

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

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INFECÇÕES MALÁRICAS SUBCLÍNICAS E
MISTAS POR ALVOS NÃO RIBOSSOMIAIS DE *Plasmodium vivax* E *Plasmodium
falciparum***

por

Lara Cotta Amaral

Belo Horizonte

2019

TESE DCS-IRR

L.C. AMARAL

2019

LARA COTTA AMARAL

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INFECÇÕES MALÁRICAS SUBCLÍNICAS E
MISTAS POR ALVOS NÃO RIBOSSOMIAIS DE *Plasmodium vivax* E *Plasmodium
falciparum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho

Coorientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Belo Horizonte

2019

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

A485i Amaral, Lara Cotta.
2019

Identificação molecular de infecções maláricas subclínicas e mistas por alvos não ribossomais de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* / Lara Cotta Amaral. – Belo Horizonte, 2019.

XIV, 109 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 78 - 86

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Malária 2. Malária/diagnóstico 3. PCR/utilização
I. Título. II. Carvalho, Luzia Helena (Orientação). III.
Sousa, Taís Nóbrega de (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

LARA COTTA AMARAL

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE INFECÇÕES MALÁRICAS SUBCLÍNICAS E MISTAS POR ALVOS NÃO RIBOSSOMIAIS DE *Plasmodium vivax* E *Plasmodium falciparum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca examinadora:

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

Prof. Dra. Patrícia Flávia Quaresma (Instituto René Rachou) Titular

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Junior (Instituto Oswaldo Cruz) Titular

Prof. Dr. Job Alves de Souza Filho (Fundação Ezequiel Dias) Titular

Prof. Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior (Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais) Titular

Prof. Dr. Gregório Guilherme Almeida (Instituto René Rachou) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 28/03/2019.

*"A tarefa não é ver o que ninguém viu ainda,
mas pensar aquilo que ninguém pensou a
respeito daquilo que todo mundo vê."*

(Arthur Schopenhauer)

Dedico este trabalho

À minha mãe e ao Danilo, por serem meus maiores incentivadores.

Aos pacientes com malária, por darem sentido a esta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Aos essenciais para a realização desta pesquisa:

Dra. Luzia, pela disposição em me orientar, pelos direcionamentos e ensinamentos, por contribuir para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Dra. Taís, pelas nossas ricas discussões, ensinamentos e contribuições.

Dra. Cristiana, pelo tempo a mim dedicado, pelos incentivos e confiança.

Dra. Flora, pelos esclarecimentos e disposição em ajudar sempre.

Demais professores do curso, pelas oportunidades valiosas e ensinamentos.

Colegas do laboratório, pela convivência. Em especial, à Sarah, Denise, Aracele, Gabriel, Laíse e Helena pela amizade e carinho, e pela disposição em me auxiliar nas dificuldades.

Mika, pela disposição e esforço para conseguir meus reagentes.

Colaboradores desta pesquisa, Dr. Jean Limongi, Dr. Cor Fontes e Dr. Dhelio Pereira, pela disponibilidade e cuidado na coleta e envio das amostras, sem as quais não haveria esta pesquisa.

Luiz e Daniela, pela colaboração nos experimentos.

Plataforma de PCR em Tempo Real do IRR (Fernanda e Pedro), pela infraestrutura necessária à realização dos meus experimentos, pelo carinho e atenção.

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do IRR, pela oferta deste curso com qualidade.

Biblioteca do IRR, pelo acesso gratuito à informação técnico-científica, sustentada por recursos públicos federais, além da catalogação desta tese.

Agências financiadoras CNPq, FAPEMIG e Programa de Excelência em Pesquisa (PROEP) do IRR/FIOCRUZ pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

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

AGRADECIMENTOS

A quem faz a caminhada da vida mais agradável:

Deus, por ser sempre o melhor caminho; pela esperança, capacitação e por ser a fonte das minhas forças.

Minha mãe, por ser meu exemplo e minha melhor amiga. Pelo seu amor incondicional e incentivo para a continuação dos meus estudos.

Meu pai, pela torcida.

Dani e Gianluca, sobrinhos queridos, que me atribuem a difícil tarefa de ser o melhor exemplo que eu puder e sempre me cercam com todo seu amor.

Danilo, pelo companheirismo, amor e cuidado; por ser luz na minha vida.

Amigos de vida, que são a rede de apoio fundamental, pela parceria, diversão, paciência e sábios conselhos. Em especial, à Anninha, Mandinha e Samira, que desde a época de escola têm cultivado meu amor e amizade. À Tata, Fernando, Simão e Bela, pela amizade que se fortalece, pelas risadas e conselhos.

Jaque, pelo carinho e incentivo sempre, por me acolher no seu coração de ouro há tantos anos e me aconselhar com sabedoria.

RESUMO

Em áreas endêmicas para malária, o diagnóstico molecular de infecções por *Plasmodium* tem identificado altas frequências de infecções de baixa densidade, abaixo do limite de detecção da microscopia convencional. Muitas são as implicações destes achados, já que os portadores de malária submicroscópica podem transmitir os parasitos, atuando como reservatórios da doença. Historicamente, a maioria dos protocolos de PCR para malária se baseia na amplificação das poucas cópias do gene *18S rRNA*, que apresenta baixa sensibilidade e reprodutibilidade. Na última década, a mineração de dados genômicos dos parasitos do gênero *Plasmodium* permitiu a descoberta de novos alvos espécie-específicos múltiplas cópias – tais como Pvr47 em *P. vivax* e Pfr364 em *P. falciparum* – promissores para o diagnóstico molecular da malária. Neste trabalho, nós desenvolvemos um protocolo de PCR em tempo real não ribossomal (NR-qPCR) para amplificar os alvos Pvr47/Pfr364. A NR-qPCR foi comparada a três protocolos de PCR bem estabelecidos, dois deles baseados no gene *18S rRNA* (Nested-PCR e R-qPCR) e um terceiro, o ensaio de PCR original que possui como alvos Pvr47/Pfr364 (NR-cPCR). Curvas de titulação de infecções mistas artificiais por *P. vivax* e *P. falciparum* demonstraram um aumento de sensibilidade da NR-qPCR em comparação com os outros ensaios de PCR, mesmo quando o DNA de uma das espécies esteve presente em uma proporção cem vezes menor do que da outra espécie. A avaliação dos quatro ensaios de PCR em amostras de campo, incluindo indivíduos sintomáticos ou assintomáticos, confirmou que as infecções maláricas submicroscópicas não foram prevalentes entre os pacientes sintomáticos, mas representaram uma grande proporção (até 77%) entre os indivíduos assintomáticos, expostos à malária na Amazônia. De relevância, a amplificação de diferentes alvos plasmodiais (Pvr47/Pfr364 e gene *18S rRNA*) não aumentou a chance de detecção de infecções maláricas submicroscópicas. Como a maioria das infecções subclínicas foi causada por *P. vivax*, a forma mais comum de malária na floresta amazônica, futuros estudos devem investigar o potencial de Pvr47/Pfr364 para detectar infecções de malária mista em campo.

Palavras-chave: malária; Plasmodium; diagnóstico molecular; PCR; alvo ribossomal, não ribossomal.

ABSTRACT

In malaria endemic areas, the molecular diagnosis of *Plasmodium* infections has identified high frequencies of low-density infections, beneath the limit of detection of the conventional microscopy. Many are the implications of these findings as submicroscopic malaria carriers may be able to transmit the parasites, acting as reservoirs of the disease. Historically, most malaria PCR-based protocols rely on amplification of the few copies *18S rRNA* gene, which presents low sensitivity and reproducibility. In the last decade, the genomic data mining of *Plasmodium* parasites allowed the discovery of new species-specific multi-copy targets – such as Pvr47 for *P. vivax* and Pfr364 for *P. falciparum* – which seem promising for malaria molecular diagnosis. Here, we developed a non-ribosomal real-time PCR protocol (NR-qPCR) to amplify the Pvr47/Pfr364 targets. The NR-qPCR was compared with three well-established PCR protocols, two of them based on the *18S rRNA* gene (Nested-PCR and R-qPCR) and the third one, the original PCR assay targeting Pvr47/Pfr364 (NR-cPCR). End-point titration curves of artificial mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections demonstrated an increase sensitivity of NR-qPCR as compared with the other PCR assays, even when the DNA of one of the species was present in a ratio of hundred-times lower than of the other species. Evaluation of the four PCR assays in field samples, including from individuals symptomatic or asymptomatic, confirmed that submicroscopic malaria infections were not prevalent among symptomatic patients, but represented a large proportion (up to 77%) among asymptomatic Amazonian malaria-exposed individuals. Of relevance, the amplification of different plasmodial targets (Pvr47/Pfr364 and *18S rRNA gene*) did not increase the chances of detecting submicroscopic malaria infections. As the majority of subclinical infections were caused by *P. vivax*, the commonest form of malaria in the Amazon rain forest, future studies should investigate the potential of Pvr47/Pfr364 to detect mixed-malaria infections in the field.

Keywords: malaria; Plasmodium; molecular diagnosis; ribosomal, non-ribosomal PCR targets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição da malária no mundo em 2014	16
Figura 2: Incidência de malária no Brasil no período 1960-2015	21
Figura 3: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Plasmodium spp.</i> ...	23
Figura 4: Distribuição dos membros da família Pfr364 nos 14 cromossomos de <i>P. falciparum</i>	31
Figura 5: Alinhamento das 14 cópias de Pvr47 no genoma de <i>P. vivax</i> (Sal-1) com destaque para as regiões onde foram desenhados os iniciadores e sonda	40
Figura 6: Alinhamento das 41 cópias de Pfr364 no genoma de <i>P. falciparum</i> (3D7, subfamílias 1 e 2) com destaque para as regiões onde foram desenhados os iniciadores e sonda	41
Figura 7: Fluxograma para avaliação dos protocolos moleculares em amostras de campo	46
Figura 8: Curvas de amplificação da NR-qPCR para os alvos Pvr47 (<i>P. vivax</i>) e Pfr364 (<i>P. falciparum</i>) nas temperaturas 60°C, 58°C, 55°C, 52°C e 50°C	52
Figura 9: Emissão de fluorescência obtida para cada concentração de iniciadores testada para o alvo Pvr47 (<i>P. vivax</i>)	53
Figura 10: Emissão de fluorescência obtida para cada concentração de iniciadores testada para o alvo Pfr364 (<i>P. falciparum</i>)	54
Figura 11: Análise para determinação das concentrações de sonda ideais nas reações da NR-qPCR para os alvos Pvr47 e Pfr364	55
Figura 12: Curvas de amplificação da NR-qPCR para os alvos Pvr47 e Pfr364 em amostras de campo sabidamente infectadas por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> com parasitemias patentes e subpatentes	57
Figura 13: Limites de detecção para Pvr47 e Pfr364 amplificados pela NR-qPCR	59
Figura 14: Especificidade da amplificação dos alvos Pvr47 para <i>P. vivax</i> e Pfr364 para <i>P. falciparum</i>	61
Figura 15: Positividade para malária entre indivíduos com suspeita clínica de malária (n=110) de acordo com a microscopia óptica (MO) ou protocolos moleculares baseados nos alvos ribossomal (18S rRNA) ou não ribossomal	

(NR)	68
Figura 16: Positividade para malária entre indivíduos com suspeita de malária subclínica (n=324) de acordo com a microscopia óptica (MO) ou protocolos moleculares baseados nos alvos ribossomal (18S <i>rRNA</i>) ou não ribossomal (NR)	70
Figura 17: Diagrama de Venn de infecções submicroscópicas por malária (n=73), identificadas por cada protocolo molecular baseado nos alvos ribossomal (Nested-PCR e R-qPCR) e não-ribossomais (NR-cPCR e NR-qPCR)	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados para as reações de Nested-PCR e seus respectivos amplicons	48
Tabela 2: Sondas utilizadas na detecção do 18S rRNA de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> pela R-qPCR	49
Tabela 3: Resultados iniciais da NR-qPCR em amostras de campo com infecção única patente e subpatente por <i>P. vivax</i> ou <i>P. falciparum</i> , cujas parasitemias foram determinadas previamente pela microscopia óptica e/ou outros protocolos de PCR	56
Tabela 4: Diluição seriada dos plasmídeos de Pvr47 e Pfr364 e amplificação pela NR-qPCR	58
Tabela 5: Titulação de amostra de campo infectada por <i>P. vivax</i> em diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares	62
Tabela 6: Titulação de amostra de campo infectada por <i>P. falciparum</i> em diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares	63
Tabela 7: Titulação do DNA de <i>P. falciparum</i> presente em misturas artificiais de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> por protocolos moleculares ribossomais (Nested-PCR e R-qPCR) e não ribossomais (NR-cPCR e NR-qPCR)	65
Tabela 8: Titulação do DNA de <i>P. vivax</i> presente em misturas artificiais de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> por protocolos moleculares ribossomais (Nested-PCR e R-qPCR) e não ribossomais (NR-cPCR e NR-qPCR)	66
Tabela 9: Sensibilidade e especificidade dos diagnósticos moleculares em amostras de indivíduos com suspeita clínica de malária (n=110)	69
Tabela 10: Sensibilidade e especificidade dos diagnósticos moleculares em amostras de indivíduos com suspeita de malária subclínica (n=324)	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT – *Artemisinin-based combination therapy* (terapia combinada à base de artemisinina)

AIM – *Action and Investment to Defeat Malaria* (Ação e Investimento para Combater a Malária)

C_q – *Quantification Cycle* (limiar de detecção)

DNA – *Desoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

g – Força centrífuga em medida da gravidade da Terra

GTS – *Global Technical Strategy for Malaria* (Estratégia Técnica Global para a Malária)

LAMP – *Loop Mediated Isothermal Amplification* (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop)

MO – Microscopia óptica

n – Número de indivíduos

nM – Nanomolar

OMS – Organização Mundial de Saúde

P.A – Pró-análise

pb – Pares de base

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

Pf – *Plasmodium falciparum*

PNHs – primatas não humanos

Pv – *Plasmodium vivax*

Pv+Pf – Coinfecção por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*

p/μL – parasitos por microlitro de sangue

qPCR – *Quantitative Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa ou em tempo real)

RDT – *Rapid Diagnostic Test* (Teste Rápido para Diagnóstico)

TAE – Tampão Tris-acetato EDTA, pH 8,0

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

μL – Microlitro

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Malária no mundo e desafios para o controle	16
1.2 Malária no Brasil	20
1.3 Ciclo biológico dos parasitos da malária humana	22
1.4 Diagnóstico Laboratorial da Malária Humana	25
1.4.1 Microscopia Óptica e Testes Rápidos	25
1.4.2 Detecção molecular dos parasitos da malária	27
1.4.2.1 Alvos não ribossomais para o diagnóstico molecular de malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	30
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 Pannel de amostras de referência	35
4.2 População de estudo	35
4.3 Diagnóstico Microscópico	37
4.4 Ensaio moleculares	37
4.4.1 Extração de DNA	37
4.4.2 PCR em Tempo Real para os alvos não ribossomais Pvr47 e Pfr364 (NR-qPCR)	39
4.4.2.1 Desenho de iniciadores e sondas para os alvos Pvr47 e Pfr364	39
4.4.2.2 Padronização da NR-qPCR para amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364	42
4.4.3 Limites de Detecção	42
4.4.3.1 Construção dos plasmídeos e curvas-padrão para determinação do limite de detecção da NR-qPCR	42
4.4.3.2 Titulação de amostras de DNA de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> em monoinfecção	44
4.4.3.3 Misturas artificiais de DNA de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> (coinfecção)	45
4.4.4 Avaliação da NR-qPCR em amostras de campo provenientes de	

indivíduos com malária clínica e subclínica	45
4.4.5 Outros protocolos moleculares	46
4.4.5.1 Amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 por PCR convencional, NR-cPCR (adaptado de Demas <i>et al.</i> , 2011)	46
4.4.5.2 Amplificação do gene <i>18S rRNA</i> por Nested-PCR (adaptado de Snounou <i>et al.</i> , 1993)	47
4.4.5.3 Amplificação do gene <i>18S rRNA</i> por PCR em Tempo Real, R-qPCR (adaptado de Rougemont <i>et al.</i> , 2004)	48
4.6 Análises Estatísticas	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Padronização da NR-qPCR para os alvos Pvr47 e Pfr364	51
5.1.1 Limites de detecção da NR-qPCR determinado por curva-padrão	57
5.1.2 Avaliação da especificidade analítica da NR-qPCR	59
5.2 Comparação dos limites de detecção da NR-qPCR e outros protocolos moleculares em amostras de campo previamente caracterizadas	61
5.2.1 Detecção de monoinfecções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	61
5.2.2 Detecção de coinfeções por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	64
5.3 Avaliação dos protocolos de PCR ribossomais e não ribossomais em amostras de indivíduos com malária clínica e subclínica	67
6 DISCUSSÃO	72
6.1 Protocolos moleculares ribossomais e não ribossomais em infecção única e mista por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	72
6.2 Alvos não ribossomais para o diagnóstico de malária em indivíduos com suspeita de malária clínica e subclínica	74
7 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE	87
Artigo publicado na revista <i>Malaria Journal</i> , em 30 de Abril de 2019	87
ANEXOS	101
Anexo I. Técnicas mais frequentemente utilizadas no diagnóstico da malária humana	101
Anexo II. Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas (protocolo N°	

358.698/2013)	102
Anexo III. Documento de prorrogação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas (parecer N° 1.821.955)	104
Anexo IV. Protocolo da NR-qPCR	107
Anexo V. Resultados discordantes entre os protocolos de diagnóstico molecular nas amostras de indivíduos com malária subclínica (n=79)	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária no mundo e desafios para o controle

A malária é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida por vetores da família Culicidae, gênero *Anopheles*, presente em cerca de 90 países e territórios do mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1). Atualmente, cinco espécies podem ser encontradas infectando o homem: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, sendo as duas primeiras mais importantes do ponto de vista de saúde pública. Enquanto o *P. vivax* é o parasito mais amplamente distribuído no mundo, o *P. falciparum* é responsável pelas formas mais graves da doença, com maior prevalência no continente africano (WHO, 2017a).

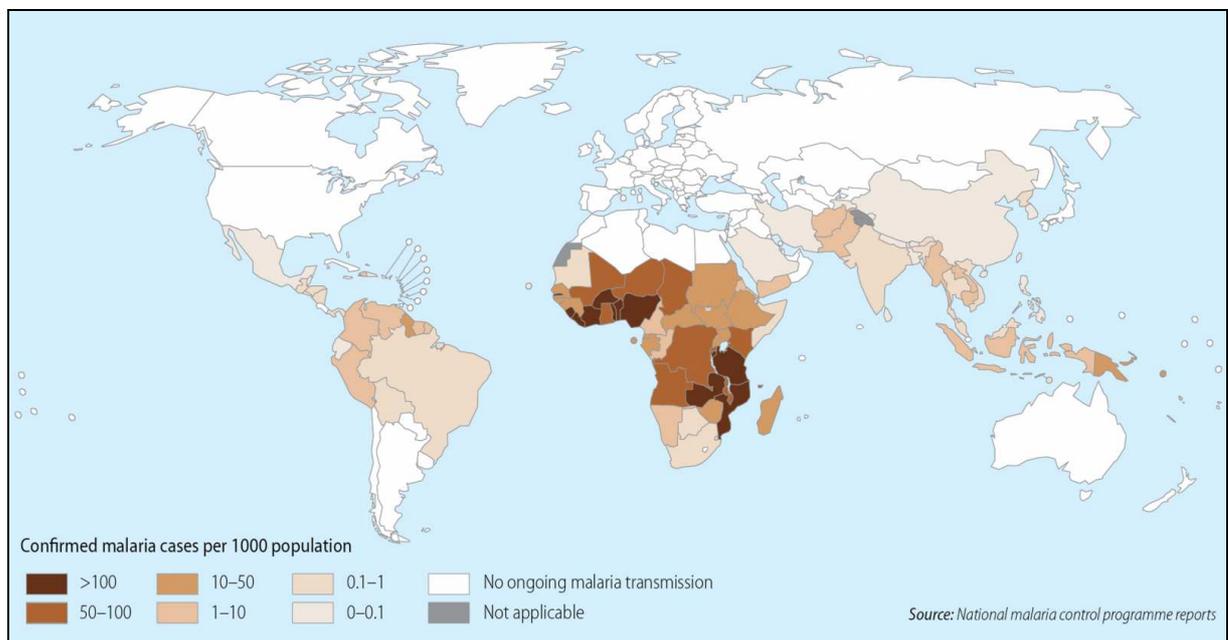


FIGURA 1: Mapa de distribuição da malária no mundo em 2014. Fonte: *World Malaria Report*, 2014.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 219 milhões de casos de malária ocorreram em 2017 no mundo, com 435.000 mortes estimadas, compreendendo principalmente crianças menores de 5 anos de idade

(266.000, equivalente a 61% do total global) (WHO, 2018). Neste mesmo período, *P. falciparum* representou 99,7% dos casos no continente africano, 62,8% no Sudeste Asiático e 69% no Mediterrâneo Oriental. Já *P. vivax*, espécie predominante nas Américas, representou 74,1% dos casos na região (WHO, 2018).

Apesar de ser responsável pelas formas mais graves da doença, o número de casos de *P. falciparum* vem reduzindo em várias regiões do mundo. Contribuíram para isto as medidas de controle adotadas nos últimos anos, que se basearam no diagnóstico e tratamento oportuno dos pacientes (WHO, 2016). Segundo a OMS, no continente africano, o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas foi um dos principais responsáveis pela redução da mortalidade causada por *P. falciparum* (WHO, 2018). No entanto, um fator ainda preocupante no que diz respeito ao controle da malária é a expansão da resistência em muitos países, tanto por parte dos plasmódios aos antimaláricos disponíveis (Achan *et al.*, 2018) quanto dos vetores em relação aos inseticidas utilizados (Clarkson *et al.*, 2018).

A resistência dos parasitos aos antimaláricos ainda constitui um grande obstáculo para o controle e a eliminação da malária em vários países (WHO, 2001; WHO, 2015a). No Brasil, o primeiro caso de resistência a drogas por *P. falciparum* foi relatado no século XIX, ao quinino, primeiro medicamento usado para o tratamento da malária (Neiva, 1910). Na década de 1960, um aumento de casos de resistência à cloroquina foi relatado, juntamente com outros países da América do Sul e Ásia (Hyde, 2005; Gama *et al.*, 2011). Entre os anos 1980 e 2000, o Brasil utilizou vários esquemas terapêuticos e adotou, em 2007, a terapia combinada recomendada pela OMS à base de artemisinina (ACT) (Gama *et al.*, 2011). Atualmente, a ACT constitui a primeira linha de tratamento para malária por *P. falciparum* em todos os países do mundo onde a doença é endêmica. Entretanto, o surgimento da resistência parcial à artemisinina e derivados em algumas regiões do mundo tem levado a falhas terapêuticas (revisto por Menard & Dondorp, 2017). No caso de *P. vivax*, o fator preocupante é o surgimento e expansão da resistência à cloroquina, composto de escolha para tratar na rotina os casos não complicados (Price *et al.*, 2014; Commons *et al.*, 2018).

No que diz respeito aos vetores da malária, segundo a OMS, dos 76 países com malária endêmica que forneceram dados para análises entre 2010 e 2016, 61 apresentaram pelo menos um vetor com resistência a pelo menos um inseticida

(WHO, 2017a). Em 50 países, foi relatada resistência a duas ou mais classes de inseticida. Já no ano de 2016, a resistência a um ou mais inseticidas foi observada em todas as regiões da OMS (WHO, 2017a). É necessário ressaltar, entretanto, que, em algumas partes do mundo, as ferramentas existentes para o controle de vetores não protegem efetivamente contra a doença, já que há uma grande diversidade de vetores da malária, que variam em aspectos biológicos e comportamentais (WHO, 2015b; Molina-Cruz *et al.*, 2016).

Embora *P. falciparum* seja responsável pelo maior número de mortes, principalmente no continente africano, o predomínio de *P. vivax* em regiões densamente povoadas, juntamente com sua associação a casos graves e fatais, tem destacado a importância desta infecção. Variações na biologia de *P. vivax*, incluindo sua habilidade em causar recaídas pela ativação de formas latentes no fígado (hipnozoítos) (Krotoski, 1989), tornam esta espécie de difícil controle, constituindo um grande desafio para o controle e eliminação da malária em vários países. Particularmente, porque os hipnozoítos constituem um reservatório potencial de infecção para os mosquitos vetores e permitem o prolongamento da infecção mesmo nas estações do ano que são inóspitas para o mosquito vetor, ampliando assim a faixa geográfica natural de infecção por esta espécie (Gething *et al.*, 2012; Howes *et al.*, 2016).

Diferenças na dinâmica dos estágios sanguíneos de *P. vivax* também parecem afetar a epidemiologia da doença, incluindo a capacidade deste parasito de produzir gametócitos precocemente, que são os estágios infectantes para os mosquitos vetores (Josling & Llinás, 2015; Howes *et al.*, 2016). Além disso, estudos em áreas hiperendêmicas têm demonstrado que a imunidade naturalmente adquirida contra *P. vivax* ocorre mais precocemente do que para *P. falciparum*, tornando crianças pré-escolares o principal grupo de risco para a malária vivax grave (Baird, 2013). Embora as razões para a aquisição mais rápida de imunidade seja desconhecida, a preferência do parasito por invadir reticulócitos muito jovens da medula óssea (CD71⁺) (Malleret *et al.*, 2015) pode contribuir na imunidade, já que infecções “crônicas” com baixas parasitemias parecem ser uma característica deste parasito (Adams & Mueller, 2017). De interesse, em regiões de baixa transmissão, como é o caso de áreas da América Latina, grande parte das infecções é

submicroscópica e assintomática, o que impõe grande obstáculo ao controle (Howes *et al.*, 2016).

