANTAÇÃO DOS TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS HIV/HCV BIO-MANGUINHOS® NA TRIAGEM DE DOADORES DE SANGUE: QUESTÕES EPIDEMIOLÓGICAS E LOGÍSTICAS**. Tese (Doutorado)—FLORIANÓPOLIS: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2013.

BATISTA-DOS-SANTOS, S. et al. Real-time PCR diagnosis of *Plasmodium vivax* among blood donors. *Malaria Journal*, v. 11, 2012.

BATISTA-DOS-SANTOS, S. A. et al. Strategy to improve malaria surveillance system preventing transfusion-transmitted malaria in blood banks using molecular diagnostic 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. *Malaria Journal*, v. 17, n. 1, 2018.

BIO-MANGUINHOS. **Bio-Manguinhos/Fiocruz - Inovação em saúde**. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/#>>. Acesso em: 9 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA-RDC Nº 16, DE 28 DE MARÇO DE 2013. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso In Vitro e dá outras providências. *Diário Oficial da União*. 2013, p. 20.

BRASIL. PORTARIA Nº 158, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2016. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. *Diário Oficial da União*. 2016.

BRITISH BLOOD TRANSFUSION SOCIETY. Prevalence of malaria antigen positivity among blood donors in a regional blood transfusion centre in western India. *Transfusion Medicine*, v. 27, p. 3, 2017.

CHRISTEL G HAANSHUUS et al. A novel, single-amplification PCR targeting mitochondrial genome highly sensitive and specific in diagnosing malaria among returned travellers in Bergen, Norway. *Malaria Journal*, v. 12, n. 26, p. 8, 2013.

COSTA, J. S. D. **Avaliação da susceptibilidade in vitro de isolados de campo de Plasmodium falciparum e Plasmodium vivax a substâncias e extratos de plantas amazônicas**. Dissertação de mestrado—Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2016.

FOLEGATTI, P. M. et al. A systematic review on malaria sero-epidemiology studies in the Brazilian Amazon: insights into immunological markers for exposure and protection. *Malaria Journal*, v. 16, n. 1, p. 107, dez. 2017.

GRUENBERG, M. et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: Pitfalls and solutions. *Malaria Journal*, v. 17, n. 1, 2018.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 26, p. 15, 2016.

HANALYDIA DE MELO MACHADO. **Avaliação dos efeitos da conversão do plasma sobre a reatividade e estabilidade de painéis sorológicos para diagnóstico da sífilis**. Trabalho de Conclusão de Curso—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

HONG LIN et al. Selective malaria antibody screening among eligible blood donors in Jiangsu, China. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 59, n. 43, p. 4, 2017.

JIANHAI YIN; MEI LI, HE YAN; SHUISEN ZHOU. Considerations on PCR-based methods for malaria diagnosis in China malaria diagnosis reference laboratory network. **BioScience Trends**, n. 12, p. 5, 2018.

KÁTIA LUZ TORRES et al. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of Plasmodium vivax in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. **Parasitol Res**, 10.1007/s00436-005-0085-8. v. 98, p. 6, 2006.

KOICHI KAMEDA; MARILENA C. D. V. CORRÊA; MAURICE CASSIER. A incorporação do teste diagnóstico baseado na amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para triagem de sangue no SUS: arranjos tecnológicos para a nacionalização do “NAT brasileiro”. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 28, n. 1, p. 21, 2018.

LIMA, G. F. M. C. et al. Asymptomatic infections in blood donors harbouring Plasmodium: an invisible risk detected by molecular and serological tools. **Blood Transfusion**, 1 jan. 2018.

LIMA, G. F. M. DE C. **Plataforma para detecção de Plasmodium em doadores de sangue de áreas endêmicas e não endêmicas brasileiras: processamento em pool utilizando marcadores moleculares e sorológicos**. Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias—São Paulo: Universidade de São Paulo, 11 abr. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 158, DE 4 DE FEVEREIRO DE 2016. . 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA E DIRETORIA TÉCNICA DE GESTÃO. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Brasília: Ministério da Saúde, [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Portaria nº 112, de 29 de janeiro de 2004. Dispõe sobre a implantação, no âmbito da Hemorrede Nacional, da realização dos testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos (NAT), para HIV e HCV. . 2004.

MIOTO, L. D.; GALHARDI, L. C. F.; AMARANTE, M. K. Aspectos parasitológicos e imunológicos da malária. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, p. 42–55, 2012.

NAVEEN AGNIHOTRI; AJJU AGNIHOTRI. Clinical Malaria as a Rare post Blood Donation Complication. **Indian J Hematol Blood Transfus**, v. 34, n. 3, p. 2, 2018.

- OGLIARI, P. J.; PACHECO, E. J. A. **Análise Estatística usando o Statistica 6.0**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
- PAESE, C.; CATEN, C. TEN; RIBEIRO, J. L. D. Aplicação da análise de variância na implantação do CEP. **Production**, v. 11, n. 1, p. 17–26, jun. 2001.
- REGINA M. ALHO et al. Alternative transmission routes in the malaria elimination era: an overview of transfusion-transmitted malaria in the Americas. **Malaria Journal**, v. 16, n. 78, p. 14, 2017.
- RIBOLDI, J.; BARBIAN, M. H. Precisão e poder de testes de homocedasticidade paramétricos e não paramétricos avaliados por simulação. **Precisão e poder de testes de homocedasticidade paramétricos e não-paramétricos avaliados por simulação**, p. 11, 2014.
- RUI MOREIRA BRAZ; CHRISTOVAM BARCELLOS. Análise do processo de eliminação da transmissão da malária na Amazônia brasileira com abordagem espacial da variação da incidência da doença em 2016*. **Epidemiol. Serv. Saude, Brasília**, v. 27, n. 3, p. 13, 2018.
- SÁEZ-ALQUÉZAR, A. et al. Controle da malária transfusional em região endêmica e não endêmica do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 8, 1998.
- SCHINDLER, T. et al. Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, 2019.
- SEAN C. MURPHY et al. Review Article: Malaria Diagnostics in Clinical Trials Sean. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 5, p. 16, 2013.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial Malária 2020. p. 118, nov. 2020.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 15. **Dia mundial de luta contra a malária**, v. 52, p. 27, abr. 2021.
- TÂNIA REIS et al. Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infecção por Plasmodium sp. entre 2010-2017. **Artigos Breves**, v. 22, n. 12, p. 6, 2018.
- TANOS C. C. FRANÇA; MARTA G. DOS SANTOS; JOSÉ D. FIGUEROA-VILLAR. MALÁRIA: ASPECTOS HISTÓRICOS E QUIMIOTERAPIA. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 8, 2008.
- THEODOOR VISSER et al. Rapid diagnostic tests for malaria. **Bull World Health Organ**, n. 93, p. 5, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges**. Geneva: World Health Organization, 2020.