Apesar dos desafios no controle da doença, nos últimos anos, a prevalência da malária diminuiu em vários países do mundo, o que resultou em uma redução na taxa de mortalidade pela doença entre 2010 e 2017, principalmente no Sudeste Asiático (54%), África (40%) e Mediterrâneo Oriental (10%). Como resultado do *Plano de Ação Global contra a Malária* (WHO, 2016b), as Américas também vivenciaram um declínio na morbidade (62%) e na mortalidade (61%) por malária durante os últimos 15 anos. No entanto, atualmente, a região das Américas tem registrado um aumento significativo no número de casos, decorrente do aumento da transmissão de malária no Brasil, Nicarágua e, particularmente, na República Bolivariana da Venezuela (Venezuela).

A crise política e humanitária sem precedentes que atingiu a Venezuela nos últimos anos tem gerado graves consequências sociais, com reflexos na saúde da população (Oletta *et al.*, 2014; Bello *et al.*, 2017). A atual precariedade do sistema de saúde, associada a pouca disponibilidade de alimentos, medicamentos, testes diagnósticos e suprimentos de primeiros socorros, tem colocado milhares de pessoas em risco de contrair doenças evitáveis e morte. A Venezuela, primeiro país da OMS a erradicar a malária em 1961 (Hotez *et al.*, 2017), apresentou um aumento de 365% no número de casos entre 2000 e 2015 (WHO, 2016). No ano de 2016, 240.613 casos foram notificados (WHO, 2017a), com um aumento de 69% em 2017, alcançando mais de 400 mil casos confirmados (WHO, 2018). A doença se espalhou para áreas onde a malária havia sido erradicada e a grande quantidade de casos sobrecarregou também a infraestrutura médica na fronteira com Brasil e Colômbia, países onde 78% e 81%, respectivamente, dos casos importados de malária em 2016 se originaram na Venezuela (Grillet *et al.*, 2018).

Muitos desafios existem para o controle e eliminação da malária, já que aproximadamente 3,2 bilhões de pessoas ainda vivem em situação de risco no mundo. Para enfrentar os desafios existentes, a Assembleia Mundial da Saúde (*World Health Assembly*) adotou, no ano de 2015, a chamada Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030 (*Global Technical Strategy for Malaria*, GTS), um projeto de 15 anos para o controle e eliminação da malária no mundo (WHO, 2015b). Esta estratégia é liderada pela OMS e complementada pelo plano de Ação e

Investimento para Combater a Malária 2016-2030 (*Action and Investment to Defeat Malaria*, AIM), desenvolvido pela *Roll Back Malaria Partnership*. Entre os objetivos da GTS incluem-se: (I) redução em pelo menos 90% da incidência de malária e das taxas de mortalidade no mundo, em comparação aos dados de 2015; (II) eliminação da doença em pelo menos 35 países com transmissão em 2015; e (III) prevenção do restabelecimento da malária nos países que já estão livres da doença (WHO, 2016b).

1.2 Malária no Brasil

No Brasil, as principais espécies de *Plasmodium* humanos circulantes são o *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, concentradas, principalmente, na região da Amazônia Legal, considerada área endêmica. *P. vivax* é responsável pela maioria dos casos no país (aproximadamente 80%), enquanto *P. falciparum*, apesar de menos prevalente (cerca de 20%), tem aumentado em proporção entre 2016 e 2017 (Ferreira & Castro, 2016; SVS/MS, 2018).

Nos últimos anos, menos de 200 mil casos anuais de malária têm sido registrados no Brasil (Figura 2), grande parte destes (99%) na região da Amazônia Legal (Recht *et al.*, 2017). Os casos notificados na Região Amazônica diminuíram de aproximadamente 142.000 em 2015 para 128.000 em 2016, o que significou uma redução de aproximadamente 10%. Entretanto, conforme dados do Ministério da Saúde, em 2017 o número de casos voltou a subir, tendo sido registrado aproximadamente 194.000 casos (SVS/MS, 2018). Os dados disponíveis de 2018 confirmam esta tendência de aumento, já que, no período de Janeiro a Novembro de 2018, cerca de 180.000 casos foram confirmados (SVS/MS, 2018).

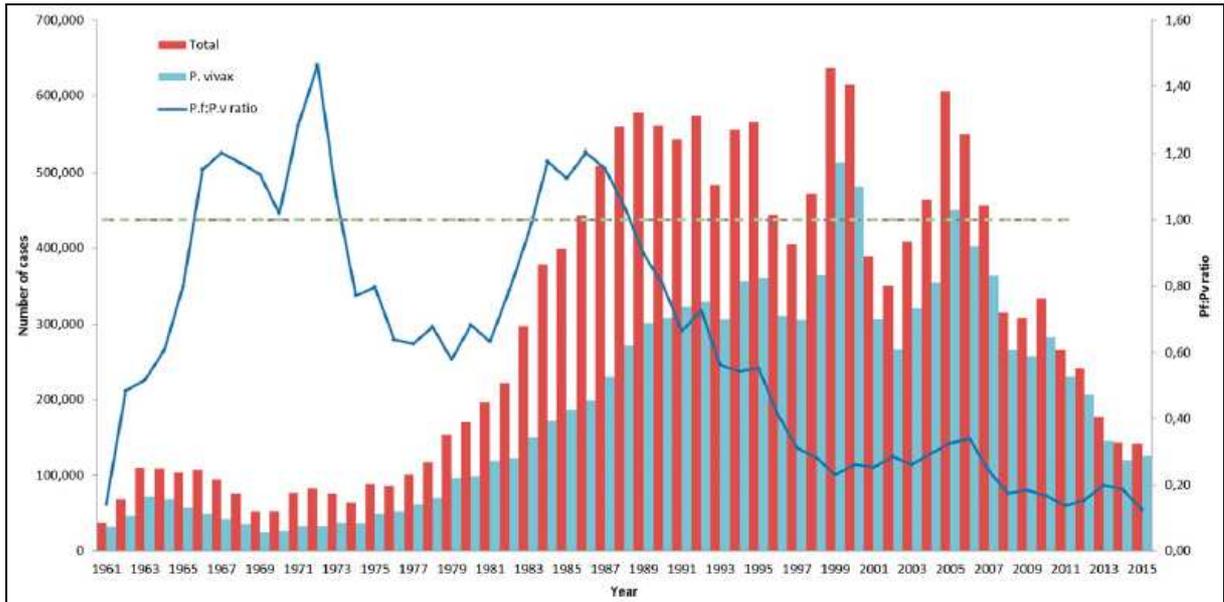


FIGURA 2: Incidência de malária no Brasil no período 1960-2015. O gráfico ilustra o número total de casos (barras vermelhas) e casos devido ao *P. vivax* (barras azul-claro) correspondentes ao eixo Y à esquerda. A relação *P. falciparum*:*P. vivax* é mostrada na linha azul-escura (eixo Y à direita). Fonte: Siqueira *et al.*, 2016.

Na região extra-amazônica, mais de 80% dos casos notificados são importados de estados da área endêmica, bem como de outros países do continente africano, asiático e América do Sul (De Pina-Costa *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2016; Recht *et al.*, 2017). No ano de 2017, 508 casos de malária foram diagnosticados na região extra-Amazônica e dados disponíveis de 2018 confirmam um aumento deste número, com 529 casos notificados até o mês de Agosto (SVS/MS, 2018). Nesta região, a malária é frequentemente diagnosticada tardiamente, o que leva a casos graves e mortalidade elevada quando comparada à região da Amazônia (De Pina-Costa *et al.*, 2014; Siqueira *et al.*, 2016).

De particular importância, um número significativo de casos autóctones tem sido relatado nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, principalmente em áreas de Mata Atlântica. De 2007 a 2016, mais de mil casos de malária foram notificados nessas áreas, a maioria atribuída a *P. vivax*/*P. simium* (De Pina-Costa *et al.*, 2014; Brasil *et al.*, 2017). Uma vez que os vetores presentes nestas áreas (espécies do subgênero *Kerteszia*) podem se alimentar em seres humanos e primatas não humanos (PNHs) (Laporta *et al.*, 2011), a transmissão zoonótica tem sido reforçada, com PNHs atuando como reservatório de espécies de *Plasmodium* capazes de infectar o homem, tais como *P. simium* e *P. brasilianum*, parasitos geneticamente similares a

P. vivax e *P. malariae*, respectivamente (Deane *et al.*, 1966; Brasil *et al.*, 2017; De Alvarenga *et al.*, 2018).

Para o programa de controle da malária no Brasil, além do diagnóstico precoce de parasitemias patentes, seria necessário incluir o diagnóstico de infecções subpatentes, já que estas infecções são reservatórios potenciais da doença na região Amazônica (Siqueira *et al.*, 2017; Bousema *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015). Nesse sentido, uma preocupação atual se concentra nos bancos de sangue, já que a malária pode ser transmitida por transfusões, particularmente, porque os doadores assintomáticos não são detectados pelos protocolos atuais de triagem (investigação apenas epidemiológica). No Brasil, apesar de ser desconhecida a frequência de malária transfusional, casos desta natureza já foram relatados (Kirchgatter *et al.*, 2005; Scuracchio *et al.*, 2011; Alho *et al.*, 2017).

Embora sejam recomendados testes para a detecção de *Plasmodium* em bancos de sangue no Brasil, não há indicação de qual teste deve ser utilizado. O diagnóstico microscópico é pouco sensível, principalmente em casos de baixas parasitemias, e os ensaios moleculares ainda não são empregados na rotina dos bancos de sangue (Lima *et al.*, 2016). De qualquer forma, a triagem do sangue antes da doação é um importante esforço no controle da malária e precisa ser considerada para limitar a transmissão da doença através da doação de sangue.

1.3 Ciclo biológico dos parasitos da malária humana

Os plasmódios possuem ciclo de vida heteroxênico, com reprodução assexuada no homem (hospedeiro intermediário) e sexuada no vetor anofelino (hospedeiro definitivo) (Figura 3).

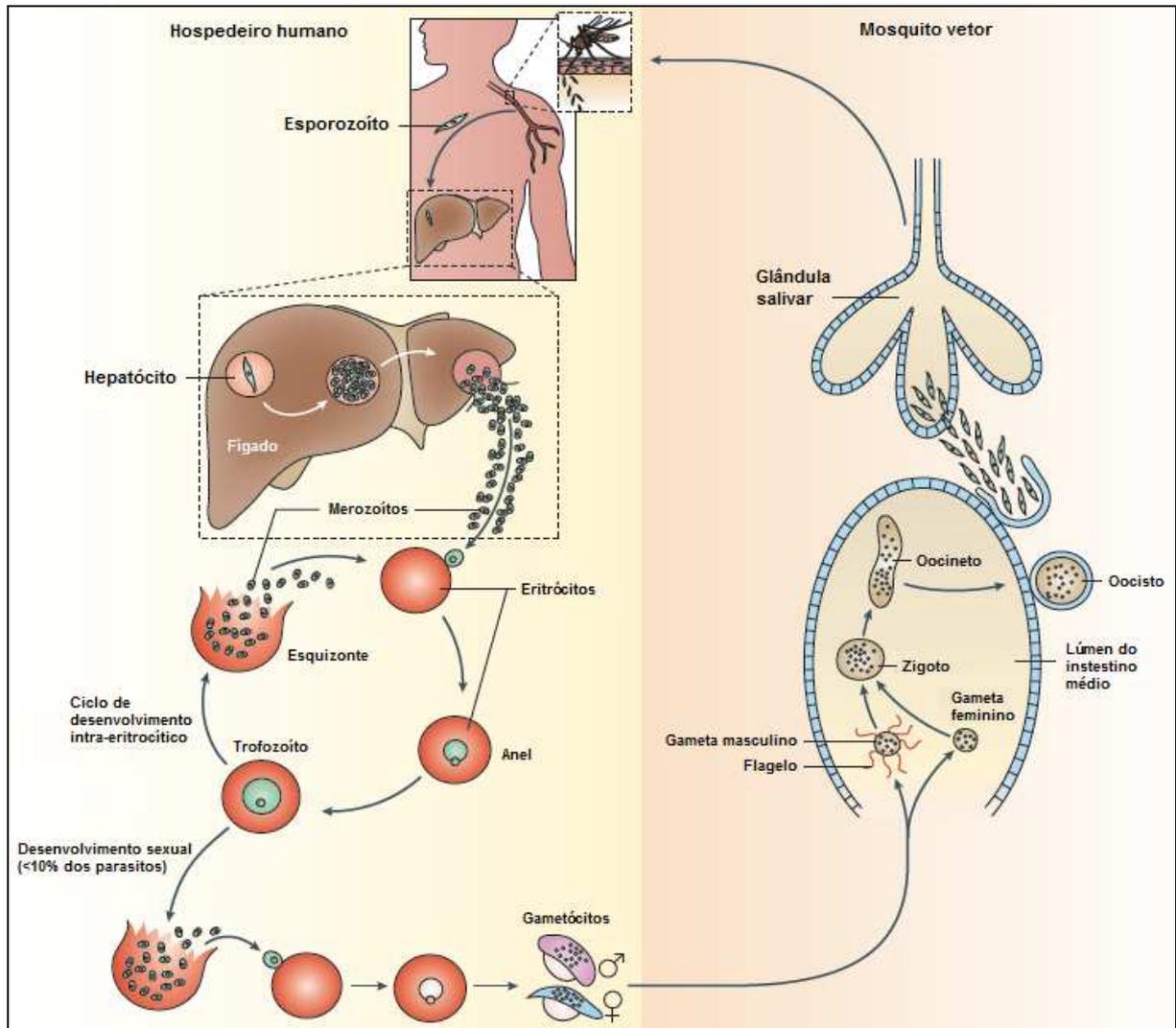


FIGURA 3: Representação esquemática do ciclo de vida do *Plasmodium* spp. Fonte: Adaptado de Josling & Llinás, 2015.

A infecção do indivíduo ocorre através da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, que inoculam as formas infectantes do parasito, denominadas esporozoítos, no momento do repasto sanguíneo. O fato dos esporozoítos poderem permanecer no tecido subcutâneo do indivíduo por um longo período de tempo após a picada (Amino *et al.*, 2006; Yamauchi *et al.*, 2007), pode levar a uma resposta imune inicial do hospedeiro, com destruição de grande parte dos parasitos (Sinnis & Zavala, 2012). Entretanto, alguns esporozoítos conseguem escapar e alcançam a corrente sanguínea, dando continuidade ao ciclo pré-eritrocítico.

Através da circulação, os esporozoítos chegam ao fígado e infectam os hepatócitos, se reproduzindo assexuadamente por esquizogonias teciduais. O

sucesso da invasão e desenvolvimento no fígado é dependente da motilidade do esporozoíto, que permite ao parasito migrar através de várias células e, finalmente, invadir e se desenvolver dentro de um vacúolo parasitóforo no hepatócito (Mota *et al.*, 2001; Ishino *et al.*, 2004; Hopp *et al.*, 2015). Os mecanismos pelos quais os esporozoítos passam dos capilares do fígado aos hepatócitos são complexos, envolvendo receptores específicos e diferentes rotas, incluindo trânsito através das células de Kupffer e/ou células endoteliais dos vasos sanguíneos (Pradel & Frevet, 2001; Ménard *et al.*, 2013).

O período de esquizogonia tecidual varia de 2 a 16 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*, sendo o desenvolvimento dos parasitos completamente dependente da presença do vacúolo parasitóforo (Sturm *et al.*, 2006). Algumas formas de *P. vivax* e *P. ovale*, os hipnozoítos, podem ficar em latência nos hepatócitos por meses ou anos, sendo reativadas por mecanismo ainda desconhecido, caracterizando as recaídas sanguíneas da doença (Krotoski, 1989; Olliaro *et al.*, 2016).

Após vários ciclos de multiplicação, os merozoítos são liberados dos esquizontes hepáticos através do brotamento de vesículas chamadas merossomos (Sturm *et al.*, 2006). Os merozoítos liberados na corrente sanguínea invadem os eritrócitos e iniciam o segundo ciclo de reprodução assexuada, o ciclo eritrocítico. A invasão do merozoíto nos eritrócitos é complexa, envolvendo muitas etapas (reconhecimento, reorientação e invasão) e diferentes receptores eritrocíticos, dependendo da espécie do parasito (Cowman *et al.*, 2017). Durante um período de 48 a 72 horas, os parasitos se desenvolvem nos eritrócitos até seu rompimento, quando são liberados novos merozoítos que invadirão novos eritrócitos. O ciclo eritrocítico é responsável pelos principais sintomas clínicos da doença, incluindo febre intermitente, calafrios, dores de cabeça e vômito, entre outros (White *et al.*, 2014; Phillips *et al.*, 2017). É nesta fase também que o diagnóstico de malária é realizado, já que parasitos ou seus produtos podem ser detectados na corrente sanguínea.

Em geral, após sucessivas replicações assexuadas nos eritrócitos, os parasitos se diferenciam em formas sexuadas infectantes para os vetores, denominadas gametócitos femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) (Josling & Llinás, 2015). Estes são ingeridos pelos anofelinos

durante o repasto sanguíneo e seguem para o intestino médio do inseto, onde realizam a reprodução sexuada. Após a fecundação dos gametas há formação do zigoto, que se transforma em uma forma móvel, o oocineto, que migra à parede do intestino médio do inseto gerando uma forma fixa, o oocisto, onde se desenvolvem os esporozoítos. Finalmente, o oocisto se rompe liberando esporozoítos na hemolinfa do anofelino e estes migram para suas glândulas salivares, sendo inoculados no sangue de um novo hospedeiro humano durante um novo repasto sanguíneo. É necessário ressaltar que, para serem transmitidos, os parasitos devem superar vários obstáculos no mosquito, tais como barreiras físicas e respostas imunes contra oocinetos e oocistos (Blandin *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2009; Barillas-Mury & Kumar, 2005; Smith *et al.*, 2014).

1.4 Diagnóstico Laboratorial da Malária Humana

O diagnóstico rápido e eficiente das infecções por *Plasmodium* constitui um dos pilares dos programas de controle e eliminação da malária, já que a adoção de tratamento apropriado depende da identificação precoce do parasito em nível de espécie (SVS/MS, 2010). Nesse sentido, vários são os métodos utilizados atualmente para o diagnóstico das diferentes espécies de *Plasmodium*, incluindo principalmente técnicas imunocromatográficas, moleculares e microscópicas (Anexo I), sendo esta última considerada referência na rotina (Mathison & Pritt, 2017).

1.4.1 Microscopia Óptica e Testes Rápidos

Atualmente, o diagnóstico de rotina para malária é feito pela microscopia óptica, sendo utilizada a técnica de gota espessa corada por Giemsa. No Brasil, a estimativa da parasitemia é geralmente realizada pelo sistema tradicional semiquantitativo de “cruzes”, que varia de acordo com a quantidade de parasitos encontrados por campo microscópico (uma a quatro cruzes, correspondendo, respectivamente, a 1 a >200 parasitos por campo) (SVS/MS, 2009). Porém, outros métodos podem ser utilizados, incluindo o número de parasitos por microlitros de

sangue, estimado pelo volume de sangue aproximado depositado em lâmina ou relativo ao número de leucócitos (SVS/MS, 2009).

O exame microscópico é uma técnica relativamente simples e de baixo custo que permite a detecção direta do parasito, a quantificação da densidade parasitária e o monitoramento da resposta do indivíduo ao tratamento. Porém, é um método que demanda preparo adequado do material a ser examinado (preparo e coloração das lâminas), microscópios ópticos apropriados e microscopistas bem treinados (Bailey *et al.*, 2013). Além disso, a microscopia possui limite de detecção que pode variar, dependendo da experiência do profissional, entre 20 a 100 parasitos por microlitro de sangue (Greenwood & Armstrong, 1991; Erdman & Kain, 2008; Baird *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, as limitações da microscopia de rotina têm se tornado cada vez mais evidentes, principalmente em situações de coinfeções e parasitemias subpatentes. Estudos realizados em áreas endêmicas revelaram que, em alguns locais, o número de indivíduos com parasitemia subpatente pode ser maior do que daqueles com infecções patentes (Tadesse *et al.*, 2017). Nesse sentido, já foi demonstrado que indivíduos portadores de parasitemia submicroscópica, detectáveis apenas por métodos mais sensíveis, como os moleculares, podem ser capazes de transmitir malária, atuando como reservatórios da doença (Alves *et al.*, 2005; Bousema & Drakeley, 2011; Wampfler *et al.*, 2013; Vallejo *et al.*, 2016).

Métodos complementares à microscopia de rotina são os ensaios imunocromatográficos em membrana de nitrocelulose, denominados testes rápidos (*Rapid Diagnostics Tests* – RDTs), que utilizam anticorpos monoclonais e policlonais para detectar, em geral, antígenos circulantes do parasito. Porém, apesar de serem de fácil manuseio e transporte, os RDTs atualmente disponíveis possuem sensibilidade inferior à do diagnóstico microscópico (>100 parasitos/ μ L de sangue) (Mouatcho & Goldring, 2013; Visser *et al.*, 2015) e sua eficiência varia dependendo do tipo de antígeno utilizado, método de estocagem e qualidade do kit (WHO, 2017b). Apesar disso, os RDTs se tornaram uma boa ferramenta para auxiliar o diagnóstico de malária e são frequentemente utilizados em locais de difícil acesso ou em hospitais para triagens e confirmação de diagnósticos, principalmente para pacientes hospitalizados fora da área endêmica (WHO, 2016a).

Uma vez que as ferramentas utilizadas no diagnóstico de rotina para malária (diagnóstico individual) têm falhado muitas vezes na detecção de parasitemias muito baixas e coinfeções, e que os indivíduos podem atuar como reservatórios, contribuindo para a manutenção do ciclo de vida dos parasitos, se faz necessário o uso de ferramentas mais sensíveis e específicas para auxiliar na identificação de casos nessas situações. Nesse sentido, métodos alternativos, como o diagnóstico molecular, têm se mostrado mais adequados, particularmente em estudos epidemiológicos, onde se busca identificar casos submicroscópicos (Tadesse *et al.*, 2017).

1.4.2 Detecção molecular dos parasitos da malária

Os métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) são considerados atualmente mais adequados para a identificação de indivíduos com infecção submicroscópica (Lucchi *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2016). É necessário ressaltar que esta técnica ainda tem uso restrito no diagnóstico individual de rotina, sendo utilizada, nesta situação, como auxiliar em casos de dúvida diagnóstica, ou seja, para confirmar ou descartar infecção malárica. Por outro lado, tem sido ferramenta importante em estudos epidemiológicos, quimioterápicos e de vacinas.

Até o momento, a técnica de Nested-PCR tem sido considerada referência no diagnóstico molecular da malária humana, amplificando sequências gênero e espécie-específicas do gene *18S* dos plasmódios (Snounou *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1999). Esta metodologia é caracterizada por duas reações de amplificação, o que atribui maior sensibilidade em relação aos protocolos de PCR convencional. Por ser considerado um método sensível e específico para detectar os parasitos da malária, a Nested-PCR tem sido particularmente útil em estudos epidemiológicos. Contudo, o protocolo apresenta desvantagens, sendo demorado e laboroso, podendo levar até oito horas para obtenção dos resultados. Mais recentemente, diferentes protocolos de PCR em tempo real têm sido descritos (Rougemont *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2012; Lefterova *et al.*, 2015). A vantagem desta técnica em relação à Nested-PCR é sua maior precisão, por detectar o alvo na fase exponencial de amplificação, além de permitir a análise quantitativa, demonstrando, em geral, maior sensibilidade e dispensando a manipulação pós-amplificação.

Outra técnica molecular que parece promissora para o diagnóstico de malária é o chamado LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) ou amplificação isotérmica mediada por *loop*, que se baseia na amplificação isotérmica do DNA através da utilização de conjuntos de iniciadores e uma DNA polimerase com atividade de desacoplamento de fitas (Wong *et al.*, 2017). Após a reação de amplificação, os resultados podem ser visualizados por turbidez ou fluorescência, dispensando a manipulação pós-amplificação. O LAMP é uma técnica relativamente simples, rápida e de baixo custo que vem demonstrando sensibilidade variável na detecção de *Plasmodium*, com possibilidade de aplicação em campo e locais com escassez de recursos (Polley *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013; Polley *et al.*, 2013; Aydin-Schmidt *et al.*, 2014; Ponce *et al.*, 2017; Viana *et al.*, 2018; Hashimoto *et al.*, 2018). Entretanto, apesar de suas vantagens, alguns protocolos de LAMP descritos para o diagnóstico de malária têm apresentado resultados duvidosos, falso-positivos e baixa sensibilidade, o que tem impossibilitado seu uso como método de diagnóstico em amostras de campo (Singh *et al.*, 2013; Ponce *et al.*, 2017; De Koninck *et al.*, 2017). Além disso, o tipo de extração do DNA pode influenciar diretamente no desempenho do ensaio, podendo interferir na sua sensibilidade (Aydin-Schmidt *et al.*, 2014).

Ensaio de PCR possuem, em geral, alta sensibilidade e especificidade em relação às outras opções disponíveis para o diagnóstico de malária, permitindo a amplificação de pequena quantidade de DNA ou RNA em uma amostra. Sequências conservadas no genoma dos parasitos podem ser utilizadas como alvo, evitando-se reações cruzadas com hospedeiros ou outras espécies e possibilitando ensaios cada vez mais sensíveis (Lucchi *et al.*, 2013). Por outro lado, os protocolos atualmente disponíveis têm limitações, sendo dependentes de vários fatores, tais como o alvo a ser amplificado, a quantidade e qualidade da amostra obtida e o volume de material utilizado nas reações moleculares (Zimmerman e Howes, 2015).

A maior parte dos protocolos de PCR e outros métodos para diagnóstico molecular de malária utilizam como material alvo o DNA do *Plasmodium*, que possui maior estabilidade em relação ao RNA, facilitando o trabalho de coleta, transporte, armazenamento e manipulação (Lucchi *et al.*, 2013; Zimmerman e Howes, 2015). Apesar de conferir maior sensibilidade devido ao grande número de cópias idênticas decorrentes do processo de transcrição, a natureza lábil do RNA dificulta muito a

utilização deste ácido nucleico em amostras de campo, sendo muito mais susceptível à degradação por RNAses.

Atualmente, um número significativo de protocolos de PCR tem sido descritos na literatura para o diagnóstico molecular de malária, apresentados como capazes de detectar infecções subclínicas e coinfeções por *Plasmodium* (Demas *et al.*, 2011; Cordray & Richards-Kortum, 2012; Hofmann *et al.*, 2015; Hofmann *et al.*, 2018). Entretanto, para a maioria destes protocolos, os limites de detecção estabelecidos foram baseados, quase que exclusivamente, na titulação de DNA plasmidial ou de parasitos em cultura (no caso de *P. falciparum*). Como a amplificação molecular destas amostras é facilitada – quando comparadas a amostras de campo –, os limites de sensibilidade têm sido superestimados. Isto é relevante, já que vários fatores inibitórios podem dificultar a amplificação molecular em amostras de campo (Andrews *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2010).

De qualquer forma, desde que as técnicas moleculares foram introduzidas, muitos estudos têm demonstrado grande discrepância entre os dados obtidos pelo exame microscópico e a prevalência real de malária em determinadas áreas (Proux *et al.*, 2011; Hofmann *et al.*, 2015; Tadesse *et al.*, 2017). Estima-se, por exemplo, que as infecções submicroscópicas, detectáveis apenas por PCR, representem até 70% das infecções maláricas em áreas de baixa endemicidade, podendo ser responsáveis por cerca de 40% da população de vetores infectados (Okell *et al.*, 2012).

Embora muitas sequências genômicas dos plasmódios humanos, principalmente *P. vivax* e *P. falciparum*, estejam disponíveis, a maioria dos protocolos de PCR ainda utiliza como alvo o gene da subunidade menor do RNA ribossomal (*18S rRNA*) (Snounou *et al.*, 1993; Rougemont *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2012; Kamau *et al.*, 2013). Entretanto, apesar da ampla utilização, este gene está presente em pequeno número de cópias no genoma desses parasitos, entre 5-8 cópias divergentes (Mercereau-Puijalon *et al.*, 2002). Consequentemente, a baixa sensibilidade e reprodutibilidade dos protocolos baseados no gene *18S rRNA* tem sido descrita (Mixson-Hayden *et al.*, 2010), incluindo dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa em malária (Camargos-Costa *et al.*, 2014). Por este motivo, tem-se buscado por alvos mais adequados para detectar infecções subpatentes.

1.4.2.1 Alvos não ribossomais para o diagnóstico molecular de malária por *P. vivax* e *P. falciparum*

Apesar de o gene *18S rRNA* ser atualmente o alvo mais utilizado para a detecção molecular das infecções por *Plasmodium*, a disponibilidade de dados genômicos de algumas espécies, tais como *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. knowlesi*, tem permitido a descoberta de novos alvos, regiões conservadas e espécie-específicas, presentes no genoma desses parasitos em grande número de cópias (Lucchi *et al.*, 2013). Estes alvos, tais como sequências mitocondriais (Polley *et al.*, 2010; Hopkins *et al.*, 2013; Lloyd *et al.*, 2018), o gene nuclear *varATS* (Hofmann *et al.*, 2015; Lloyd *et al.*, 2018) e o elemento repetitivo associado a telômero 2 (TARE-2) (Hofmann *et al.*, 2015), têm se mostrado promissores para uso no diagnóstico molecular de malária, resultando em protocolos cada vez mais sensíveis.

No ano de 2011, a mineração de dados genômicos permitiu identificar duas sequências promissoras, Pvr47 e Pfr364, localizadas em regiões subteloméricas no genoma de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (Demas *et al.*, 2011). Ainda sem funções conhecidas, estes alvos parecem propícios para o diagnóstico molecular de malária, pois estão presentes no genoma destes parasitos em grande número de cópias conservadas, muito maior do que o comumente utilizado *18S rRNA*.

Pvr47 está presente em 14 cópias no genoma de *P. vivax* e a maioria dos seus membros mapeia *contigs* subteloméricos pequenos (<16 kb) que não puderam ser montados nos cromossomos devido à sua natureza repetitiva (Demas *et al.*, 2011). Dois membros dessa família estão localizados próximos aos genes *vir*, e um terceiro próximo à proteína transmembrana subtelomérica Pvstp1. Pfr364 se encontra em 41 cópias no genoma de *P. falciparum*, cada uma delas localizada na região de repetição subtelomérica SB2, encontradas principalmente nas extremidades dos cromossomos (Figura 4). O tamanho da região SB2 é variável (1 a 3 kb, mas pode conter até 6 kb de sequência adicional) e composta por diferentes tipos de repetição. O alinhamento múltiplo dessas cópias revelou dois grupos relacionados, os quais foram denominados de subfamílias 1 e 2. Até o momento, Pvr47 e Pfr364 foram utilizados apenas em protocolo de PCR convencional (Demas *et al.*, 2011), fazendo-se necessário validá-los através do desenvolvimento de protocolos de PCR mais sensíveis.

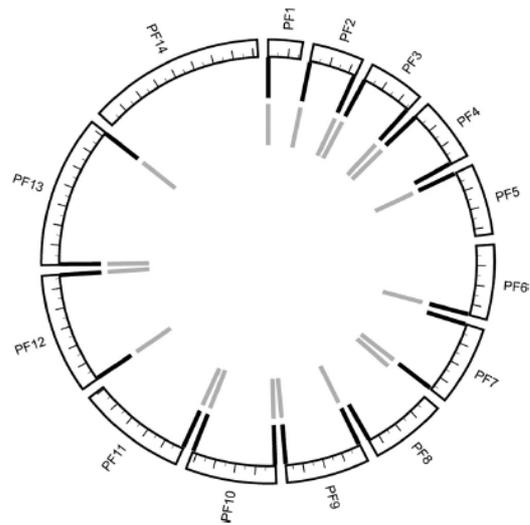


Figura 4: Distribuição dos membros da família Pfr364 nos 14 cromossomos de *P. falciparum*. Cada membro ocorre em duas cópias nas extremidades dos cromossomos. Linhas pretas indicam cópias mais periféricas (subfamília 1) e linhas cinzas indicam cópias mais internas (subfamília 2). O cromossomo 6 possui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

2 JUSTIFICATIVA

Muitas são as barreiras para a otimização das estratégias e recursos disponíveis para o controle e possível eliminação da malária de algumas regiões do mundo. Estudos recentes confirmam a discrepância entre os dados epidemiológicos e a real prevalência das infecções maláricas, muitas vezes subestimadas devido às baixas parasitemias, que não são detectadas pela microscopia de rotina (Proux et al., 2011; Golassa et al., 2013). No Brasil, a situação não é diferente, já que um grande número de infecções submicroscópicas tem sido descrito (Ferreira & Castro, 2016; Recht et al., 2017; Almeida et al., 2018). Neste contexto, faz-se necessário conhecer a real prevalência da doença nas áreas endêmicas para que as medidas de controle possam ser otimizadas.

Do ponto de vista do controle e vigilância epidemiológica, faz-se necessário ainda identificar as infecções causadas por mais de uma espécie de *Plasmodium*. Isto é particularmente relevante nas áreas com co-circulação de *P. falciparum* e *P. vivax*, já que o tratamento antimalárico é específico para cada uma destas espécies. As limitações de sensibilidade da microscopia de rotina fazem com que, na prática clínica, as infecções mistas sejam amplamente subnotificadas (Mayxay et al., 2001; Ginouves et al., 2015; Singh et al., 2017). Embora a real prevalência de infecção mista por diferentes espécies *Plasmodium* não seja conhecida, estudos utilizando a abordagem molecular têm mostrado que a proporção pode ser relativamente alta em algumas áreas endêmicas (Mayxay et al., 2004).

Embora muitos protocolos moleculares já tenham sido descritos para a identificação de malária submicroscópica, a maior parte deles ainda se baseia na amplificação espécie-específica do gene *18S rRNA* dos plasmódios, que apresenta baixo número de cópias no genoma destes parasitos (Sounou et al., 1993; Singh et al., 1999; Rougemont et al., 2004; Mangold et al., 2005; Kamau et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de protocolos moleculares não ribossomais é uma prioridade da pesquisa atual em malária.

Considerando-se que infecções maláricas subclínicas estão, em geral, abaixo do limite de detecção da microscopia óptica (Santelli et al., 2016), e que protocolos moleculares pouco sensíveis podem negligenciar parasitemias subpatentes e

infecções mistas, procurou-se aqui utilizar abordagens moleculares mais sensíveis que possam contribuir na determinação da prevalência real de infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* em uma área.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo baseado na Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), tendo como alvo sequências não ribossomais (NR-qPCR) de *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, para diagnóstico molecular de malária subpatente e mista causada por estas espécies.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Padronizar um protocolo de NR-qPCR para os alvos multicópias não ribossomais de *P. vivax* (Pvr47) e *P. falciparum* (Pfr364);

3.2.2 Determinar os limites de detecção da NR-qPCR para *P. vivax* e *P. falciparum* em amostras referência e amostras de campo com infecção única e mista;

3.2.3 Comparar os limites de detecção da NR-qPCR em relação a outros protocolos de PCR previamente descritos para o diagnóstico de malária por *P. vivax* e *P. falciparum*;

3.2.4 Avaliar o desempenho da NR-qPCR padronizada e outros protocolos de PCR bem estabelecidos na literatura em amostras de pacientes com infecção malárica clínica e subclínica.

4 METODOLOGIA

4.1 Paineis de amostras de referência

Amostras de DNA dos seguintes parasitos foram utilizadas como referência na padronização da NR-qPCR e demais ensaios moleculares: (I) DNA de *P. falciparum* (cepa 3D7), mantido em cultivo na rotina do laboratório, conforme protocolo previamente descrito (Trager & Jensen, 1976); (II) DNA de *P. brasilianum/P. malariae* (cepa *Peruvian III*) proveniente do Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária, MR4 (*Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, BEI Resources, NIAID/NIH, ATCC, USA*) (n=1); (III) DNA de *P. vivax* (n=9), *P. falciparum* (n=9) e *P. malariae* (n=3) extraídos do sangue de indivíduos infectados (infecção única), com diagnóstico confirmado pela microscopia óptica e diferentes protocolos de PCR; (IV) DNAs provenientes de indivíduos saudáveis (n=30), não expostos à malária (sabidamente negativos para *Plasmodium*), foram utilizados como controles negativos nos ensaios de PCR. As amostras de DNA de pacientes ou indivíduos saudáveis (itens III e IV) foram provenientes do biorrepositório de amostras biológicas do Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária (BMIM, IRR, Fiocruz-Minas).

4.2 População de estudo

Todos os aspectos éticos e metodológicos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do IRR (pareceres CEP N° 24/2008 e N° 1.821.955/2016, anexos II e III), que permitiu o uso das amostras do biorrepositório do BMIM (IRR, Fiocruz-Minas) para fins de pesquisa em diagnóstico molecular da malária, conforme normas estabelecidas pela resolução N° CNS441 de 12 de Maio de 2011, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.

(I) **Indivíduos com suspeita clínica de malária:** Este grupo foi caracterizado por indivíduos com sintomatologia de malária que procuraram os serviços de referência em malária localizados tanto na área endêmica (estados de Rondônia e

Mato Grosso) quanto não endêmica (Minas Gerais). Estes indivíduos, após viagens a áreas com transmissão de malária, apresentaram sintomas sugestivos de malária não complicada, tais como febre, mialgia, calafrios e dores de cabeça. Os critérios de não inclusão no estudo foram: (i) recusa ou incapacidade de assinar o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE); (ii) idade inferior a 5 anos; (iii) mulheres grávidas; e (iv) qualquer outra comorbidade que pudesse ser rastreada. Um total de 110 indivíduos foi incluído no estudo, dos quais a microscopia óptica confirmou malária aguda em 35 e descartou em 75 deles. A maior parte da população foi composta por adultos, com uma mediana de idade de 40 anos (IQR 31–48) e proporção mulheres:homens de 1:5. O sangue dos indivíduos foi coletado por punção venosa ou punção digital em diferentes períodos de tempo (2008 a 2017) e as amostras foram estocadas a -20°C no biorrepositório do BMIM, no IRR. Apesar de ter sido utilizada uma amostra de conveniência, assumindo-se 30% de prevalência pela microscopia óptica e uma estimativa de 50% de aumento pelos testes moleculares, a amostra utilizada fornece 90% de poder estatístico ao nível de significância de 5%.

(II) Indivíduos com suspeita de malária subclínica: Este grupo foi caracterizado por indivíduos residentes em uma área de transmissão de malária no Brasil, a comunidade de Rio Pardo ($1^{\circ}46'S$ — $1^{\circ}54'S$, $60^{\circ}22'W$ — $60^{\circ}10'W$), localizada no município de Presidente Figueiredo, estado do Amazonas, onde nosso grupo de pesquisa tem conduzido estudos soropidemiológicos transversais desde 2008 (Kano *et al.*, 2012; Souza-Silva *et al.*, 2014; Kano *et al.*, 2016). Os critérios de não inclusão nos estudos foram: (i) recusa ou incapacidade de assinar o termo de consentimento livre e esclarecido; (ii) sinais e/ou sintomas relacionados à malária aguda; (iii) idade inferior a 5 anos; (iii) mulheres grávidas; e (iv) qualquer outra comorbidade que pudesse ser identificada. Foram incluídos no estudo 324 indivíduos com suspeita de infecção assintomática, dos quais 21 tiveram o exame microscópico positivo para malária no momento da entrevista e coleta de sangue. Considerando-se 7% de prevalência pela microscopia óptica (Kano *et al.*, 2012) e assumindo um aumento de duas vezes na prevalência de malária pelos ensaios moleculares (Moreira *et al.*, 2015), o tamanho da amostra fornece mais de 90% de poder estatístico ao nível de significância de 5%. A mediana de idade dos indivíduos foi de 40 anos (IQR 24–56), com uma proporção mulheres:homens de 1:1,5; os

participantes possuíam uma mediana de 35 anos (IQR 21–52) residindo em áreas de transmissão de malária na Amazônia. O sangue foi coletado de Novembro de 2008 a Junho de 2015 por punção venosa ou digital, e todos os espécimes biológicos foram estocados a -20°C no biorrepositório do BMIM.

4.3 Diagnóstico Microscópico

Durante a coleta de sangue, todos os indivíduos foram submetidos à punção digital para o diagnóstico de malária por microscopia óptica. As lâminas de gota-espessa coradas com Giemsa foram preparadas e examinadas por microscopistas locais experientes, de acordo com as diretrizes de diagnóstico de malária do Ministério da Saúde do Brasil (SVS/MS, 2009). A densidade parasitária foi estimada como o número de parasitos por microlitro de sangue (parasitos/ μL), e todos os casos positivos foram tratados imediatamente nos serviços de saúde locais, conforme protocolos de tratamento da malária recomendados pelo Ministério da Saúde (SVS/MS, 2010).

4.4 Ensaio moleculares

4.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico (gDNA) utilizado nos ensaios moleculares foi extraído das amostras de sangue total coletadas em EDTA ou sangue em papel de filtro usando os kits *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen) e o *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Brevemente, para cada 300 μL de sangue total foram acrescentados 900 μL de solução de lise para eritrócitos em tubos de 1,5 mL. Após incubação por 1 minuto à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 13,000-16,000 $\times g$ por 20 segundos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspendido em 300 μL de solução de lise celular, com agitação ao *vórtex* por 10 segundos. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de solução de precipitação de proteína, sendo o material

agitado em *vórtex* por 20 segundos e centrifugado a 13,000-16,000 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante contendo o DNA solúvel foi colocado em tubo de 1,5 mL com 300 µL de isopropanol P.A. gelado (Merck) para precipitação. Os tubos foram homogeneizados por inversão e o DNA foi centrifugado a 13,000-16,000 x *g* por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. O DNA extraído foi lavado com 300 µL de etanol 70%, seguido por centrifugação a 13,000-16,000 x *g* por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e, após evaporação do etanol, o DNA foi hidratado com 100 µL de solução de hidratação, sendo agitado ao *vórtex* e incubado por 5 minutos a 65°C. Todas as centrifugações foram feitas à temperatura ambiente. As amostras foram mantidas a -20°C até o uso.

Para o DNA extraído de sangue em papel de filtro, círculos de aproximadamente 30 µL de sangue foram colocados em microtubos de 1,5 mL, seguido por adição de 180 µL de tampão de lise celular e incubação a 85°C por 10 minutos. Foram acrescentados 20 µL da solução de *proteinase K* com homogeneização por 30 segundos em *vórtex*, sendo os tubos posteriormente incubados a 56°C por uma hora. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de tampão de lise, sendo os tubos homogeneizados por 30 segundos em *vórtex* e incubados a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol 100% gelado, sendo as amostras homogeneizadas e colocadas em colunas *QIAamp spin* agregadas a tubos de coleta. As colunas foram centrifugadas a 800 x *g* por 1 minuto, sendo posteriormente descartados os tubos contendo filtrados. Novos tubos de coleta foram acoplados às colunas, seguindo-se adição de 500 µL de tampão para lavagem do DNA, com centrifugação a 800 x *g* por 1 minuto. Novamente, as colunas foram colocadas em novos tubos de coleta, com descarte dos filtrados. Foram adicionados 500 µL de tampão para uma segunda lavagem do DNA, seguindo-se centrifugação a 1500 x *g* por 3 minutos. As colunas foram colocadas em novos tubos de 1,5 mL e, por fim, acrescentou-se 150 µL de água destilada para eluir o DNA, seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugação a 800 x *g* por 1 minuto. As colunas foram descartadas e as amostras foram armazenadas a -20°C até o uso.

4.4.2 PCR em Tempo Real para os alvos não ribossomais Pvr47 e Pfr364 (NR-qPCR)

4.4.2.1 Desenho de iniciadores e sondas para os alvos Pvr47 e Pfr364

Os iniciadores e sondas para os alvos Pvr47 e Pfr364 foram desenhados através dos programas Primer-Blast (NCBI) e OLIGO (versão 4.0, 1999), com base nos alinhamentos disponibilizados por Demas *et al.* (2011). Foram observadas regiões conservadas entre as 14 cópias da família Pvr47 (*P. vivax*) e as 22 cópias da subfamília 1 de Pfr364 (*P. falciparum*), de forma a contemplar o maior número de cópias possível em cada espécie. Para o alvo Pvr47 foi obtido o conjunto 5'-TCCGCAGCTCACAAATGTTC-3' (*forward*), 5'-ACATGGGGATTCTAAGCCAATTTA-3' (*reverse*) e 5'-HEX-TCCGCGAGGGCTGCAA-3' (sonda), que se ligam, respectivamente, às posições 142-161, 245-222 e 189-204 da cópia *AAKM01000578* de *P. vivax* (Sal-I), resultando em um amplicon de 104 pb. Já para o alvo Pfr364 foi obtido o conjunto 5'-ACTCGCAATAACGCTGCAT-3' (*forward*), 5'-TTCCCTGCCCAAAAACGG-3' (*reverse*) e 5'-FAM-GGTGCCGGGGTTTCTACGC-3' (sonda), que se ligam às posições 313-331, 400-383 e 335-354 da cópia *Pf3D7_04_12625_14152* de *P. falciparum* (3D7), respectivamente, resultando em um amplicon de 88 pb. As figuras 5 e 6 ilustram as posições dos iniciadores e sondas para amplificação das sequências de *P. vivax* (Pvr47) e *P. falciparum* (Pfr364), respectivamente.

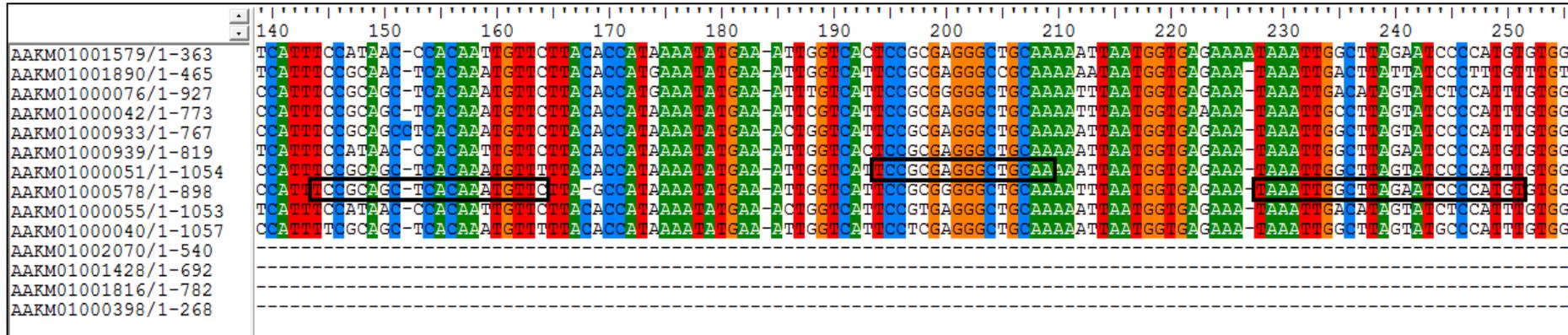


FIGURA 5: Alinhamento das 14 cópias de Pvr47 no genoma de *P. vivax* (Sal-1), com destaque em preto para as regiões onde foram desenhados os iniciadores e sonda. FONTE: Adaptado de Demas *et al.*, 2011.

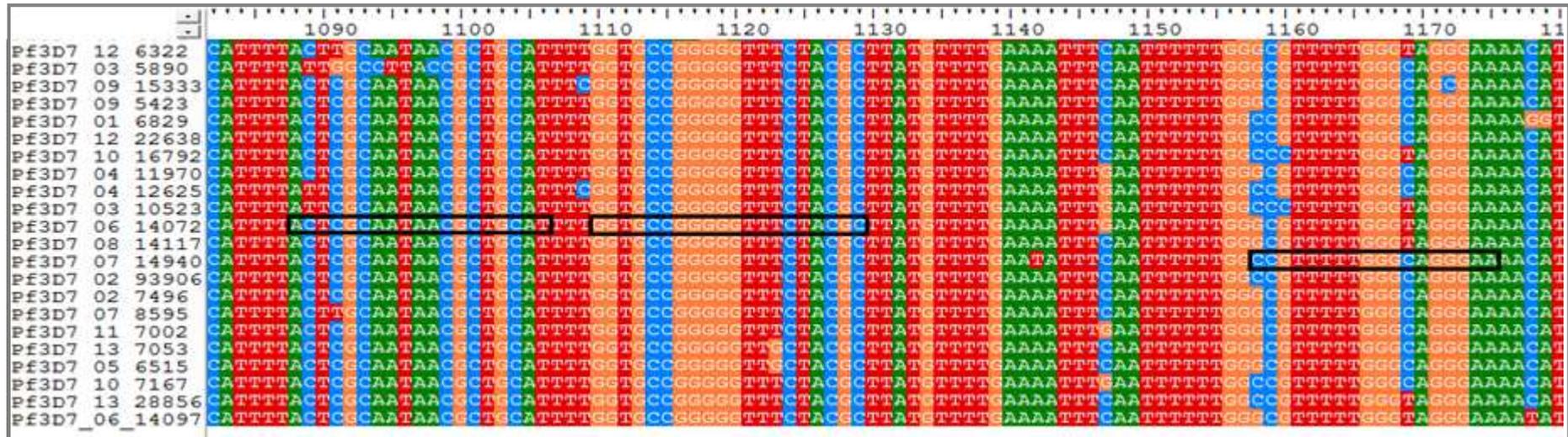


FIGURA 6: Alinhamento de 22 cópias de Pfr364 no genoma de *P. falciparum* (3D7, subfamília 1), com destaque em preto para as regiões onde foram desenhados os iniciadores e sonda. FONTE: Adaptado de Demas *et al*, 2011.

4.4.2.2 Padronização da NR-qPCR para amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364

Para a padronização do protocolo NR-qPCR foi utilizado um painel de amostras de DNA previamente caracterizadas pela microscopia óptica e diferentes protocolos de PCR, conforme descrito no item 4.1. Nos ensaios iniciais fez-se necessário determinar a melhor concentração de iniciadores e sondas para as reações de PCR. Os iniciadores (*forward* e *reverse*) foram testados nas concentrações de 50 nM, 300 nM e 900 nM, e as sondas nas concentrações de 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM e 250 nM. Diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores também foram avaliadas, sendo estas 60°C, 58°C, 55°C, 52°C e 50°C. Após o estabelecimento das melhores condições da NR-qPCR, as amostras de referência (positivas e negativas) foram utilizadas na validação inicial e determinação da especificidade analítica do protocolo. Todos os ensaios da NR-qPCR foram realizados no equipamento *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), da Plataforma de PCR em Tempo Real do IRR, e analisadas no *QuantStudio™ Real-Time PCR Software*.

4.4.3 Limites de Detecção

4.4.3.1 Construção dos plasmídeos e curvas-padrão para determinação do limite de detecção da NR-qPCR

Visando avaliar os limites de detecção da NR-qPCR em relação ao número de cópias dos alvos de Pvr47 e Pfr364, foram construídas curvas-padrão de amplificação para cada alvo. Para isso, foi necessário realizar a clonagem dos segmentos específicos em plasmídeo com posterior diluição seriada e análise pela NR-qPCR. Inicialmente, uma PCR convencional foi feita utilizando os mesmos iniciadores da NR-qPCR, com duas reações separadas (*P. vivax* e *P. falciparum*). As concentrações dos reagentes foram iguais para as duas reações: 1,0 µM de cada iniciador (IDT), 0,6 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 125 µM de dNTP (Invitrogen), 2 µL de Tampão 10X (Invitrogen), 0,75 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 2 µL de DNA, totalizando 20 µL de reação.

As condições da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Uma extensão final de 72°C por 2 minutos foi realizada. As reações de PCR foram feitas em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% (Agargen) preparada em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) com solução de brometo de etídio 10 mg/ml (Invitrogen). As amostras foram diluídas em tampão de amostra Orange 5x (Amaranjado G VETEC e Ficoll SIGMA) e corridas em sistema horizontal (Bio-Rad) a 110 V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi visualizado em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia) e a imagem obtida foi arquivada em sistema digital.

Os alvos amplificados foram dosados no *NanoDrop 2000 spectrophotometer* (Thermo Scientific) e clonados no vetor *pGEM-T Easy* (Promega), conforme protocolo do fabricante: foram misturados 5 µL de *2X Rapid Ligation Buffer* (Promega), 1 µL de *T4 DNA ligase* (3 units/µL) e 1 µL de *pGEM-T Easy Vector* (50 ng), com diferentes quantidades de DNA em cada reação: 9 ng do produto de Pvr47 e 7 ng do produto de Pfr364, em proporção inserto:vetor de 5:1 (calculados com base na fórmula: *quantidade de produto de PCR (inserto) = ng do vetor × tamanho do inserto / tamanho do vetor × proporção inserto:vetor*). Água foi utilizada para completar as reações até 10 µL, sendo estas incubadas por 16 horas a 4°C.

Os vetores com os insertos (*Pvr47+pGEM-T Easy* e *Pfr364+pGEM-T Easy*) foram inseridos em bactérias *Escherichia coli* TOP10 competentes por choque térmico, com incubação em gelo por 30 minutos, seguida por 30 segundos a 42°C, voltando para o gelo por 5 minutos. Foi adicionado 250 µL de meio LB líquido e as bactérias foram incubadas sob agitação por 1 hora a 37°C. Após incubação, a solução foi centrifugada a 13200 rpm por 1 minuto, com descarte do sobrenadante. Aproximadamente 80 µL de bactérias ressuspendidas foram plaqueadas em meio LB Agar contendo ampicilina (100 mg/ml), IPTG (100 mM) e X-gal (50 mg/ml) e incubadas a 37°C por 16 horas. Três colônias brancas foram cultivadas para cada alvo, em meio LB líquido sob agitação por 16 horas a 37°C e, então, submetidas à purificação com o kit *QIAprep Miniprep* (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

Os plasmídeos purificados foram primeiramente digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Promega) para confirmação da presença dos insertos. As reações foram feitas conforme protocolo do fabricante, contendo 2 µL de *Restriction Enzyme 10X Buffer H*, 0,2 µL de *Acetylated BSA* (10 µg/µL), 0,5 µL da enzima *EcoRI* (10 u/µL) e 3 µL de DNA, completando com água para 20 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas e os fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2%. Após confirmada a presença dos insertos, foi realizada a linearização dos plasmídeos com a enzima de restrição *Apal* (Promega), conforme protocolo do fabricante: 3 µL de *Restriction Enzyme 10X Buffer A*, 0,3 µL de *Acetylated BSA* (10 µg/µL), 2 µL de *Apal* (10 u/µL) e 15 µL de DNA, em um total de 30 µL. As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas e o resultado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 2%, conforme já descrito anteriormente.

Para montagem das curvas-padrão dos DNAs de *P. vivax* e *P. falciparum*, os plasmídeos linearizados foram quantificados no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies) e os números de moléculas dos plasmídeos foram estimados, conforme a fórmula: *número de cópias de plasmídeo* = $[(6.02 \times 10^{23} \text{ cópias/mol}) \times \text{quantidade de DNA (g)}] / [\text{comprimento do DNA (bp)} \times 660 \text{ (g/mol/bp)}]$ (De Souza et al., 2015).

Diluições seriadas dos DNAs plasmidiais foram preparadas em nove pontos de diluição (5x), com concentrações variando de 2×10^4 a $5,12 \times 10^{-2}$ cópias/µL de plasmídeo. Para os dois primeiros pontos (20000 e 4000 cópias/µL) foi realizado um ensaio em triplicata. Para os dois pontos seguintes (800 e 160 cópias/µL) foram feitos dois ensaios em triplicata. Já para os demais pontos (32, 6,4, 1,28, 0,25 e 0,05 cópias/µL) foram feitos dois ensaios em cinco replicatas.

4.4.3.2 Titulação de amostras de DNA de *P. vivax* e *P. falciparum* em monoinfecção

Visando determinar o limite de detecção da NR-qPCR padronizada em amostras de campo, foram realizadas titulações de duas amostras de DNA provenientes de pacientes infectados por *P. vivax* ou *P. falciparum*, cujas parasitemias (parasitos/µL de sangue) foram previamente estabelecidas pela microscopia óptica (exame de gota espessa). Para a titulação, foram realizadas

diluições sucessivas de cada amostra de DNA, *P. falciparum* ou *P. vivax*, variando de uma parasitemia inicial de aproximadamente 2000 parasitos/ μ L de sangue até 0,3 parasitos/ μ L de sangue (9 pontos com diluição seriada de 3x). As mesmas curvas de titulação foram também submetidas a outros três protocolos de PCR para diagnóstico de malária, conforme descrito nos itens 4.4.5.1, 4.4.5.2 e 4.4.5.3.

4.4.3.3 Misturas artificiais de DNA de *P. vivax* e *P. falciparum* (coinfecção)

Para avaliar a NR-qPCR em relação à capacidade de detecção simultânea de *P. vivax* e *P. falciparum* em uma mesma amostra, foram realizadas misturas artificiais de DNA desses dois parasitos (as amostras utilizadas foram as mesmas da titulação em monoinfecção). Diluições sucessivas destas misturas, contendo diferentes concentrações do DNA de cada parasito, foram preparadas. Para tal, foi fixada a concentração de uma das espécies (cerca de 1400 parasitos/ μ L de sangue) e titulada a concentração da outra espécie (1400 a 0,7 parasitos/ μ L de sangue). As misturas foram submetidas também a outros três protocolos de PCR (itens 4.4.5.1, 4.4.5.2 e 4.4.5.3).

4.4.4 Avaliação da NR-qPCR em amostras de campo provenientes de indivíduos com malária clínica e subclínica

Visando avaliar o desempenho da NR-qPCR em amostras de campo com malária clínica (n=110) e subclínica (n=324), foi necessário realizar uma comparação deste protocolo com outros descritos na literatura. Nesse sentido, todas as amostras foram também submetidas aos outros três protocolos de PCR descritos nos itens 4.4.5.1, 4.4.5.2 e 4.4.5.3. A NR-cPCR foi utilizada para avaliar os mesmos alvos com diferentes metodologias (PCR convencional versus PCR em tempo real), sendo este o único até o momento que utiliza os alvos Pvr47 e Pfr364. Por outro lado, como o gene *18S rRNA* tem sido o mais utilizado para o diagnóstico molecular de malária, foram incluídos nos experimentos os protocolos de Nested-PCR e R-qPCR, previamente padronizados e frequentemente utilizados pelo grupo de pesquisa envolvido neste estudo. A abordagem experimental para o diagnóstico molecular de infecções maláricas clínicas e subclínicas está descrita na Figura 7.

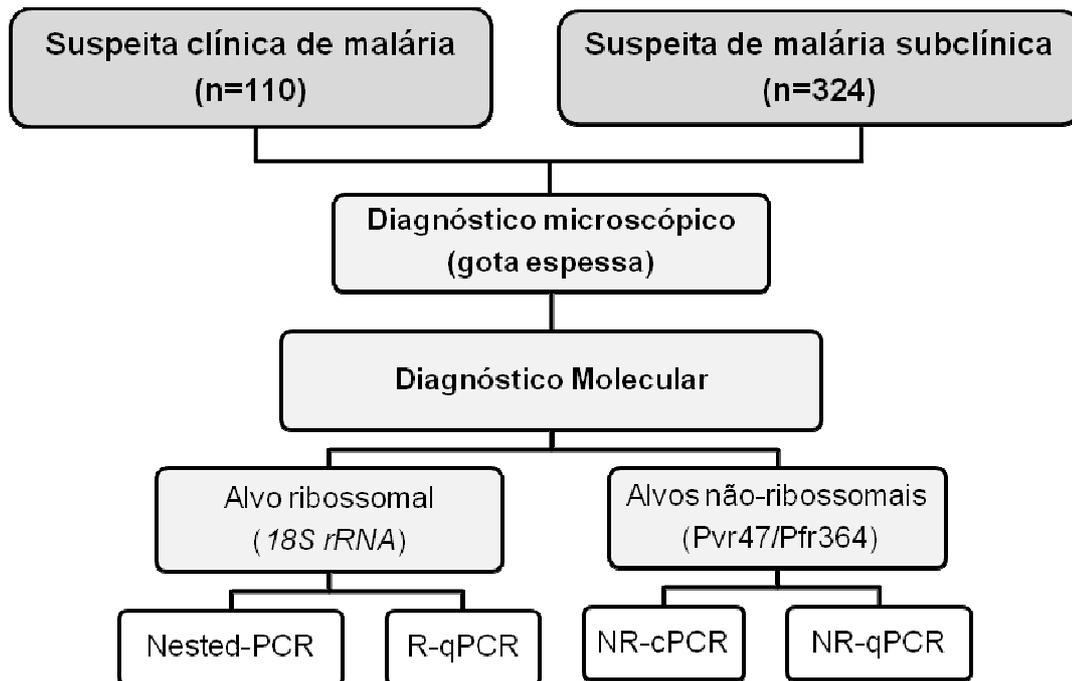


FIGURA 7: Fluxograma para avaliação dos protocolos moleculares em amostras de campo. Um total de 434 amostras provenientes de indivíduos com suspeita de malária clínica (n=110) e subclínica (n=324) foi submetido a diferentes protocolos de PCR. Os protocolos utilizados foram adaptados de Snounou *et al.*, 1993 (Nested-PCR), Rougemont *et al.*, 2004 (R-qPCR) e Demas *et al.*, 2011 (NR-cPCR), além da NR-qPCR desenvolvida neste trabalho.

4.4.5 Outros protocolos moleculares

4.4.5.1 Amplificação dos alvos Pvr47 e Pfr364 por PCR convencional, NR-cPCR (adaptado de Demas *et al.*, 2011)

O protocolo de PCR convencional baseado nos alvos não ribossomais (NR-cPCR) foi realizado em duas reações separadas para *P. vivax* e *P. falciparum*, conforme descrito por Demas *et al.* (2011). Foram utilizados os mesmos iniciadores descritos no artigo original. Para o alvo Pvr47 foram utilizadas os iniciadores 5'-CTGATTTTCCGCGTAACAATG-3' (*forward*) e 5'-CAAATGTAGCATAAAAATCYAAG-3' (*reverse*), resultando em um amplicon de 333 pb. Para o alvo Pfr364 foram utilizadas os iniciadores 5'-CCGGAAATTCGGGTTTTAGAC-3' (*forward*) e 5'-GCTTTGAAGTGCATGTGAATTGTGCAC-3' (*reverse*), resultando em um amplicon de 220 pb. As concentrações dos reagentes e as condições de amplificação da PCR foram iguais para as duas reações (Pvr47 e Pfr364): 0,5 μ M de cada iniciador (IDT),

0,3 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 125 µM de dNTP (Invitrogen), 1 µL de Tampão 10X (Invitrogen), 0,75 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e 1 µL de DNA, totalizando 10 µL de reação.

As condições da PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de amplificação a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Uma extensão final de 72°C por 5 minutos foi realizada. As reações de PCR foram feitas em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems) e os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% (Agargen), sendo esta preparada em tampão TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) com solução de brometo de etídio a 10 mg/ml (Invitrogen). Para a eletroforese, as amostras foram diluídas em tampão de amostra Orange 5x (Alaranjado G VETEC e Ficoll SIGMA) e corridas em sistema horizontal (Bio-Rad) a 110 V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi visualizado em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia) e a imagem obtida foi arquivada em sistema digital. Todas as reações de PCR foram feitas na presença de controles positivos e negativos.

4.4.5.2 Amplificação do gene 18S rRNA por Nested-PCR (adaptado de Snounou *et al.*, 1993)

Para realização do diagnóstico por Nested-PCR para o alvo 18S rRNA, o protocolo utilizado foi adaptado de Snounou *et al.* (1993), sendo estabelecidas duas reações. Na primeira reação (gênero-específica), foram utilizados os iniciadores rPLU5 e rPLU6. Nas reações seguintes (espécie-específicas), foram utilizados os pares rVIV1-rVIV2 e rFAL1-rFAL2, que detectam *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (Tabela 1). Os volumes e concentrações dos reagentes utilizados em cada reação foram: 0,25 µM de cada iniciador (IDT), 10 µL de *PCR Master Mix* 2x (Promega – Taq DNA Polimerase, dNTPs e MgCl₂) e 0,8 µL de DNA, totalizando 20 µL por reação.

As condições da PCR na primeira reação consistiram em uma desnaturação e extensão inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, seguidas por amplificação com 24 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e

72°C por 2 minutos. Uma extensão final foi utilizada, com 58°C por 2 minutos e 72°C por 5 minutos. Na segunda reação, foram utilizadas as mesmas condições de amplificação da primeira, porém com 29 ciclos. Todas as amplificações foram feitas em termociclador PTC-100TM, versão 7.0 (MJ Research).

Os fragmentos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% (Agargen), sendo esta dissolvida em tampão TAE 1x (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) com solução de brometo de etídio a 10 mg/ml (Invitrogen). As amostras foram misturadas em tampão de amostra Orange 5x (Alaranjado G VETEC e Ficoll SIGMA) e a corrida foi feita em sistema horizontal (Bio-Rad) a 110 V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi visualizado em fotodocumentador L-PIX TOUCH (Loccus Biotecnologia) e a imagem foi arquivada em sistema digital. Todas as reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos.

TABELA 1: Iniciadores utilizados para as reações de Nested-PCR e seus respectivos amplicons

Parasito	Iniciador	Sequência	Amplicon
<i>Plasmodium sp.</i>	rPLU 05	5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'	1,2 kb
	rPLU 06	5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'	
<i>P. vivax</i>	rVIV 1	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATA-3'	120 pb
	rVIV 2	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'	
<i>P. falciparum</i>	rFAL 1	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'	205 pb
	rFAL 2	5'-ACACAATGAACTTCAATCATGACTACCCGTC-3'	

Fonte: Snounou *et al.*, 1993.

4.4.5.3 Amplificação do gene 18S rRNA por PCR em Tempo Real, R-qPCR (adaptado de Rougemont *et al.*, 2004)

Para a reação de qPCR que utiliza como alvo o gene ribossomal 18S rRNA (R-qPCR), adaptada do protocolo de Rougemont *et al.* (2004), foram utilizados os mesmos iniciadores e sondas descritos no artigo original para *P. vivax* e *P. falciparum* (Tabela 2). Os iniciadores foram desenhados para o gênero *Plasmodium* e contemplam as duas espécies, sendo utilizados em todas as reações: *Plasmo1* 5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3' (*forward*) e *Plasmo2* 5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3' (*reverse*).

TABELA 2: Sondas utilizadas na detecção do 18S rRNA de *P. vivax* e *P. falciparum* pela R-qPCR

Parasito	Sonda	Sequência
<i>P. vivax</i>	<i>Vivprobe</i>	5'VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-TAMRA-3'
<i>P. falciparum</i>	<i>Falcprobe</i>	5'-FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-TAMRA-3'

Fonte: Rougemont *et al.*, 2004.

As seguintes condições de volume e concentração dos reagentes foram estabelecidas para as duas reações: 200 nM de cada iniciador (IDT), 80 nM de sonda (Applied Biosystems), 6,25 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) e 2 µL de DNA, em um total de 12,5 µL por reação. O protocolo foi padronizado no equipamento *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) da Plataforma de PCR em Tempo Real do IRR e as reações foram feitas em placas de 96 poços vedadas com selos ópticos.

As condições de amplificação consistiram em um passo inicial de 50°C por 2 minutos e desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram analisados no *7500 Software*, versão 2.0.4, através do *Amplification plot* e *Multicomponent plot*. Todas as reações de PCR foram realizadas na presença de controles positivos e negativos.

4.6 Análises Estatísticas

A determinação do limite de detecção da NR-qPCR para os alvos Pvr47 e Pfr364 foi realizada através da análise de *Regressão Probit* (curva dose-resposta) na escala logarítmica utilizando todos os pontos das curvas de diluição (20.000 a 0,05 cópias/µL) (programa *MedCalc Statistical Software*, Ostend, Bélgica).

Diferenças entre proporções foram avaliadas através das estatísticas não paramétricas de Qui-Quadrado (χ^2) ou Teste Exato de Fisher, conforme apropriado. Os *heatmaps* para representação da prevalência de malária por método diagnóstico foram construídos através da função *heatmap.2* disponível no pacote *gplots* do programa R.

Para cada ensaio de PCR, a avaliação da sensibilidade e especificidade foi determinada como descrito por Hofmann *et al.* (2018), considerando como padrão de referência o resultado obtido pela combinação da detecção de qualquer ensaio de PCR, exceto o protocolo em avaliação. Estas análises foram realizadas através do programa *GraphPad Prism 5.00.288* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado para todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização da NR-qPCR para os alvos Pvr47 e Pfr364

Visando amplificar os alvos Pvr47 e Pfr364 pela NR-qPCR foram inicialmente avaliadas cinco diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores, variando de 50°C a 60°C (Figura 8). A temperatura de 52°C foi estabelecida para o anelamento dos iniciadores nas duas reações da NR-qPCR, pois apresentou considerável emissão total da fluorescência e menores valores de *quantification cycle* (C_q) quando comparada às demais temperaturas testadas (Figura 8). Apesar de a temperatura de 55°C ter apresentado as maiores variações de fluorescência nas duas reações, esta não foi utilizada devido ao aumento nos valores de C_t em relação às temperaturas mais baixas. Já a temperatura de 50°C, apesar de apresentar menores valores de C_q para a reação de *P. falciparum* (Figura 8B), não foi utilizada visando evitar a formação de dímeros entre os iniciadores e/ou produtos inespecíficos.

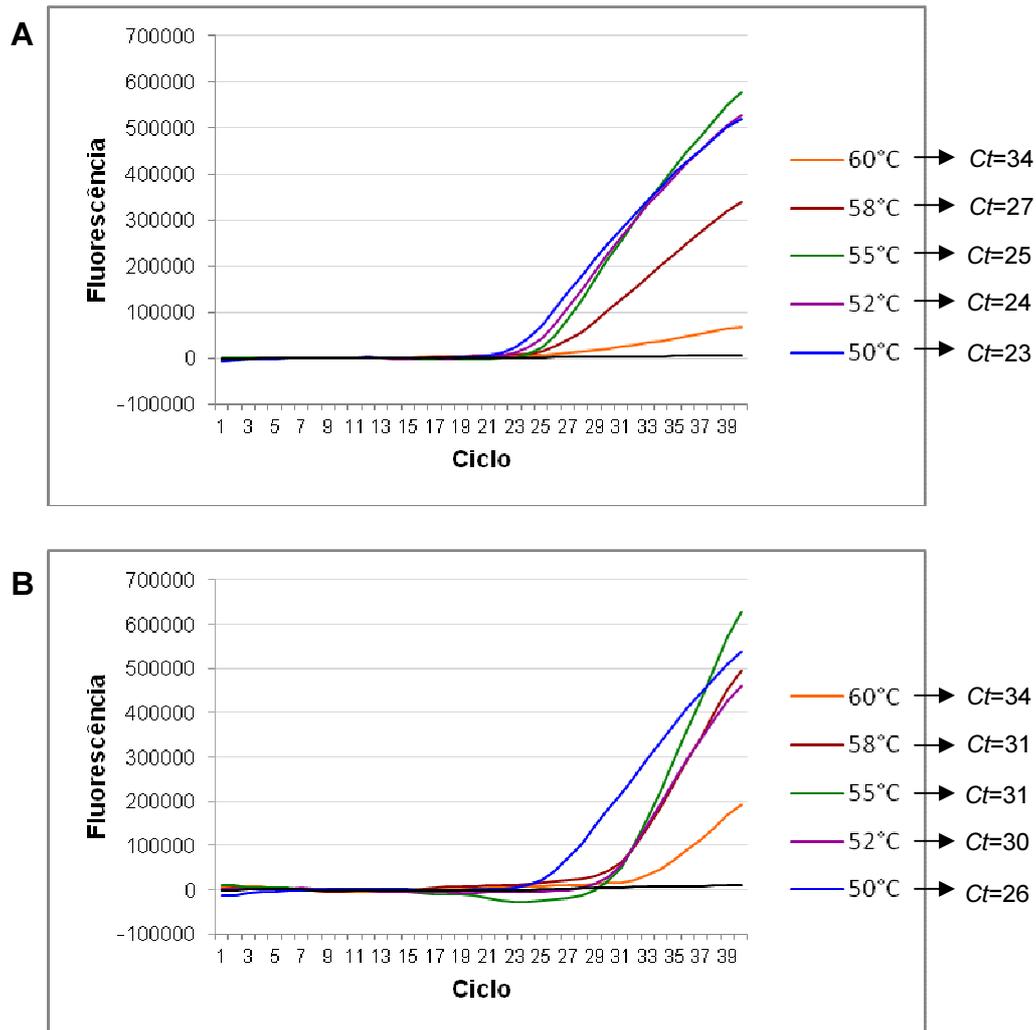


FIGURA 8: Curvas de amplificação da NR-qPCR para os alvos Pvr47 (*P. vivax*) (A) e Pfr364 (*P. falciparum*) (B) nas temperaturas de 60°C (laranja); 58°C (vermelho); 55°C (verde); 52°C (roxo); e 50°C (azul). Para os ensaios foram utilizados DNAs controles positivos de *P. vivax* (amostra previamente caracterizada pela MO e protocolos de PCR) e de *P. falciparum* (cepa referência 3D7 mantida em cultivo contínuo no BMIM). As concentrações de reagentes utilizadas foram: 900 nM de cada iniciador, 250 nM de cada sonda, 5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* e 2 µL de DNA, em um total de 10 µL por reação. As curvas representam a fluorescência média das duplicatas de cada temperatura normalizada pelo *baseline* (ciclos nos quais a fluorescência está abaixo dos limites de detecção do equipamento) pelos ciclos da reação. Para os controles brancos, foram incluídos todos os reagentes da reação na ausência de DNA, sendo este substituído por água.

As análises para escolha das concentrações dos iniciadores para Pvr47 (Figura 9) e Pfr364 (Figura 10) foram realizadas com base nos valores de delta RN (ΔRn) obtidos para cada concentração. Foram estabelecidas na NR-qPCR as concentrações de iniciadores em que foram observadas as maiores variações nas fluorescências detectadas (maior ΔRn). Sendo assim, para Pvr47 foi estabelecido 50 nM do iniciador *forward* e 900 nM do *reverse*. Para a reação de Pfr364, as duplicatas

com desvio padrão de $C_q > 0,05$ foram excluídas da primeira análise (Figura 10A) e repetidas em triplicata, juntamente com as duas melhores concentrações observadas no ensaio inicial (Figura 10B). Foi estabelecido para este alvo 900 nM do iniciador *forward* e 300 nM do *reverse*.

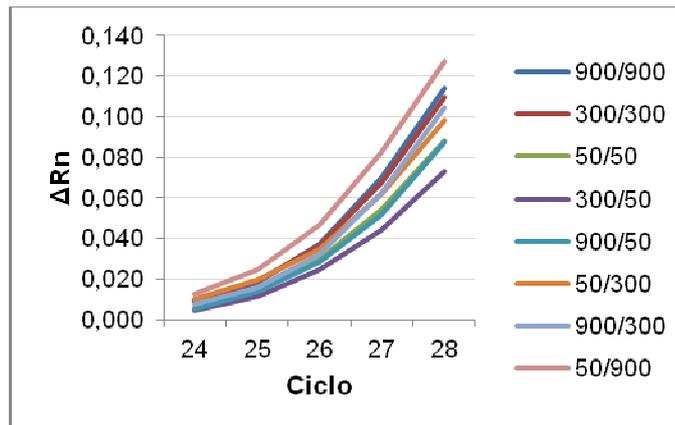


FIGURA 9: Emissão de fluorescência obtida para cada concentração de iniciadores testada para o alvo Pvr47 (*P. vivax*). O resultado é apresentado como o valor do ΔRn em função dos ciclos da reação. O valor de Rn se refere à fluorescência do fluoróforo repórter (VIC) dividido pela fluorescência do fluoróforo de referência passiva, o ROX. Dessa forma, o Rn (do inglês, *normalized reporter signal*) representa o sinal de fluorescência normalizado em função dos ciclos da reação. O valor de ΔRn expressa a variação da fluorescência detectada pelo aparelho, ou seja, o valor de Rn menos o *baseline* (ciclos nos quais a fluorescência está abaixo dos limites de detecção do equipamento). Foram considerados os ciclos 24 a 28, em torno do C_q , na análise de Pvr47.

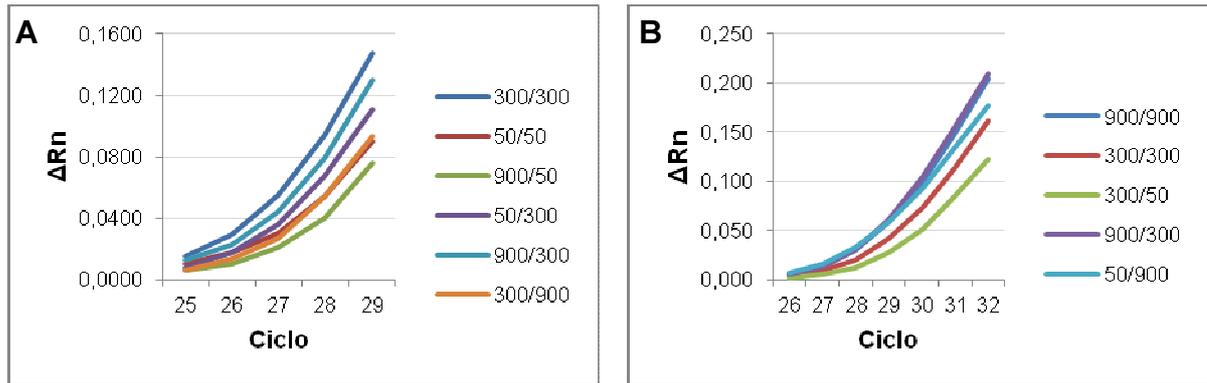


FIGURA 10: Emissão de fluorescência obtida para cada concentração de iniciadores testada para o alvo Pfr364 (*P. falciparum*). O resultado é apresentado pelo valor do ΔRn em função dos ciclos da reação. O valor de Rn se refere à fluorescência do fluoróforo repórter (6-FAM) dividida pela fluorescência do fluoróforo de referência passiva, o ROX. Dessa forma, o Rn representa o sinal de fluorescência normalizado em função dos ciclos da reação. O valor de ΔRn expressa a variação da fluorescência detectada pelo aparelho, ou seja, o valor de Rn menos o *baseline* (ciclos nos quais a fluorescência está abaixo dos limites de detecção do equipamento). Foram considerados os ciclos 25 a 29, em torno do C_q , na primeira análise (**A**) e 26 a 32 na segunda análise (**B**) de Pfr364.

Para a escolha das concentrações das sondas, as análises foram feitas com base no C_q de cada reação, que é a interseção entre a curva de amplificação e o limiar de detecção de fluorescência (*threshold*). Dessa forma, o valor do C_q é inversamente proporcional à concentração do alvo na reação inicial, ou seja, quanto menor o C_q , maior a concentração do alvo e vice-versa. Assim sendo, foram estabelecidas as concentrações de sonda que apresentaram os menores valores de C_q para os alvos de *P. vivax* e *P. falciparum* (Figura 11). Essas concentrações foram: 250 nM para Pvr47 e 150 nM para Pfr364.

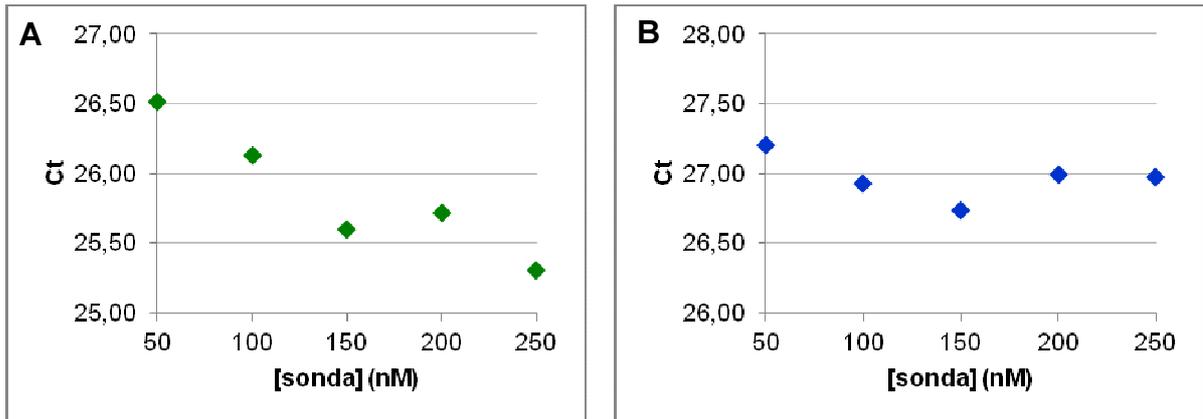


FIGURA 11: Análise para determinação das concentrações de sonda ideais nas reações da NR-qPCR para os alvos Pvr47 **(A)** e Pfr364 **(B)**. O resultado é apresentado como a média do valor de C_q das triplicatas de cada condição testada em função da concentração de sonda utilizada.

Em suma, para o alvo Pvr47, foi estabelecido: 50 nM do iniciador *forward* e 900 nM do iniciador *reverse* (IDT), 250 nM de sonda MGB marcada com HEX (Eurofins), 5 μ L de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) e 2 μ L de DNA, em um total de 10 μ L por reação. Já para o alvo Pfr364, foi estabelecido: 900 nM do iniciador *forward* e 300 nM do iniciador *reverse* (IDT), 150 nM de sonda MGB marcada com FAM (Eurofins), 5 μ L de *Taqman Universal PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) e 2 μ L de DNA, em um total de 10 μ L por reação (Anexo IV).

As condições da NR-qPCR consistiram em um *Hold Stage* de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido por um *PCR Stage* composto por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento dos iniciadores a 52°C por 1 minuto e extensão a 60°C por 1 minuto, com aquisição da fluorescência ao final de cada passo de extensão. Os resultados foram analisados no *QuantStudio™ Real-Time PCR Software*, através dos dados de *Amplification plot* e *Multicomponent plot*.

Para avaliar inicialmente o desempenho da NR-qPCR padronizada em amostras com infecção patente e subpatente por *P. vivax* ou *P. falciparum* foram utilizadas 18 amostras previamente caracterizadas do biorrepositório do BMIM, sendo nove positivas para *P. vivax* e nove para *P. falciparum* de acordo com diagnóstico parasitológico e molecular. Conforme mostrado na Tabela 3, todas as amostras foram amplificadas pela NR-qPCR, na reação específica para cada alvo. A Figura 12 ilustra as curvas de amplificação das amostras pela NR-qPCR. Por outro

lado, os controles negativos testados (n=30) não apresentaram amplificação (dados não mostrados).

TABELA 3: Resultados iniciais da NR-qPCR em amostras de campo com infecção única patente e subpatente por *P. vivax* ou *P. falciparum*, cujas parasitemias foram determinadas previamente pela microscopia óptica e/ou outros protocolos de PCR

Amostra	Parasitemia (cruzes)*	Positividade por PCR**		Resultado da NR-qPCR
		Alvo 18S rRNA	Alvos Pvr47/Pfr364	
Pv 1	2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 2	1	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 3	<1/2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 4	<1/2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 5	<1/2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 6	NA	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 7	NA	qPCR	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pv 8	NA	qPCR	-	<i>P. vivax</i>
Pv 9	NA	-	NR-cPCR	<i>P. vivax</i>
Pf 1	3	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 2	2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 3	1/2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 4	1/2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 5	<1/2	Nested-PCR e qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 6	NA	qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 7	NA	qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 8	NA	qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>
Pf 9	NA	qPCR	NR-cPCR	<i>P. falciparum</i>

*Parasitemias classificadas pela microscopia óptica (MO) conforme estabelecido pelos serviços de referência em malária do Ministério da Saúde, Brasil (SVS/MS, 2009). Foi considerado menor que meia cruz (<1/2), menos de 200 parasitos/μL de sangue; meia cruz (1/2), entre 200-300 parasitos/μL de sangue; uma cruz (1) entre 301-500 parasitos/μL; duas cruzes (2) entre 501-10.000 parasitos/μL; três cruzes (3) entre 10.001-100.000 parasitos/μL. Amostras Pv1 a Pv5 ou Pf1 a Pf5 = amostras com parasitemia patente por *P. vivax* ou *P. falciparum*, respectivamente; amostras Pv6 a Pv9 ou Pf6 a Pf9 = amostras com parasitemia subpatente por *P. vivax* ou *P. falciparum*, respectivamente. NA = não se aplica (infecção não detectada pela MO). **Nested-PCR – protocolo adaptado de Snounou *et al.*, 1993 (alvo 18S rRNA); qPCR – protocolo adaptado de Rougemont *et al.*, 2004 ou Mangold *et al.*, 2005 (alvo 18S rRNA); NR-cPCR – protocolo adaptado de Demas *et al.*, 2011 (alvos Pvr47/Pfr364).

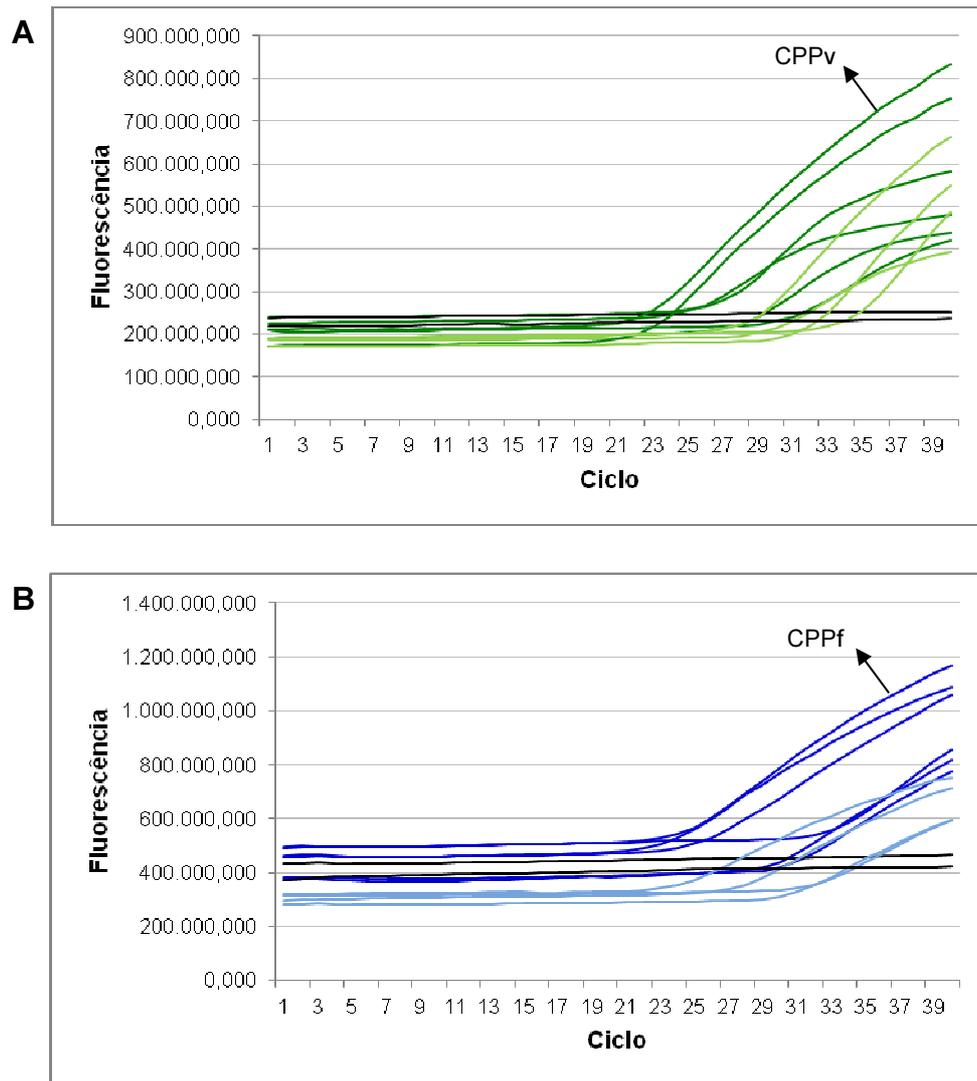


FIGURA 12: Curvas de amplificação da NR-qPCR para os alvos Pvr47 (A) e Pfr364 (B) em amostras de campo infectadas por *P. vivax*, em verde, e *P. falciparum*, em azul, com parasitemias patentes (n=10, sendo 5 amostras de *P. vivax* – verde escuro – e 5 amostras de *P. falciparum* – azul escuro) e subpatentes (n=8, sendo 4 amostras de *P. vivax* – verde claro – e 4 amostras de *P. falciparum* – azul claro). CPPv = controle positivo de *P. vivax*; CPPf = controle positivo de *P. falciparum*.

5.1.1. Limites de detecção da NR-qPCR determinado por curva-padrão

Para determinar os limites de detecção da NR-qPCR foram construídas curvas-padrão para cada plasmídeo de DNA contendo a sequência alvo, Pvr47 ou Pfr364, através de diluição seriada. As eficiências das reações de *P. vivax* e *P. falciparum* foram determinadas com base nas curvas-padrão construídas ($slope=-3,128$, $R^2=0,995$ e $Eff\%=108,762$ para Pvr47 e $slope=-3,303$, $R^2=0,994$ e

$Eff\%=100,809$ para Pfr364). A tabela 4 resume os resultados obtidos por diluição (20.000 a 0,05 cópias/ μL) e alvo testado (Pvr47 ou Pfr364), para cada um dos experimentos realizados (Exp1 e Exp 2), incluindo o número de replicatas positivas e os valores de C_q médio obtidos. Para *P. vivax*, todas as replicatas dos dois experimentos realizados amplificaram consistentemente até a concentração de 1,28 cópias/ μL de DNA. Já para *P. falciparum*, todas as replicatas dos dois experimentos amplificaram consistentemente até a concentração de 6,4 cópias/ μL de DNA.

Tabela 4: Diluição seriada dos plasmídeos de Pvr47 e Pfr364 e amplificação pela NR-qPCR

Plasmídeo	<i>P. vivax</i> -Pvr47			
	Positivo/total		C_q Médio (desvio padrão)	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
20000	3/3	NR	24,3 (0,04)	NR
4000	3/3	NR	26,7 (0,07)	NR
800	3/3	3/3	29,0 (0,03)	29,3 (0,12)
160	3/3	3/3	31,2 (0,22)	30,9 (0,24)
32	5/5	5/5	33,0 (1,40)	33,5 (0,26)
6,4	5/5	5/5	34,9 (0,40)	34,4 (0,60)
1,28	5/5	5/5	36,8 (1,20)	33,5 (1,28)
0,25	3/5	5/5	38,0 (0,60)	32,8 (0,60)
0,05	2/5	5/5	35,5 (1,05)	34,4 (1,13)
Plasmídeo	<i>P. falciparum</i> -Pfr364			
	Positivo/total		C_q Médio (desvio padrão)	
	Exp 1	Exp 2	Exp 1	Exp 2
20000	3/3	NR	23,1 (0,05)	NR
4000	3/3	NR	25,4 (0,10)	NR
800	3/3	3/3	27,7 (0,10)	28,3 (0,12)
160	3/3	3/3	29,9 (0,06)	30,7 (0,42)
32	5/5	5/5	32,4 (0,40)	32,7 (0,40)
6,4	5/5	5/5	34,5 (0,60)	34,7 (1,06)
1,28	4/5	3/5	36,5 (1,00)	36,6 (0,55)
0,25	4/5	2/5	37,1 (0,20)	36,2 (0,45)
0,05	0/5	0/5	NA	NA

*2 μL de DNA foram adicionados por reação de PCR. Dois experimentos foram realizados (Exp 1 e Exp 2) por alvo a ser amplificado (Pvr47 ou Pfr364), sendo três ou cinco replicatas por concentração. NR = não realizado. NA = não se aplica.

A análise de regressão *probit* dos dados obtidos com as curvas-padrão permitiu estimar o limite de detecção de cada um dos alvos avaliados pela NR-qPCR. Assim, o ensaio aqui padronizado permitiu detectar até 0,66 cópias do DNA

alvo/ μL de sangue para *P. vivax* (Figura 13A) e 3,27 cópias/ μL para *P. falciparum* (Figura 13B).

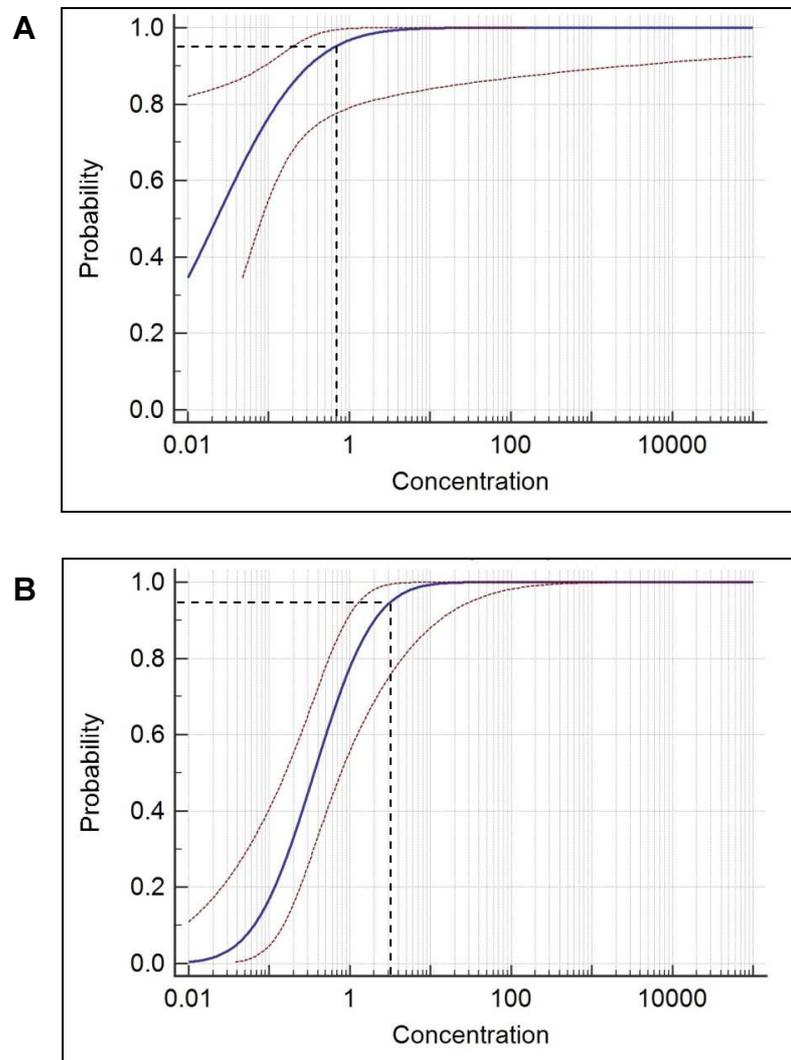


FIGURA 13: Limites de detecção para **(A)** Pvr47 e **(B)** Pfr364 amplificados pela NR-qPCR. Análise de regressão *probit* foi realizada considerando nove pontos de diluição (20.000 a 0,05 cópias/ μL) em escala logarítmica. As curvas de regressão calculadas (azul) indicam a probabilidade (eixo y) de se obter resultados positivos em qualquer concentração de DNA; as curvas pontilhadas (marrom) mostram os intervalos de 95% de confiança. As linhas pontilhadas (preto) correspondem à concentração de DNA na qual 95% das amostras são positivas para o alvo testado (0,66 cópias/ μL de Pvr47 e 3,27 cópias/ μL de Pfr364).

5.1.2. Avaliação da especificidade analítica da NR-qPCR

Durante o desenho dos iniciadores e sondas da NR-qPCR, foram feitas investigações *in silico* através do programa Primer-Blast (NCBI), que permitiu a análise de complementaridade das sequências desenhadas com outras da base de

dados selecionada (nucleotídeos). Isto foi feito para eliminar a possibilidade de reação cruzada ou formação de produtos inespecíficos com outras espécies de *Plasmodium* e sequências humanas (dados não mostrados). Porém, naquele momento, o genoma de *P. malariae* não estava disponível em bancos de dados públicos. Sendo assim, para esta espécie de plasmódio, a reatividade cruzada foi avaliada apenas por ensaios experimentais de qPCR, que incluiu amostras de *P. malariae* (n=3), *P. brasilianum*/*P. malariae* (n=1), *P. vivax* (n=3), e *P. falciparum* (n=3), todas com monoinfecção.

Os resultados obtidos mostraram que não houve reação inespecífica dos iniciadores/sondas desenhados para os alvos Pvr47 e Pfr364 com os genomas de *P. malariae* e *P. brasilianum*, já que nenhuma curva de amplificação foi obtida para estas amostras (Figura 14, *P. malariae* e *P. brasilianum* em vermelho e laranja, respectivamente). Também não foram observadas reações cruzadas entre *P. vivax* e *P. falciparum* (Figura 14, em verde e azul, respectivamente).

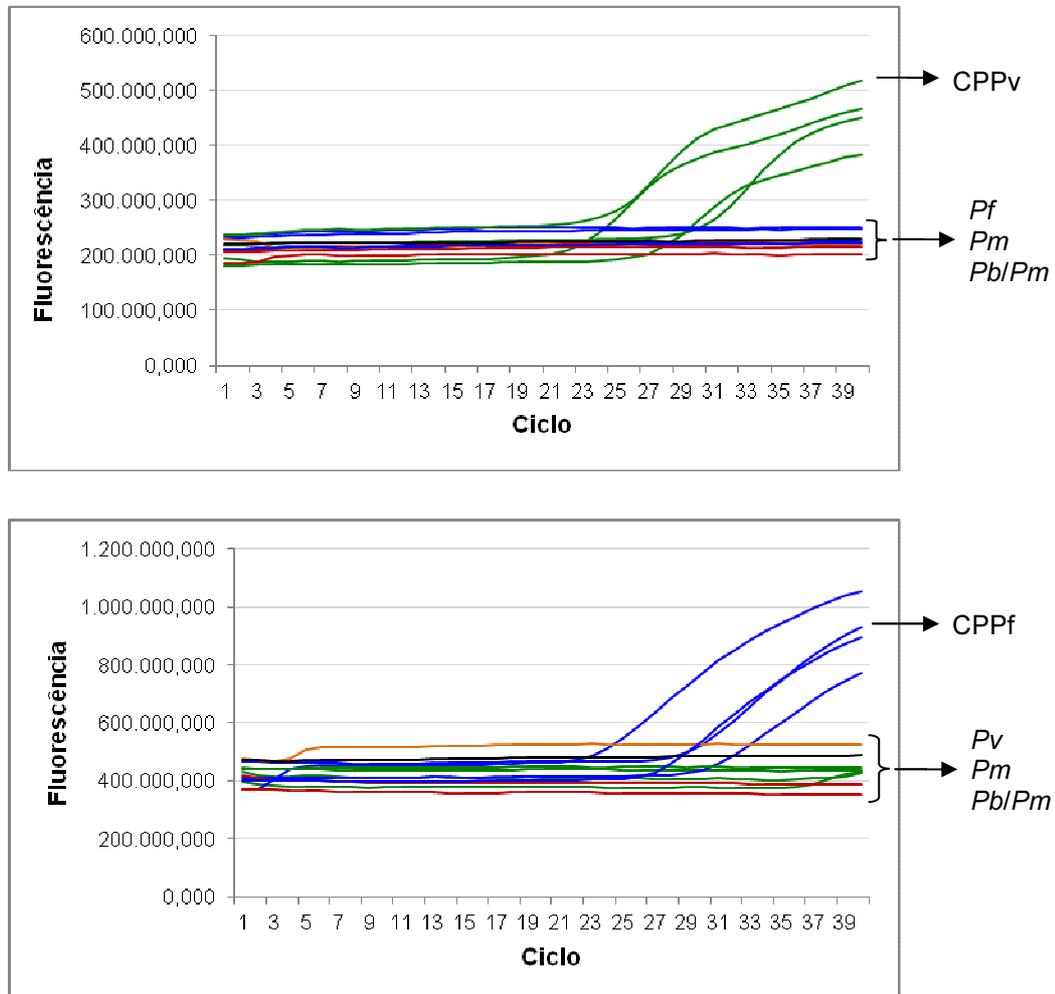


FIGURA 14: Especificidade da amplificação dos alvos Pvr47 para *P. vivax* (A) e Pfr364 para *P. falciparum* (B). As curvas de amplificação da NR-qPCR para Pvr47 estão representadas em verde (n=3) e para Pfr364 em azul (n=3). Em cada ensaio foram incluídas amostras de *P. malariae* (n=3; vermelho) e *P. brasilianum/P. malariae* (n=1; laranja). Pf = *P. falciparum*; Pv = *P. vivax*; Pm = *P. malariae*; Pb/Pm = *P. brasilianum*; CPPv = controle positivo de *P. vivax*; CPPf = controle positivo de *P. falciparum*.

5.2. Comparação dos limites de detecção da NR-qPCR e outros protocolos moleculares em amostras de campo previamente caracterizadas

5.2.1 Detecção de monoinfecções por *P. vivax* e *P. falciparum*

Visando comparar os limites de detecção da NR-qPCR frente a outros protocolos de PCR descritos na literatura, amostras de campo de *P. vivax* ou *P.*

falciparum foram tituladas (2.000 a 0,3 parasitos/ μ L de sangue) e classificadas pelos diferentes protocolos moleculares aqui avaliados (Figura 7, incluindo os protocolos adaptados de Snounou *et al.*, 1993 (Nested-PCR), Rougemont *et al.*, 2004 (R-qPCR) e Demas *et al.*, 2011 (NR-cPCR)).

No caso de monoinfecção por *P. vivax*, não foram observadas diferenças significativas de positividade entre os alvos amplificados pelas diferentes PCRs (Tabela 5). Apesar disso, a NR-qPCR foi o único protocolo capaz de detectar consistentemente os menores níveis de densidade parasitária (todas as replicatas foram positivas até 1 parasito/ μ L). Na comparação geral entre os alvos ribossomal e não ribossomal, uma maior variabilidade na positividade foi observada entre os ensaios de PCR que utilizam o alvo não ribossomal (67% vs. 96% para NR-cPCR e NR-qPCR, respectivamente).

TABELA 5: Titulação de amostra de campo infectada por *P. vivax* em diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares

<i>P. vivax</i> (12900 parasitos/ μ L)*				
Densidade parasitária (p/ μ L)**	18S rRNA		Pvr47	
	Nested-PCR	R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2.000	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
1	1/3 (33%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
0,3	0/3 (0%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)
Positividade PCR	22/27 (81%) ^{a,b}	25/27 (93%) ^b	18/27 (67%) ^a	26/27 (96%) ^b
Positividade alvo	47/54 (87%) ^a		44/54 (81%) ^a	

DNA de *P. vivax* foi diluído serialmente (2.000 a 0,3 parasitos/ μ L) e submetido a cada protocolo de PCR em triplicata. Os resultados foram expressos como número de amostras positivas em relação ao total de replicatas (porcentagem de positivos). Diferentes letras (a,b) indicam diferenças entre as proporções ($p < 0,05$ pelo Teste Exato de Fisher). Os ensaios de PCR foram definidos como descrito na legenda da Figura 7. *Determinado pela microscopia óptica. **Densidade parasitária (μ L de sangue) estimada conforme a diluição.

Em relação à *P. falciparum* (Tabela 6), os resultados de titulação da amostra de campo mostraram que a amplificação de Pfr364 foi mais eficiente do que a amplificação do gene 18S rRNA, e esta diferença foi independente do protocolo de

PCR utilizado (80% vs. 59%, $p=0,0359$ pelo Teste Exato de Fisher). Enquanto a amplificação de Pfr364 pela NR-qPCR foi consistente até a densidade de 3 parasitos/ μL (100% das replicatas), a amplificação do gene *18S rRNA* foi inconsistente a partir de 25 parasitos/ μL (Nested-PCR ou R-qPCR).

TABELA 6: Titulação de amostra de campo infectada por *P. falciparum* em diferentes protocolos de PCR e seus respectivos alvos moleculares

<i>P. falciparum</i> (13400 parasitos/ μL)*				
Densidade parasitária (p/ μL)**	18S rRNA		Pfr364	
	Nested-PCR	R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2.000	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	2/3 (67%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	1/3 (33%)	1/3 (33%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
1	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
0,3	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
Positividade PCR	16/27 (59%) ^a	16/27 (59%) ^a	21/27 (78%) ^a	22/27 (81%) ^a
Positividade alvo	32/54 (59%) ^a		43/54 (80%) ^b	

DNA de *P. falciparum* foi diluído serialmente (2.000 a 0,3 parasitos/ μL) e submetido a cada protocolo de PCR em triplicata. Os resultados foram expressos como número de amostras positivas em relação ao total de replicatas (porcentagem de positivos). Diferentes letras (a',b') indicam diferenças entre as proporções ($p<0,05$ pelo Teste Exato de Fisher). Os ensaios de PCR foram definidos como descrito na legenda da Figura 7. *Determinado pela microscopia óptica. **Densidade parasitária (μL de sangue) estimada conforme a diluição.

Os ensaios de titulação permitiram ainda estabelecer pontos de corte (*cut-off*) para a NR-qPCR. Estes pontos se referem a valores de C_q definidos com base nos pontos de maior repetibilidade para as reações da NR-qPCR. Sendo assim, as amostras com amplificação até o ciclo 37 ($C_q=37$) na reação de Pvr47 foram consideradas positivas para *P. vivax* e as amostras com amplificação até o ciclo 38 ($C_q=38$) na reação de Pfr364 foram consideradas positivas para *P. falciparum*. O valor de *cut-off* estabelecido para cada alvo foi utilizado nos ensaios de avaliação do protocolo em amostras de campo com malária clínica e subclínica.

5.2.2 Detecção de coinfeções por *P. vivax* e *P. falciparum*

Para avaliar a capacidade dos diferentes protocolos e alvos moleculares em detectar malária mista por *P. vivax* e *P. falciparum*, misturas artificiais foram preparadas a partir das amostras de *P. vivax* e *P. falciparum* utilizadas nos experimentos anteriores (item 5.2.1).

Fixando-se a concentração de DNA de *P. vivax* (1.433 parasitos/ μ L) e variando-se a densidade de *P. falciparum* (1.489 a 0,7 parasitos/ μ L) na mistura, foi possível demonstrar que os protocolos baseados nos alvos não ribossomais (NR-cPCR e NR-qPCR) foram muito mais eficientes na identificação das duas espécies, mesmo quando *P. falciparum* esteve presente em densidades muito baixas (Tabela 7). Juntos, os protocolos não ribossomais identificaram 85% (41 de 48) das infecções mistas, enquanto os protocolos ribossomais (Nested-PCR e R-qPCR) detectaram apenas 31% (15 de 48). Ao comparar a variação intra-alvo, a amplificação do gene *18S rRNA* pela R-qPCR demonstrou uma tendência a amplificar *P. vivax* em detrimento de *P. falciparum*, mesmo quando o DNA de *P. falciparum* estava presente na mistura em concentrações relativamente altas (Tabela 7).

Fixando-se a concentração de *P. falciparum* (1.489 parasitos/ μ L) e variando-se a densidade de *P. vivax* (1.433 a 0,7 parasitos/ μ L), os alvos apresentaram desempenho semelhante na detecção da coinfeção até 6 parasitos/ μ L (Tabela 8). Embora não houve diferença estatisticamente significativa entre as positivities obtidas para os alvos ribossomais e não ribossomais (69% vs. 83%, $p=0,1505$), a NR-qPCR aqui desenvolvida parece ter apresentado melhor desempenho em relação aos protocolos que utilizam o *18S rRNA*, já que amplificou ambas as espécies em quase todas as replicatas e pontos de diluição avaliados. De fato, o protocolo aqui descrito foi o único capaz de detectar consistentemente as infecções mistas quando uma das espécies estava presente em proporção cerca de 700 vezes inferior à da outra espécie (1.489 vs. 2 parasitos/ μ L) (Tabela 8).

TABELA 7: Titulação do DNA de *P. falciparum* presente em misturas artificiais de *P. vivax* e *P. falciparum* por protocolos moleculares ribossomais (Nested-PCR e R-qPCR) e não ribossomais (NR-cPCR e NR-qPCR)

Densidade parasitária (p/μL)		18S rRNA						Pvr47/Pfr364 (alvos NR)					
		Nested-PCR			R-qPCR			NR-cPCR			NR-qPCR		
<i>Pv</i>	<i>Pf</i>	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
1.433	1.489	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	496	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	165	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	55	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	18	Pv+Pf	Pv	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	6	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	2	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf
	0,7	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv	Pv	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf
Positividade PCR		13/24 (54%) ^b			2/24 (8%) ^a			19/24 (79%) ^{b,c}			22/24 (92%) ^c		
Positividade alvo		15/48 (31%) ^{a'}						41/48 (85%) ^{b'}					

Misturas artificiais contendo *P. vivax* (Pv) e *P. falciparum* (Pf) em diferentes proporções foram preparadas de amostras de campo previamente caracterizadas pela microscopia óptica. Os resultados são expressos como positivo para *P. vivax* e *P. falciparum* (Pv+Pf), positivo para *P. vivax* (Pv) ou positivo para *P. falciparum* (Pf). Para cada ensaio de PCR, os pontos de diluição foram feitos em triplicata (#1 a #3). Diferentes letras (a-c ou a',b') indicam diferenças entre as proporções ($p < 0,05$ pelo Teste Exato de Fisher).

TABELA 8: Titulação do DNA de *P. vivax* presente em misturas artificiais de *P. vivax* e *P. falciparum* por protocolos moleculares ribossomais (Nested-PCR e R-qPCR) e não ribossomais (NR-cPCR e NR-qPCR)

Densidade parasitária (p/μL)		18S rRNA						Pvr47/Pfr364 (NR targets)						
		Nested-PCR			R-qPCR			NR-cPCR			NR-qPCR			
<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	
1.489	1.433	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	
	478	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	
	159	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	
	53	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	
	18	Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	
	6	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pf	Pf	Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	2	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	0,7	Pv+Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pv+Pf	Pf	Pv+Pf
Positividade PCR		18/24 (75%) ^{a,b}			15/24 (63%) ^a			17/24 (71%) ^a			23/24 (96%) ^b			
Positividade alvo		33/48 (69%) ^a						40/48 (83%) ^a						

Misturas artificiais contendo *P. vivax* (Pv) e *P. falciparum* (Pf) em diferentes proporções foram preparadas de amostras de campo previamente caracterizadas pela microscopia óptica. Os resultados são expressos como positivo para *P. vivax* e *P. falciparum* (Pv+Pf), positivo para *P. vivax* (Pv) ou positivo para *P. falciparum* (Pf). Para cada ensaio de PCR, os pontos de diluição foram feitos em triplicata (#1 a #3). Diferentes letras (a-c ou a',b') indicam diferenças entre as proporções ($p < 0,05$ pelo Teste Exato de Fisher).

5.3 Avaliação dos protocolos de PCR ribossomais e não ribossomais em amostras de indivíduos com malária clínica e subclínica

Para comparar o desempenho da NR-qPCR ao de outros protocolos de PCR, avaliou-se inicialmente amostras de indivíduos com suspeita clínica de malária. O exame microscópico dessas amostras indicou uma positividade de 32% (35 em 110 indivíduos) (Figura 15A).

Em comparação aos resultados da microscopia, os ensaios moleculares, tanto baseados no *18S rRNA* (Nested-PCR e/ou R-qPCR) quanto nos alvos não ribossomais (NR-cPCR e/ou NR-qPCR), identificaram uma proporção semelhante de infecções (n=39, 35%) (Figura 15A). Além disso, neste grupo de indivíduos a amplificação dos diferentes alvos não aumentou a positividade para malária (Figura 15A, barra à direita; $p=1,0$ para alvo *18S rRNA* vs. ambos os alvos e $p=0,89$ para alvos não ribossomais vs. ambos os alvos). Estes resultados estão de acordo com os valores de sensibilidade e especificidade encontrados para cada um dos ensaios moleculares, já que nenhuma diferença significativa foi observada (Tabela 9).

A identificação espécie-específica das infecções detectadas (Figura 15B) mostrou o mesmo padrão de positividade, sem diferença significativa entre os métodos (MO vs. protocolos moleculares) ou alvos avaliados (ribossomal vs. não ribossomais). Com relação às espécies de *Plasmodium* identificadas, nos pacientes com malária sintomática, *P. vivax* e *P. falciparum* foram encontrados em proporções semelhantes. Apesar disso, cinco de seis infecções mistas identificadas pela microscopia óptica (Fig. 15B, em cor laranja) não foram confirmadas por nenhum protocolo molecular (todas positivas para *P. vivax*, em vermelho).

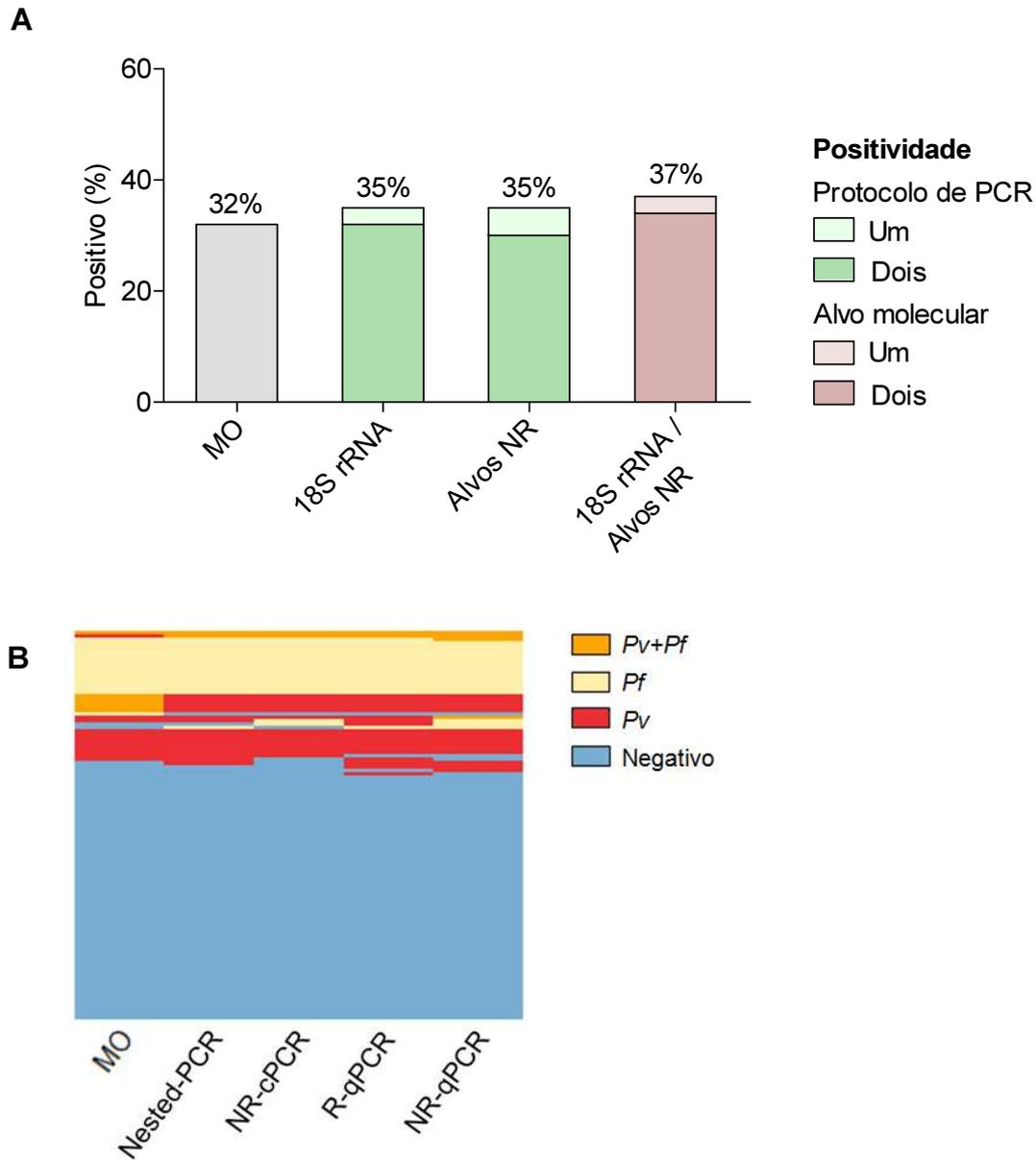


Figura 15: Positividade para malária entre indivíduos com suspeita clínica de malária (n=110) de acordo com a microscopia óptica (MO) ou protocolos moleculares baseados nos alvos ribossomal (*18S rRNA*) ou não ribossomal (NR). Os resultados foram expressos como **(A)** frequência de positivos de acordo com o alvo amplificado (*18S rRNA* e/ou Pvr47/Pfr364) ou protocolo de PCR (Nested-PCR, R-qPCR, NR-cPCR ou NR-qPCR); $p > 0,05$ para todas as comparações realizadas pelo Teste Qui-quadrado; **(B)** *heatmap* da positividade por espécie para cada protocolo de PCR: azul - negativo; vermelho - *P. vivax*; amarelo - *P. falciparum*; e laranja - infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*. Os ensaios são indicados nas colunas; cada linha corresponde a uma amostra testada (indivíduo) para os diferentes ensaios.

TABELA 9: Sensibilidade e especificidade dos diagnósticos moleculares em amostras de indivíduos com suspeita clínica de malária (n=110)

Protocolo molecular	Verdadeiro positivo	Falso* positivo	Verdadeiro negativo	Falso negativo	Sensibilidade	Especificidade
Nested-PCR	36	0	70	4	90%	100%
R-qPCR	37	1	70	2	95%	99%
NR-cPCR	34	0	70	6	85%	100%
NR-qPCR	36	1	70	3	92%	99%

A sensibilidade e especificidade dos ensaios foram determinadas como previamente descrito por Hofmann *et al.* (2018). O padrão de referência (verdadeiro positivo) para cada protocolo foi calculado através da combinação das detecções de qualquer PCR, excluindo-se o protocolo em avaliação. *Falso positivo no sentido que nenhum outro protocolo molecular detectou estas infecções.

Com relação ao grupo de indivíduos com provável infecção subclínica, a positividade pelo exame microscópico de rotina foi de apenas 7% (21 de 324) (Figura 16A). Contudo, nesta população, o diagnóstico molecular aumentou a detecção de malária subclínica de três a quatro vezes em relação ao diagnóstico parasitológico. Basicamente, enquanto os protocolos moleculares identificaram 92 (28%) infecções subclínicas, apenas 21 (7%) foram identificadas pela microscopia óptica ($p < 0,0001$, Figura 16), indicando que 71 das 92 (77%) infecções foram perdidas pelo exame de rotina. Foi possível observar, porém, que não houve diferença estatisticamente significativa entre a amplificação dos alvos ribossomais e não ribossomais; 72 (22%) infecções foram detectadas pelo gene *18S rRNA* e 89 (27%) pela amplificação dos alvos não ribossomais (Figura 16A). Apesar disso, a sensibilidade dos protocolos de PCR utilizados variou significativamente neste grupo, incluindo baixa sensibilidade para os protocolos de PCR convencional (Nested-PCR e NR-cPCR) (Tabela 10), o que refletiu em um número considerável de resultados discordantes (79 de 324, 24%) entre os protocolos (Anexo V). Uma quantidade significativa de infecções submicroscópicas foi identificada apenas pelos protocolos de PCR em tempo real, ou seja, a R-qPCR baseada no *18S rRNA* e a NR-qPCR baseada nas sequências de Pvr47/Pfr364, sendo, portanto, a maioria das infecções identificada tanto pelo alvo ribossomal quanto pelos alvos não ribossomais (Figura 16A, barra à direita; $p = 0,09$ para alvo *18S rRNA* vs. ambos os alvos e $p = 0,86$ para alvos não ribossomais vs. ambos os alvos).

Os resultados de identificação espécie-específica demonstraram uma alta proporção de *P. vivax* em comparação a *P. falciparum*, além de infecções mistas detectadas apenas pelos protocolos moleculares (Figura 16B). Embora, no geral, os

ensaios de PCR em tempo real (R-qPCR e NR-qPCR) tenham apresentado melhor desempenho em relação aos protocolos de PCR convencionais (NRc-PCR e Nested-PCR), os resultados confirmaram os ganhos obtidos com a NR-qPCR na detecção de infecções subclínicas por malária (Figura 16B).

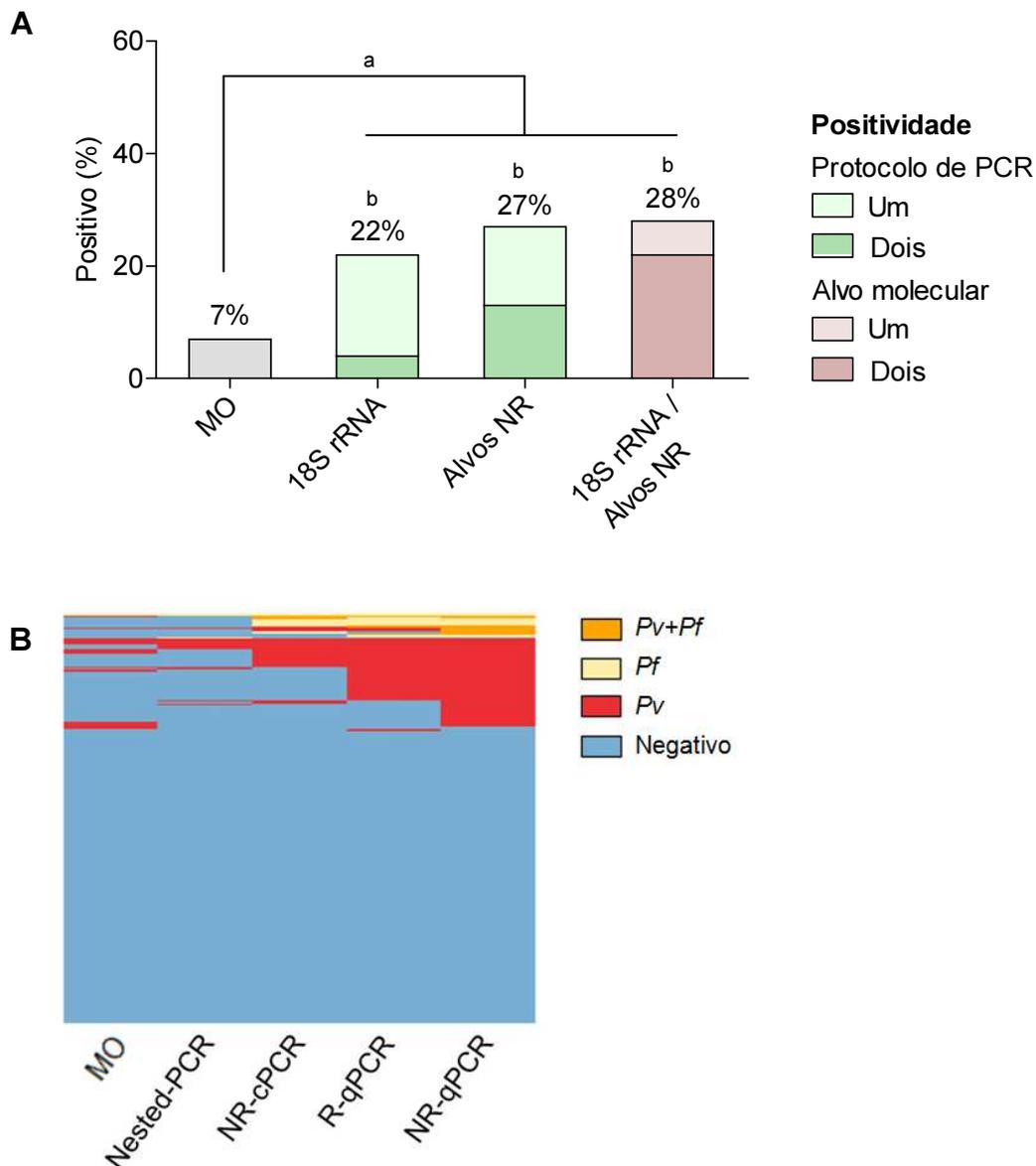


Figura 16: Positividade para malária entre indivíduos com suspeita de malária subclínica (n=324) de acordo com a microscopia óptica (MO) ou protocolos moleculares baseados nos alvos ribossomal (*18S rRNA*) ou não ribossomal (NR). Os resultados foram expressos como **(A)** frequência de positivos de acordo com o alvo amplificado (*18S rRNA* e/ou *Pvr47/Pfr364*) ou protocolo de PCR (Nested-PCR, R-qPCR, NR-cPCR ou NR-qPCR); diferentes letras (a,b) indicam diferenças entre proporções ($p < 0,05$ pelo Teste Exato de Fisher); **(B)** heatmap da positividade por espécie para cada protocolo de PCR: azul - negativo; vermelho - *P. vivax*; amarelo - *P. falciparum*; e laranja - infecção mista por *P. vivax* e *P. falciparum*. Os ensaios são indicados nas colunas; cada linha corresponde a uma amostra testada (indivíduo) para os diferentes ensaios.

6 DISCUSSÃO

6.1 Protocolos moleculares ribossomais e não ribossomais em infecção única e mista por *P. vivax* e *P. falciparum*

Atualmente, diferentes protocolos de amplificação têm sido descritos para o diagnóstico molecular da malária humana, a maioria apresentados como capazes de detectar baixas densidades parasitárias por diferentes espécies de *Plasmodium*. Contudo, os limites de detecção pré-estabelecidos por grande parte destes protocolos apresentam limitações. Em parte, porque os limites de detecção foram estabelecidos a partir da titulação de DNA plasmidial ou DNA de parasitos cultivados (no caso de *P. falciparum*), o que pode ter levado a uma superestimação, já que estas são amostras que amplificam com mais facilidade quando comparadas a amostras de campo (Camargos-Costa *et al.*, 2014). Outro fator limitante é que muitos protocolos têm sido validados utilizando-se apenas amostras de pacientes com malária sintomática, que, em geral, apresentam elevadas parasitemias (Rougemont *et al.*, 2004; Mangold *et al.*, 2005; Polley *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013; Lefterova *et al.*, 2015; Hashimoto *et al.*, 2018). Ressalta-se ainda que muitos destes estudos foram realizados em áreas endêmicas onde a transmissão de malária é relativamente estável, como a Papua Nova Guiné, Oceania (Hofmann *et al.*, 2018). Assim, os dados encontrados para aquelas regiões podem não ser aplicados à Amazônia brasileira, onde a transmissão é instável.

No presente estudo, foi possível estabelecer com sucesso um protocolo de PCR não ribossomal (NR-qPCR) baseado nas sequências multicópias Pvr47 e Pfr364 de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente. Os ensaios de titulação, tanto de DNA plasmidial quanto de amostras de campo, revelaram que a NR-qPCR foi capaz de detectar acuradamente as infecções únicas e mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*, gerando resultados reprodutíveis mesmo em baixas densidades parasitárias (1-3 parasitos/ μ L sangue). Além disso, o protocolo se mostrou específico, uma vez que não apresentou reação cruzada com diferentes espécies de *Plasmodium* ou com DNA humano.

É importante ressaltar que, em situações de infecção única por *P. falciparum*, os experimentos de titulação demonstraram que o alvo Pfr364 foi mais adequado para a detecção das infecções do que o *18S rRNA*. Isto se deve, provavelmente, ao grande número de cópias deste alvo no genoma de *P. falciparum*, o que resultou em maior sensibilidade dos protocolos não ribossomais em relação aos ribossomais. De relevância, os iniciadores aqui desenhados para Pfr364/NR-qPCR contemplaram praticamente toda a subfamília 1 do alvo, incluindo aproximadamente 22 cópias. Esta maior sensibilidade da sequência não ribossomal para detectar infecção por *P. falciparum* tem importância clínica, já que esta é a espécie mais patogênica e que pode levar à morte se não diagnosticada e tratada precocemente (WHO, 2018).

No geral, os ensaios de titulação das amostras de campo demonstraram que a principal vantagem da NR-qPCR em relação aos outros protocolos avaliados (ribossomais e não ribossomal) foi a identificação de infecções mistas, sendo este o único protocolo capaz de detectar consistentemente as duas espécies mesmo com uma diferença de concentração de 240 a 700 vezes entre elas.

Na prática clínica, as infecções por mais de uma espécie de plasmódio são frequentemente negligenciadas. No entanto, embora a detecção de infecções mistas seja baixa pela microscopia de rotina (<2%), os métodos de PCR têm mostrado que as frequências destas infecções podem ser bem mais elevadas, podendo chegar a 55-65% das infecções em uma determinada área (Mayxay *et al.*, 2004). Estudos longitudinais para estabelecimento de critério de cura em pacientes tratados e não re-expostos à transmissão demonstraram que o tratamento de uma infecção única por plasmódio pode resultar frequentemente no aparecimento tardio da outra espécie (Mayxay *et al.*, 2001). Isto é relevante não só para as medidas de controle e vigilância de malária em uma área, mas também para a abordagem terapêutica, uma vez que o tratamento é espécie-específico. Assim, um diagnóstico incorreto pode favorecer a transmissão da espécie que foi negligenciada, bem como resultar em doença clínica após tratamento específico (Okell *et al.*, 2012; Wampfler *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2018).

Considerando-se, portanto, a importância de se identificar casos de infecção mista oportunamente, um resultado relevante aqui obtido foi a incapacidade da R-qPCR (alvo *18S rRNA*) em detectar o DNA de *P. falciparum* em situação de coinfeção com *P. vivax*. O uso de apenas um par de iniciadores para ambas as

espécies pode ter sido um fator determinante para a falha de identificação das coinfeções, já que os iniciadores podem competir pelo DNA alvo na reação de PCR, favorecendo a amplificação de *P. vivax*. Nesse sentido, o estudo original da R-qPCR (Rougemont *et al.*, 2004) relatou uma situação de competição de iniciadores em misturas com plasmídeos de *P. falciparum* e *P. malariae*, favorecendo a amplificação de *P. falciparum* devido ao menor tamanho do seu amplicon (159 pb vs. 165 pb). Esta parece ser uma limitação relevante para a aplicação deste protocolo em amostras de campo, especialmente em áreas com alta prevalência de duas ou mais espécies de *Plasmodium*. Em conjunto, os resultados apresentados sugerem que o protocolo NR-qPCR aqui desenvolvido é promissor para detectar infecções mistas.

6.2 Alvos não ribossomais para o diagnóstico de malária em indivíduos com suspeita de malária clínica e subclínica

Nos últimos anos, as análises moleculares têm evidenciado lacunas entre os dados epidemiológicos e a real prevalência das infecções por *Plasmodium*, muitas vezes subestimadas devido às baixas parasitemias no indivíduo infectado e consequente falha de diagnóstico pelos métodos de rotina (Proux *et al.*, 2011; Golassa *et al.*, 2013). Por outro lado, protocolos moleculares pouco sensíveis e reprodutíveis também podem ocultar parasitemias e coinfeções subpatentes, contribuindo para a manutenção da doença em muitas áreas (Camargos-Costa *et al.*, 2014; Vincent *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos nos ensaios de PCR com amostras provenientes de indivíduos com suspeita clínica de malária demonstraram que não houve diferença significativa entre os alvos ribossomal e não ribossomal, bem como entre os protocolos moleculares utilizados, para detecção das infecções por *P. vivax* e *P. falciparum*. De fato, neste grupo com malária clínica, os valores de sensibilidade e especificidade obtidos para cada protocolo molecular foram semelhantes. Estes resultados eram esperados uma vez que indivíduos sintomáticos apresentam, geralmente, maior concentração de parasitos no sangue periférico, sendo as

infecções maláricas mais facilmente detectadas, tanto por métodos moleculares quanto pela microscopia de rotina (Zimmerman & Howes, 2015).

Embora não houve diferença entre a microscopia e os protocolos de PCR na identificação da malária clínica, os dados aqui apresentados mostram um grande número de infecções submicroscópicas circulando na população residente na área endêmica estudada (cerca de 70% das infecções). Este estudo mostrou ainda que a maior parte das infecções subclínicas foi causada por *P. vivax*, espécie mais comumente responsável pela malária na região amazônica (Oliveira-Ferreira *et al.*, 2010; Kano *et al.*, 2012; Souza-Silva *et al.*, 2014; Sampaio *et al.*, 2015). Estes resultados confirmam os achados de estudos recentes que também demonstraram altas taxas de infecções submicroscópicas por *P. vivax* em diferentes cenários de transmissão, particularmente em áreas consideradas de baixa transmissão (Cheng *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2015; Almeida *et al.*, 2018; Gruenberg *et al.*, 2018). Embora a razão para essa alta taxa de infecções assintomáticas por *P. vivax* seja desconhecida, é provável que esteja associada à biologia deste parasito, que inclui uma rápida aquisição de imunidade em comparação com a infecção causada por *P. falciparum*, levando ao controle da parasitemia e manutenção da carga parasitária em nível submicroscópico (Adams e Mueller, 2017).

Os resultados aqui apresentados permitiram demonstrar ainda que a detecção simultânea de alvos ribossomais e não ribossomais não aumentou as chances de se detectar infecções subclínicas. Apesar disso, a amplificação dos alvos Pvr47/Pfr364 foi mais eficiente que a amplificação do gene *18S rRNA* na identificação de infecções submicroscópicas. A maior sensibilidade da NR-qPCR em identificar uma prevalência mais realística de infecção malárica na área de estudo é relevante, particularmente, para os programas de vigilância epidemiológica da doença na Amazônia. Isto porque a correta identificação dos indivíduos portadores de malária subclínica, que podem constituir fonte importante de infecção para o mosquito vetor, representa um dos grandes obstáculos para o controle e a eliminação da malária nas Américas (Recht *et al.*, 2017; Ferreira & Castro, 2016). Além disso, há uma tendência atual para que os portadores de malária subclínica e submicroscópica sejam tratados, visando a interrupção completa do ciclo de transmissão da doença (Cheng *et al.*, 2015).

Embora os ensaios de titulação *in vitro* tenham demonstrado que a NR-qPCR é promissora para a detecção de infecção mista, estes resultados não puderam ser confirmados em amostras de campo com malária subclínica, já que a maioria das infecções submicroscópicas foi causada por *P. vivax*. Além de *P. vivax* ser o parasito predominante na área de estudo (Kano *et al.*, 2012; Kano *et al.*, 2016), o progresso alcançado na redução do número de casos de *P. falciparum* nos últimos anos fez com que este parasito seja, atualmente, encontrado em baixos índices (Siqueira *et al.*, 2016). Apesar disso, a malária por *P. falciparum* tem ressurgido em áreas onde antes foi controlada e evidências recentes sugerem que a frequência destas infecções pode ser muito maior do que o esperado (Singh *et al.*, 2017), inclusive na região amazônica (Camargo *et al.*, 2018). Nesse sentido, faz-se necessário ampliar este estudo para áreas onde coexista a transmissão de *P. vivax* e *P. falciparum*, incluindo áreas onde há atualmente risco de re-emergência de *P. falciparum*, como é o caso das áreas de fronteiras da Amazônia com países vizinhos, como a Venezuela, onde a crise política e humanitária tem limitado as ações de controle e vigilância da doença (Hotez *et al.*, 2017; Grillet *et al.*, 2018).

Em conjunto, os resultados apresentados demonstram que a NR-qPCR aqui desenvolvida é promissora para o diagnóstico de malária clínica e subclínica, incluindo infecções subpatentes e mistas por *P. vivax* e *P. falciparum*. Entretanto, mais estudos fazem-se necessários para avaliar o desempenho do protocolo em áreas onde haja co-circulação destas espécies.

7 CONCLUSÕES

Na população estudada, o presente estudo permitiu demonstrar que:

- 1) O protocolo NR-qPCR aqui desenvolvido é eficaz para o diagnóstico espécie-específico de malária por *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo recomendado para áreas com alta prevalência de infecções assintomáticas, submicroscópicas e mistas;
- 2) A utilização simultânea de alvos ribossomais (*18S rRNA*) e não ribossomais (Pvr47/Pfr364) para o diagnóstico molecular de malária por *P. vivax* e *P. falciparum* não aumenta as chances de se detectar infecções submicroscópicas;
- 3) O alvo não ribossomal Pfr364 se mostrou mais adequado do que o gene *18S rRNA* para detectar infecções por *P. falciparum*, incluindo aquelas onde existe coinfeção com *P. vivax*;
- 4) O desempenho dos protocolos moleculares (ribossomal e não ribossomal) é semelhante ao da microscopia óptica nos casos de malária sintomática por *P. vivax* ou *P. falciparum*; entretanto, em casos de infecção mista, há discordância entre os métodos.

REFERÊNCIAS

- ACHAN, J. *et al.* **Malaria medicines to address drug resistance and support malaria elimination efforts.** *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2018 Jan;11(1):61-70.
- ADAMS, J.H. MUELLER, I. **The Biology of *Plasmodium vivax*.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Sep 1;7(9).
- ALHO, R.M. *et al.* **Alternative transmission routes in the malaria elimination era: an overview of transfusion-transmitted malaria in the Americas.** *Malar J.* 2017 Feb 15; 16:78.
- ALMEIDA, A.C.G. *et al.* **High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon.** *Parasit Vectors.* 2018 Mar 20;11(1):194.
- ALVES, F.P. *et al.* **Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon.** *J Med Entomol.* 2005 Sep; 42(5):777-9.
- AMINO, R. **Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal.** *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):220-4.
- ANDREWS, L. *et al.* **Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials.** *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Jul;73(1):191-8.
- AYDIN-SCHMIDT, B. *et al.* **Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Accurately Detects Malaria DNA from Filter Paper Blood Samples of Low Density Parasitaemias.** *PLoS One.* 2014 Aug 8;9(8):e103905.
- BAILEY, J.W. *et al.* **Guideline: the laboratory diagnosis of malaria.** *Br J Haematol.* 2013 Dec; 163(5):573-80.
- BAIRD, J.K. **Evidence and Implications of Mortality Associated with Acute *Plasmodium vivax* Malaria.** *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jan; 26(1):36-57.
- BAIRD, J.K. *et al.* **Diagnosis and Treatment of *Plasmodium vivax* Malaria.** *Am J Trop Hyg.* 2016 Dec 28; 95(6 Suppl):35-51.
- BARILLAS-MURY, C.; KUMAR, S. ***Plasmodium*-mosquito interactions: a tale of dangerous liaisons.** *Cell Microbiol.* 2005 Nov;7(11):1539-45.
- BELLO, R.J. *et al.* **Venezuela's health-care crisis.** *Lancet.* 2017 Aug 5; 390(10094):551.

- BLANDIN, S. *et al.* **Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*.** Cell. 2004 Mar 5;116(5):661-70.
- BOUSEMA, T. *et al.* **Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance.** Nat Rev Microbiol. 2014 Oct; 12:833-840.
- BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. **Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination.** Clin Microbiol Rev. 2011 Apr;24(2):377-410.
- BRASIL, P. *et al.* **Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation.** Lancet Glob Health. 2017 Oct;5(10):e1038-e1046.
- CAMARGO, M. *et al.* **Micro-epidemiology of mixed-species malaria infections in a rural population living in the Colombian Amazon region.** Sci Rep. 2018 Apr 3;8(1):5543.
- CAMARGOS-COSTA, D. *et al.* **Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods?** Mem Inst Oswaldo Cruz. In Press 2014:1-8.
- CHENG, Q. *et al.* **Systematic Review of Sub-microscopic *P. vivax* Infections: Prevalence and Determining Factors.** PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(1):e3413.
- CLARKSON, C.S.; TEMPLE, H.J.; MILES, A. **The genomics of insecticide resistance: insights from recent studies in African malaria vectors.** Curr Opin Insect Sci. 2018 Jun;27:111-115.
- COMMONS, R.J. *et al.* **The effect of chloroquine dose and primaquine on *Plasmodium vivax* recurrence: a WorldWide Antimalarial Resistance Network systematic review and individual patient pooled meta-analysis.** Lancet Infect Dis. 2018 Sep;18(9):1025-1034.
- CORDRAY, M.S. RICHARDS-KORTUM, R.R. **Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria.** Am J Trop Med Hyg. 2012 Aug; 87(2):223-30.
- COWMAN, A.F. *et al.* **The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites.** Cell Host Microbe. 2017 Aug 9;22(2):232-245.
- DE ALVARENGA, D.A.M. *et al.* **An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest.** Sci Rep. 2018 Jan 8;8(1):86.
- DE KONINCK, A.S. **Diagnostic performance of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based illumigene[®] malaria assay in a non-endemic region.** Malar J. 2017 Oct 17;16(1):418.

- DE PINA-COSTA, A. *et al.* **Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Aug; 109(5):618-33.
- DE SOUZA, A.M. *et al.* **Multiple-clone infections of *Plasmodium vivax*: definition of a panel of markers for molecular epidemiology.** Malar J. 2015 Aug 25;14:330.
- DEANE, L.M. *et al.* 1966. **Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil.** Bull World Health Organ 35: 805-808.
- DEMAS, A. *et al.* **Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA.** J Clin Microbiol. 2011 Jul; 49(7):2411-8.
- ERDMAN, L.K.; KAIN, K.C. **Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control.** Travel Med Infect Dis. 2008 Jan-Mar;6(1-2):82-99.
- FERREIRA, M.U.; CASTRO, M. C. **Challenges for malaria elimination in Brazil.** Malar J. 2016; 15:284.
- GAMA, B.E. *et al.* **Chemoresistance of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasites in Brazil: consequences on disease morbidity and control.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Aug;106 Suppl 1:159-66.
- GETHING, P.W. *et al.* **A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010.** PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(9):e1814.
- GINOUVES, M. *et al.* **Frequency and distribution of mixed *Plasmodium falciparum*-*vivax* infections in French Guiana between 2000 and 2008.** Malar J. 2015 Nov 10;14:446.
- GOLASSA, L. *et al.* **Detection of a substantial number of sub-microscopic *Plasmodium falciparum* infections by polymerase chain reaction: a potential threat to malaria control and diagnosis in Ethiopia.** Malar J. 2013 Oct 3;12:352.
- GREENWOOD, B.M.; ARMSTRONG, J.R. **Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991 Mar-Apr;85(2):186-8.
- GRILLET, M.E. *et al.* **Malaria in Venezuela requires response.** Science. 2018 Feb 2;359(6375):528.
- GRUENBERG, M. *et al.* ***Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions.** Malar J. 2018 Jan 30;17(1):55.
- HARRIS, I. *et al.* **A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting.** Malar J. 2010 Sep 7;9:254.

HASHIMOTO, M. *et al.* **In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *Plasmodium* species in wide-range thin blood smears.** Malar J. 2018 Jun 19;17(1):235.

HOFMANN, N. *et al.* **Ultra-Sensitive Detection of *Plasmodium falciparum* by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets.** PLoS Med. 2015 Mar 3; 12(3):e1001788.

HOFMANN, N. *et al.* **Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study.** Lancet Infect Dis. 2018 Oct;18(10):1108-1116.

HOPKINS, H. *et al.* **Highly Sensitive Detection of Malaria Parasitemia in a Malaria-Endemic Setting: Performance of a New Loop-Mediated Isothermal Amplification Kit in a Remote Clinic in Uganda.** J Infect Dis. 2013 Aug 15; 208(4):645-52.

HOPP, C.S. *et al.* **Longitudinal analysis of *Plasmodium* sporozoite motility in the dermis reveals component of blood vessel recognition.** Elife. 2015 Aug 13;4.

HOTEZ, P.J. *et al.* **Venezuela and its rising vector-borne neglected diseases.** PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jun 29;11(6):e0005423.

HOWES, R.E. *et al.* **Global Epidemiology of *Plasmodium vivax*.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 2016; 95(Suppl 6):15-34.

HYDE, J.E. **Drug-resistant malaria.** Trends Parasitol. 2005 Nov;21(11):494-8.

ISHINO, T. *et al.* **Cell-Passage Activity Is Required for the Malarial Parasite to Cross the Liver Sinusoidal Cell Layer.** PLoS Biol. 2004 Jan;2(1):E4.

JOSLING, G.A.; LLINÁS, M. **Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit.** Nat Rev Microbiol. 2015 Sep; 13(9):573-87.

KAMAU, E. *et al.* **Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria.** PLoS One. 2013 Aug 29; 8(8):e71539.

KANO, F. S. *et al.* ***Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region.** Trop Med Int Health. 2012 Aug; 17(8):989-1000.

KANO, F. S. *et al.* **The Presence, Persistence and Functional Properties of *Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein II Antibodies Are Influenced by HLA Class II Allelic Variants.** PLoS Negl Trop Dis. 2016 Dec 13; 10(12):e0005177.

KIRCHGATTER, K. *et al.* **Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil.** British Med J. 2005; 331:576–b.

- KROTOSKI, W.A. **The hypnozoite and malarial relapse.** *Prog Clin Parasitol.* 1989; 1:1-19.
- LAPORTA, G.Z. *et al.* **Habitat suitability of *Anopheles* vector species and association with human malaria in the Atlantic Forest in south-eastern Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Aug;106 Suppl 1:239-45.
- LEFTEROVA, M.I. *et al.* **Simple Real-Time PCR and Amplicon Sequencing Method for Identification of *Plasmodium* Species in Human Whole Blood.** *J Clin Microbiol.* 2015 Jul;53(7):2251-7.
- LIMA, G.F. *et al.* **Still Searching for a Suitable Molecular Test to Detect Hidden *Plasmodium* Infection: A Proposal for Blood Donor Screening in Brazil.** *PLoS One.* 2016 Mar 9; 11(3):e0150391.
- Lloyd, Y.M. *et al.* **PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial *cox3* and *varATS* primers.** *Trop Med Health.* 2018 Jun 22;46:22.
- LUCCHI, N.W. *et al.* **Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era.** *Public Health Genomics.* 2013; 16(1-2):37-43.
- MALLERET, B. *et al.* ***Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes.** *Blood.* 2015 Feb 19; 125(8):1314-24.
- MANGOLD, K.A. *et al.* **Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp.** *J Clin Microbiol.* 2005 May; 43(5):2435-40.
- MATHISON, B.A.; PRITT, B.S. **Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization.** *J Clin Microbiol.* 2017 Jul; 55(7):2009-2017.
- MAYXAY, M. *et al.* **Identification of cryptic coinfection with *Plasmodium falciparum* in patients presenting with vivax malaria.** *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):588-92.
- MAYXAY, M. *et al.* **Mixed-species malaria infections in humans.** *Trends Parasitol.* 2004 May;20(5):233-40.
- MÉNARD, R. *et al.* **Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity.** *Nat Rev Microbiol.* 2013 Oct; 11(10):701-12.
- MENARD, D.; DONDORP, A. **Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Jul 5;7(7).
- MERCEREAU-PUIJALON, O. *et al.* **Three Multigene Families in *Plasmodium* Parasites: Facts and Questions.** *Int J Parasitol.* 2002; 32 (11):1323-1344.
- MIXSON-HAYDEN, T. *et al.* **Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection.** *BMC Res Notes.* 2010 Mar 31;3:88.

MOLINA-CRUZ, A. *et al.* **Mosquito Vectors and the Globalization of *Plasmodium falciparum* Malaria.** *Annu Rev Genet.* 2016 Nov 23;50:447-465.

MOREIRA, C.M. *et al.* **A systematic review of submicroscopic *Plasmodium vivax* infection.** *Malar J.* 2015 Sep 22;14:360.

MOTA, A. *et al.* **Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection.** *Science.* 2001 Jan 5;291(5501):141-4.

MOUATCHO, J.C.; GOLDRING, J.P.D. **Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects.** *J Med Microbiol.* 2013 Oct; 62:1491-505.

MURPHY, S.C. *et al.* **Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials.** *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Mar; 86(3):383-94.

NEIVA, A. **Formação de raça do hematozoário do impaludismo resistente á quinina.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1910; 2(1).

NGUYEN, T.N. *et al.* **The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study.** *Lancet Infect Dis.* 2018 May;18(5):565-572.

OKELL, L.C. *et al.* **Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control.** *Nat Commun.* 2012; 3:1237.

OLETTA, J.F. *et al.* **Venezuela: violence, human rights, and health-care realities.** *Lancet.* 2014 Jun 7;383(9933):1967.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* **Malaria in Brazil: an overview.** *Malar J.* 2010 Apr 30;9:115.

OLLIARO, P.L. *et al.* **Implications of *Plasmodium vivax* Biology for Control, Elimination, and Research.** *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Dec 28;95(6 Suppl):4-14.

PATEL, J.C. *et al.* **Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of *Plasmodium vivax*.** *PLoS One.* 2013;8(1):e54986.

PHILLIPS, M.A. *et al.* **Malaria.** *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Aug 3;3:17050.

POLLEY, S.D. *et al.* **Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification.** *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2866-71.

POLLEY, S.D. *et al.* **Clinical Evaluation of a Loop-Mediated Amplification Kit for Diagnosis of Imported Malaria.** *J Infect Dis.* 2013 Aug 15;208(4):637-44.

PONCE, C. *et al.* **Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting.** *Parasite*. 2017;24:53.

PRADEL, G.; FREVERT, U. **Malaria Sporozoites Actively Enter and Pass Through Rat Kupffer Cells Prior to Hepatocyte Invasion.** *Hepatology*. 2001 May;33(5):1154-65.

PRICE, R.N. *et al.* **Global extent of chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*: a systematic review and meta-analysis.** *Lancet Infect Dis*. 2014 Oct;14(10):982-91.

PROUX, S. *et al.* **Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection.** *Malar J*. 2011 Oct 28; 10:323.

RECHT, J. *et al.* **Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination.** *Malar J*. 2017 Jul 4; 16(1):273.

ROUGEMONT, M. *et al.* **Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays.** *J Clin Microbiol*. 2004 Dec; 42(12):5636-43.

SAMPAIO, V.S. *et al.* **Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development.** *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48 Suppl 1:4-11.

SANTELLI, A.C.F.S. *et al.* **Plano de Eliminação de Malária no Brasil.** 2016.

SCURACCHIO, P. *et al.* **Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011; 53:55-9.

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

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

Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Ministério da Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária.** 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.%20c%20-%20malaria_CIT_30_ago_2018_cassiopeterka.pdf>. Acesso em 04 de Dezembro de 2018.

SINGH, B. *et al.* **A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies.** *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Apr;60(4):687-92.

SINGH, R. *et al.* **Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay.** *J Infect*. 2013 Sep; 67(3):245-7.

SINGH, U.S. *et al.* **Can Malaria Mixed Parasite Infections Thwart Targeted Malaria Elimination Program in India?** *Biomed Res Int.* 2017;2017:2847548.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. **The Skin: Where Malaria Infection and the Host Immune Response Begin.** *Semin Immunopathol.* 2012 Nov;34(6):787-92.

SIQUEIRA, A.M. *et al.* ***Plasmodium vivax* Landscape in Brazil: Scenario and Challenges.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016 Dec 28; 95(Suppl 6):87-96.

SIQUEIRA, A.M. *et al.* **Raising the red flag for malaria elimination and integrated fever surveillance in the Brazilian amazon.** *The Lancet.* 2017 Mar; 5(3):e257-e258.

SNOUNOU, G. *et al.* **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Oct; 61(2):315-20.

SOUZA-SILVA, F. A. *et al.* **Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity.** *PLoS One.* 2014 Apr 7; 9(4):e93782.

STURM, A. *et al.* **Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids.** *Science.* 2006 Sep 1;313(5791):1287-90.

TADESSE, F. G. *et al.* **The shape of the iceberg: quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia.** *Malar J.* 2017 Mar 3; 16(1):99.

TRAGER, W; JENSEN, J.B. **Human malaria parasites in continuous culture.** *Science.* 1976 Aug 20; 193(4254):673-5.

VALLEJO, A.F. *et al.* ***Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections.** *Malar J.* 2016 Jan 28;15:48.

VIANA, G.M.R. *et al.* **Field evaluation of a real time loop-mediated isothermal amplification assay (RealAmp) for malaria diagnosis in Cruzeiro do Sul, Acre, Brazil.** *PLoS One.* 2018 Jul 11;13(7):e0200492.

VINCENT, O.O. *et al.* **Comparison of Nested PCR and Conventional Analysis of *Plasmodium* Parasites in Kano, Nigeria.** *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences* 2017; 3(5): 85-90.

VISSER, T. *et al.* **Rapid diagnostic tests for malaria.** *Bull World Health Organ.* 2015 Dec 1; 93(12):862-6.

WAMPFLER, R. *et al.* **Strategies for Detection of *Plasmodium* species Gametocytes.** *PLoS One.* 2013 Sep 27; 8(9):e76316.

- WHITE, N.J. *et al.* **Malaria**. Lancet. 2014 Feb 22;383(9918):723-35.
- WHO. **Drug resistance in malaria**. Geneva, World Health Organization. 2001.
- WHO. **World Malaria Report 2014**, Geneva, World Health Organization. 2014.
- WHO. **Guidelines for the treatment of Malaria**. Geneva, World Health Organization. 2015a.
- WHO. **Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030**. Geneva, World Health Organization. 2015b.
- WHO. **World Malaria Report 2016**, Geneva, World Health Organization. 2016a.
- WHO. **Eliminating Malaria**. Geneva, World Health Organization. 2016b.
- WHO. **World Malaria Report 2017**, Geneva, World Health Organization. 2017a.
- WHO. **Malaria Rapid Diagnostic Test Performance**, Geneva, World Health Organization. 2017b.
- WHO. **World Malaria Report 2018**, Geneva, World Health Organization. 2018.
- WONG, Y.P. **Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms**. J Appl Microbiol. 2018 Mar; 124(3):626-643.
- YAMAUCHI, L.M. **Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site**. Cell Microbiol. 2007 May;9(5):1215-22.
- ZIMMERMAN, P.A.; HOWES, R.E. **Malaria diagnosis for malaria elimination**. Curr Opin Infect Dis. 2015 Oct;28(5):446-54.

APÊNDICE

Artigo publicado na revista *Malaria Journal*, em 30 de Abril de 2019.

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

Malaria Journal

RESEARCH

Open Access



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

Lara Cotta Amaral¹, Daniela Rocha Robortella^{1,2}, Luiz Felipe Ferreira Guimarães¹, Jean Ezequiel Limongi³, Cor Jesus Fernandes Fontes⁴, Dhelio Batista Pereira⁵, Cristiana Ferreira Alves de Brito¹, Flora Satiko Kano¹, Tais Nóbrega de Sousa^{1*} and Luzia Helena Carvalho^{1,2*} 

Abstract

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

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

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

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

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

*Correspondence: tals@minas.fiocruz.br; lhcavalho@minas.fiocruz.br
¹ Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, MG, Brazil
 Full list of author information is available at the end of the article



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

Background

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

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

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

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

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

Methods

Study population and participants

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

Clinical malaria

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

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

Subclinical malaria

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

Conventional light microscopy

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

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

Extraction of genomic DNA

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

Panel of *Plasmodium* reference samples

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

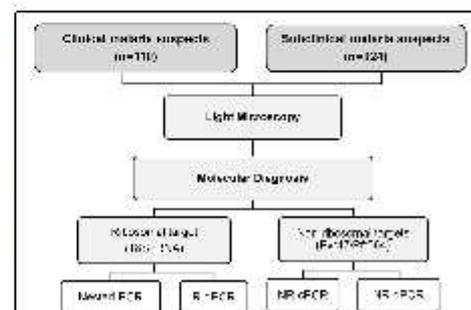


Fig. 1 Methodological strategy for field evaluation of PCR-based protocols. Regardless the results obtained by light microscopy, blood-derived DNA samples from clinical ($n=110$) and subclinical ($n=324$) malaria suspects were submitted to species-specific PCR based-protocols targeting ribosomal (18S rDNA gene) and non-ribosomal *Plasmodium* sequences. The 18S rRNA-based protocols included a Nested-PCR assay adapted from the original protocol (16) with modifications (22), and a real-time PCR assay (R-gPCR) as previously described (17). The non-ribosomal (NR) amplification of *P. vivax* (Pv47) and *P. falciparum* (Pf364) involved a previously described single step conventional PCR assay (NR-cPCR) (24), and a real-time PCR protocol (NR-gPCR) whose primers and cycling conditions were described in "Methods".

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

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

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

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

Primers and MGB (minor groove binder) probes were designed for Pvr47 and Pfr364 targets using Primer-Blast (NCBI) and OLIGO (version 4.0, 1999) softwares, considering conserved regions in each species alignments. The alignments were based on the sequences previously described [24], composed of 14 copies of Pvr47 (*P. vivax* Sal-I strain) and 41 copies of Pfr364 (subfamilies 1 and 2 of *P. falciparum* 3D7 strain). The set of oligonucleotides obtained for Pvr47 was 5'TCCGCAGCTCACAAA TGTTTC3' (forward), 5'ACATGGGGATTCTAAGCC AATTTA3' (reverse), and 5'HEX-TCCGCGAGGGCT GCAA3' (probe), which binds respectively to positions 142–161, 245–222 and 189–204 of *P. vivax* Sal-I (GenBank accession number AAKM01000578), resulting in a 104 bp amplicon. For Pfr364, the set used was 5'ACT CGCAATAACGCTGCAT3' (forward), 5'TTCCCTGCC CAAAAACGG3' (reverse), and 5'FAM-GGTGCCGGG GGTTCCTACGC3' (probe), which binds respectively to positions 313–331, 400–383 and 335–354 of *P. falciparum* 3D7 (*Pf3D7_04_12625_14152*, in [24]), resulting in an 88 bp amplicon. All NR-qPCR reactions were performed in 10 μ L volumes containing 2 μ L of DNA (~3 to 6 μ L of whole blood) and 5 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). For Pvr47

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

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

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

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

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

Statistical analysis

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

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

Results

Limit of detection of Pvr47 and Pfr364 NR-qPCR

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

Ribosomal and non-ribosomal detection

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

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

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

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

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

Parasite density (μ L) ^a	18S rRNA		Pvr47	
	Nested-PCR	R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2000	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
1	1/3 (33%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
0.3	0/3 (0%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)
PCR positivity	22/27 (81%) ^{a,b}	25/27 (93%) ^b	18/27 (67%) ^a	26/27 (96%) ^b
Target positivity	47/54 (87%) ^d		44/54 (81%) ^d	

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

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

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

^c Determined by Light Microscopy

^d Parasite density (μ L of blood) was estimated according to the fold-dilution

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

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

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

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

^c Determined by light microscopy

^d Parasite density (μL of blood) was estimated according to the fold-dilution

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

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

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

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

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

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

Table 4 Titration of *P. vivax* in artificial mixed infections by PCR assays targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (PvM7/Pf364) species-specific sequences

Parasite density (per µl of blood)		18S rRNA						PvM7/Pf364 (NR targets)					
		Nested-PCR			R-qPCR			NR-cPCR			NR-qPCR		
Pf	Pv	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
1459	1433	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	478	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf									
	159	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf									
	53	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf									
	38	Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
	6	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf									
	2	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pv+Pf
	0.7	Pv+Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pv+Pf
PCR positivity		18/24 (75%) ^a			15/24 (63%) ^a			17/24 (71%) ^a			17/24 (71%) ^a		
Target positivity		33/48 (69%) ^b						40/48 (83%) ^b			23/24 (96%) ^b		

Afficial mixtures containing *P. vivax* (Pv) and *P. falciparum* (Pf) in different proportions were prepared from well-characterized field samples, as described in Methods. The results are expressed as positive to *P. vivax* and *P. falciparum* (Pv + Pf), *P. vivax* (Pv) or *P. falciparum* (Pf). For each PCR assay, dilution points were assayed in triplicate (#1 to #3). Different letters (a, b) indicate differences between proportions ($p < 0.05$, by Fisher's exact test). No difference was observed between proportions of targets positivity (a).

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

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

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

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

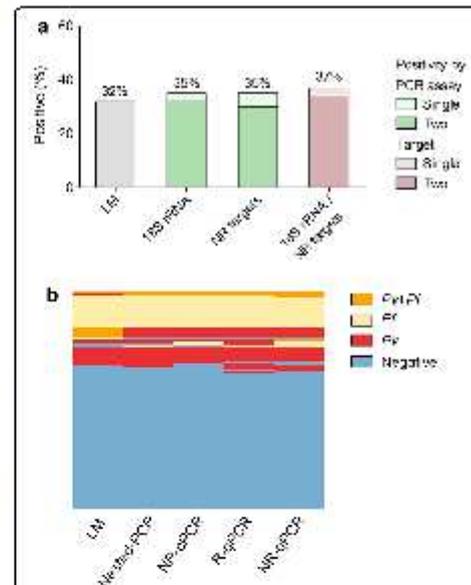


Fig. 2 Malaria prevalence among clinical malaria suspects ($n=110$) as detected by light microscopy (LM) or PCR-based protocols targeting ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal (NR) sequences of *P. vivax/P. falciparum*. The results were expressed as (a) frequency of positives according to the amplified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

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

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

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

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

^a False positive in a sense that no other molecular protocol detected these infections

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

Discussion

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

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

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

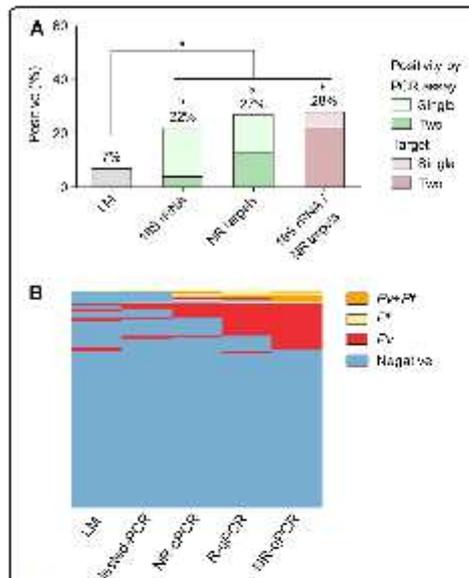


Fig. 3 Malaria prevalence among subclinical malaria suspects (n = 324) as detected by Light Microscopy (LM) or PCR-based protocols targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (NR) sequences of *P. vivax* and *P. falciparum*. The results were expressed as (A) frequency of positives according to the amplified parasite target region (18S rRNA and/or NR targets) or PCR assay (nested-PCR vs. R-qPCR or NR-cPCR vs. NR-qPCR); Different letters (a, b) indicate differences between proportions ($p < 0.05$, Fisher's exact approach for post hoc analysis of a Chi squared test); (B) Heat map representation of species-specific positivity as detected by each PCR protocols: blue—negative; red—*P. vivax*; yellow—*P. falciparum*; and orange—mixed *P. vivax/P. falciparum* infection. Each column represents an assay and subjects were represented in rows

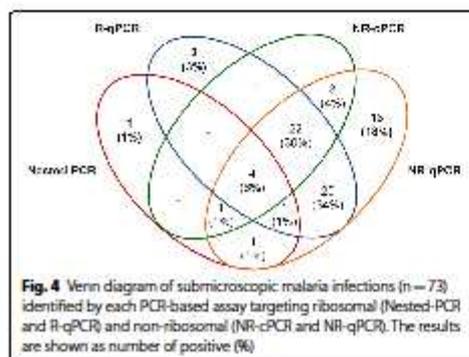


Fig. 4 Venn diagram of submicroscopic malaria infections (n = 73) identified by each PCR-based assay targeting ribosomal (Nested-PCR and R-qPCR) and non-ribosomal (NR-cPCR and NR-qPCR). The results are shown as number of positive (%)

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusion

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

Additional files

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

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

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

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

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

Abbreviations

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

Authors' contributions

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

Author details

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

Acknowledgements

The authors would like to thank the MIRA/BeI Resources/NIAID/NH/ATCC for providing the genomic DNA of the *P. brasilianum* Peruvian II strain (MRA-349). We also thank the Programme for Technological Development in Tools for Health-PDTS-FIOCRUZ for use of the DNA sequencing (RPT01E) and Real-Time PCR (RPT09D) facilities. This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Research Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG) and Program of Excellence in Research/Diagnosis (Proep/IRV/FIOCRUZ). Fellowships from CNPq (LHC, CFAB, TNS, CJFF, DRR) and CAPES (LCA, LFFG) are also acknowledged. The authors declare that the study was conducted in the absence of any financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

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

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

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

Funding

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

Publisher's Note

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

Received: 11 February 2019 Accepted: 13 April 2019

Published online: 30 April 2019

References

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

7. Lamptey H, Ofori ME, Kus KA, Adu B, Yaboa EO, Baafour EK, et al. The prevalence of submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage and multiplicity of infection in children, pregnant women and adults in a low malaria transmission area in Southern Ghana. *Malar J*. 2018;17:331.
8. Bejon P, Andrews I, Hunt-cooke A, Sanderson F, Gilbert SC, Hill AVS. Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malar J*. 2006;5:104.
9. Haanshuus CG, Chandry S, Manoharan A, Vitek R. A high malaria prevalence identified by PCR among patients with acute undifferentiated fever in India. *PLoS ONE*. 2016;11:e0158816.
10. Cheng Q, Cunningham J, Gatton ML. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e013413.
11. Moreira CM, Shehadeh MA, Prica RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2015;14:360.
12. Almeida ACC, Kushn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*. 2018;11:194.
13. Alves FP, Gil LHS, Marelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Pereira Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 2005;42:777–9.
14. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vlegte-Bolmer M, Omar SASR. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:470–4.
15. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Kilian G, Magill A, et al. "Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med*. 2016;13:e1001942.
16. Snounou G, Vinyakosol S, Zhu PZ, Jara W, Pinheiro L, Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;61:315–20.
17. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille JJK. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5636–43.
18. Mangold KA, Manson RH, Koay ES, Stephens L, Ragner M, Thomson RB Jr, Peterson LRK. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2435–40.
19. Murphy SC, Prantico JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86:383–94.
20. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PLoS ONE*. 2013;8:e71530.
21. Mercereau-Pujalon O, Barale J, Bischoff E. Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *Int J Parasitol*. 2002;32:1323–44.
22. Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BAM, Gomes LT, Fernandes Fontes CI, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mém Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:21–8.
23. Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:1108–16.
24. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2411–8.
25. Hofmann N, Mwingira F, Shakalagha S, Robinson LJ, Mueller I, Felger I. Ultra-sensitive detection of *Plasmodium falciparum* by amplification of multi-copy subtelomeric targets. *PLoS Med*. 2015;12:e1001788.
26. Gruenberg M, Moniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malar J*. 2018;17:55.
27. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding proteins: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012;17:989–1000.
28. Souza-silva A, Brito CFA, Adams JH, Kano FS, Carvalho LH. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. *PLoS ONE*. 2014;9:e93782.
29. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BA, Sousa TN, Alves JR, Rocha RS, Fontes CJ, Sanchez BA, Adams JH, Brito CF, Pires DE, Ascher DB, Sell AMCL. The presence, persistence and functional properties of *Plasmodium vivax* duffy binding protein II antibodies are influenced by HLA class II allelic variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0005177.
30. Ladete-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:452–9.
31. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Sousa N, Soares IS, et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: a nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS ONE*. 2018;13:e0207244.
32. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malaria. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
33. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. http://bvsm.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
34. Olsson ML, Hansson C, Awent ND, Åkesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*. 1998;38:168–73.
35. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193:673–5.
36. Lloyd YM, Esamu LE, Antalan J, Thomas B, Yunga ST, Obase B, et al. PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial *cox3* and *varATS* primers. *Trop Med Health*. 2018;46:22.
37. Maerstein-Kassel I, Andolina C, Carrio E, Mahamar A, Sawa P, et al. A multiplex assay for the sensitive detection and quantification of male and female *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Malar J*. 2018;17:441.
38. Andrews I, Anderson RF, Webster D, Dunachio S, Walther RM, Bejon P, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:191–8.
39. Inwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NPJ, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitaemias. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3303–9.
40. Lucchi NW, Oberstaller J, Kissinger JC. Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era. *Public Health Genomics*. 2013;16:37–43.
41. Zimmerman RA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28:446–54.
42. Bousema T, Okall I, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:833–40.
43. Ehteshami R, Fazaeli A, Raesi A, Keshavarz H, Haidari A. Detection of mixed-species infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by nested PCR and rapid diagnostic tests in southeastern Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:181–5.
44. Singh US, Sival N, Panda V, Das A. Can mixed parasite infections thwart targeted malaria elimination program in India? *Biomed Res Int*. 2017;2017:2847548.
45. Oliveira-ferreira J, Lacerda MWG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauli PL, Daniel-ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
46. Sampaio VS, Siqueira AM, Costa G, Paula M, Mourão G, Monteiro WM, et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(Suppl 1):4–11.
47. Adams JH, Mueller I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:9.

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

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXOS

Anexo I

Técnicas mais frequentemente utilizadas no diagnóstico da malária humana

Técnicas utilizadas no diagnóstico de malária			
	Microscopia Óptica	Testes Rápidos (imunocromatográficos)	Ensaio Molecular (PCR)
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixo custo ▪ Permite estimar a densidade parasitária ▪ Permite o monitoramento da resposta ao tratamento 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixo custo ▪ Fácil manuseio e transporte ▪ Resultados rápidos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alta sensibilidade e especificidade (<5 p/μl) ▪ Permite a detecção de coinfeções ▪ Permite análise quantitativa de DNA/RNA na amostra (carga parasitária)
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Difícil leitura de lâminas (requer microscopistas experientes) ▪ Baixa sensibilidade (20-100 p/μl) ▪ Casos frequentes de erros em infecções mistas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A maioria distingue apenas infecção por <i>P. falciparum</i> ▪ Não contempla coinfeções ▪ Baixa sensibilidade (>100 p/μl) ▪ Não determina a parasitemia ▪ Há possibilidade de falso-positivos e falso-negativos 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Custo elevado

Anexo II

Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas (protocolo N° 358.698/2013).

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/ CPQRR/</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: Avaliação de novos alvos moleculares para o diagnóstico de malária por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> pela PCR em Tempo Real								
Pesquisador: Luzia Helena Carvalho								
Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.								
Versão: 1								
CAAE: 19823113.1.0000.5091								
Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 358.698								
Data da Relatoria: 05/08/2013								
Apresentação do Projeto:								
O presente projeto visa a utilização de técnicas de biologia molecular para detectar infecções com baixa parasitemias por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i> , com diagnóstico diferencial.								
Objetivo da Pesquisa:								
Existe grande dificuldade para a detecção de malária em pacientes com baixas cargas parasitárias que muitas vezes são assintomáticos. O PCR em tempo real será feito com o uso de novos alvos moleculares para o diagnóstico da malária por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> .								
Avaliação dos Riscos e Benefícios:								
Os pacientes serão submetidos a punção digital para coleta de sangue e coleta de sangue com vacutainer que não causam grandes incômodos a estes. O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para detecção de infecções com baixas parasitemias será de grande importância clínica e epidemiológica.								
Benefícios:								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715</td> <td>CEP: 30.190-002</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Barro Preto</td> <td>Município: BELO HORIZONTE</td> </tr> <tr> <td>UF: MG</td> <td>Telefone: (31)3349-7825</td> </tr> <tr> <td>Fax: (31)3349-7825</td> <td>E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br</td> </tr> </table>	Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715	CEP: 30.190-002	Bairro: Barro Preto	Município: BELO HORIZONTE	UF: MG	Telefone: (31)3349-7825	Fax: (31)3349-7825	E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br
Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715	CEP: 30.190-002							
Bairro: Barro Preto	Município: BELO HORIZONTE							
UF: MG	Telefone: (31)3349-7825							
Fax: (31)3349-7825	E-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br							
<small>Página 01 de 02</small>								

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



Continuação do Parecer: 358.698

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

O projeto está bem apresentado e não necessita de recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências ou modificações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

BELO HORIZONTE, 13 de Agosto de 2013

Assinador por:
Naftale Katz
(Coordenador)

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

Anexo III

Documento de prorrogação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto René Rachou, FIOCRUZ-Minas (parecer N° 1.821.955).

<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ/ CPQRR/</p> </div> <div style="text-align: right;">  </div> </div>										
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
DADOS DA EMENDA										
<p>Título da Pesquisa: Avaliação de novos alvos moleculares para o diagnóstico de malária por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> pela PCR em Tempo Real</p> <p>Pesquisador: Luzia Helena Carvalho</p> <p>Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.</p> <p>Versão: 2</p> <p>CAAE: 19823113.1.0000.5091</p> <p>Instituição Proponente: Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPQRR/</p> <p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>										
DADOS DO PARECER										
<p>Número do Parecer: 1.821.955</p>										
<p>Apresentação do Projeto:</p> <p>Trata-se de estudo observacional e transversal dedicado ao desenvolvimento de novo protocolo de PCR em Tempo Real para o diagnóstico diferencial de malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>, por meio do desenho de iniciadores específicos, baseados em novos alvos moleculares dos plasmódios (Pvr47 e Pfr364).</p> <p>A pesquisadora responsável solicita emenda devido ao fato reações cruzadas durante a realização de diagnóstico molecular em parte da amostra de estudo, fazendo-se necessário ajuste da metodologia do protocolo de PCR em questão.</p>										
<p>Objetivo da Pesquisa:</p> <p>Padronizar um novo protocolo de PCR em Tempo Real para o diagnóstico diferencial de malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>, baseando-se em novos alvos moleculares.</p>										
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p> <p>O presente projeto oferece riscos mínimos ao paciente, já que as únicas técnicas utilizadas serão a punção digital (lancetas descartáveis) ou a coleta de sangue venoso (tubos a vácuo tipo vacutainer), realizadas por pessoal treinado.</p>										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715</td> <td>CEP: 30.190-002</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Barro Preto</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: MG</td> <td>Município: BELO HORIZONTE</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (31)3349-7825</td> <td>Fax: (31)3349-7825</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right;">E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br</td> </tr> </table>	Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715	CEP: 30.190-002	Bairro: Barro Preto		UF: MG	Município: BELO HORIZONTE	Telefone: (31)3349-7825	Fax: (31)3349-7825	E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br	
Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715	CEP: 30.190-002									
Bairro: Barro Preto										
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE									
Telefone: (31)3349-7825	Fax: (31)3349-7825									
E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br										
<small>Página 01 de 03</small>										

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



Continuação do Parecer: 1.821.855

Os benefícios resultantes deste projeto incluem: (1) validar a PCR como método auxiliar para esclarecer os casos de infecção duvidosa (sintomas presentes e exame microscópico negativo) e para o controle de cura; (2) auxiliar no diagnóstico de malária dos centros de referência da doença, particularmente, na região extra-amazônica, onde a mortalidade por malária tem sido grande devido à falta de diagnóstico específico; (3) identificação de indivíduos portadores assintomáticos da doença (estudos epidemiológicos), que são de grande importância para o controle da doença, já que constituem fonte de infecção para o mosquito vetor); (4) comparar diferentes métodos de PCR (nested, convencional e real-time), buscando identificar um protocolo mais adequado para casos de baixa parasitemia e infecção mista.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sem considerações adicionais.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A proposta inicial do projeto de pesquisa será modificada somente no cronograma de realização do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Após análise da emenda, constatamos que o plano do projeto não será modificado. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPqRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições a ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação da emenda da pesquisa proposta. Firma-se diante deste documento a necessidade de apresentação do relatório final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_699989 E1.pdf	03/10/2016 12:02:21		Aceito

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

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



Continuação do Parecer: 1.821.955

Outros	RelatorioParcial2016.pdf	03/10/2016 12:01:31	Luzia Helena Carvalho	Aceito
Outros	CartaEmendaSet2016.pdf	03/10/2016 11:57:47	Luzia Helena Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_PCR_Jul2016.pdf	03/10/2016 11:50:31	Luzia Helena Carvalho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROTOCOLO_PESQUISA_PCR_Set_2016.pdf	03/10/2016 11:40:24	Luzia Helena Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto de Projeto.pdf	13/08/2013 13:44:51		Aceito
Outros	Declaracao da UFMTmalaria[1].pdf	26/07/2013 14:09:17		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	18/07/2013 07:38:10		Aceito
Outros	Declaracao Malaria_UFMT1.doc	17/07/2013 16:08:10		Aceito
Outros	declaração_ZoonosisUberlandia.jpg	17/07/2013 16:07:52		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 16 de Novembro de 2016

Assinado por:
MARCELO PASCOAL
(Coordenador)

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

Anexo IV

Protocolo da NR-qPCR

Protocolo da NR-qPCR		
Alvos	Pvr47	Pfr364
Condições da reação de PCR		
Volume final	10 µL	10 µL
DNA <i>template</i>	2 µL	2 µL
Iniciadores (<i>forward / reverse</i>)	50 nM / 900 nM	900 nM / 300 nM
Sonda	250 nM	150 nM
Taqman Universal PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems)	5 µL	5 µL
Condições de ciclagem da PCR		
Passo inicial	50°C – 2 min	
	95°C – 10 min	
Desnaturação, anelamento e extensão	95°C – 15 seg	
	52°C – 1 min	
	60°C – 1 min	
Número de ciclos	40	
Plataforma	ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)	

Anexo V

Resultados discordantes entre os protocolos de diagnóstico molecular nas amostras de indivíduos com malária subclínica (n=79)

Amostra	18S rRNA		Pvr47/Pfr364		Positividade e concordância espécie, n/total (%)
	Nested-PCR	qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR	
RP0259 n=1	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>Pv+Pf</i>	4/4 (100%)*
RP0001	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	3/4 (75%)
RP0019	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	3/4 (75%)
RP0026	Neg	<i>Pv+Pf</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>Pv+Pf</i>	3/4 (75%)*
RP0281	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>P. falciparum</i>	3/4 (75%)*
RP245C	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	3/4 (75%)
RP273C	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	3/4 (75%)
RP600C	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>	3/4 (75%)
RP602C	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>	3/4 (75%)*
RP0007	Neg	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>	<i>Pv+Pf</i>	3/4 (75%)
RP0008	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP0059	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>Pv+Pf</i>	3/4 (75%)*
RP0108	Neg	<i>Pv+Pf</i>	<i>P. vivax</i>	<i>Pv+Pf</i>	3/4 (75%)*
RP0110	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP0120	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP0258	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP0279	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>Pv+Pf</i>	3/4 (75%)*
RP0324	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP0570	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP239B	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP553B	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP574B	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP333C	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP553C	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP573C	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP606C	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP607C	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP623C	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP729C	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
RP283D	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	<i>P. vivax</i>	3/4 (75%)
n=29					
RP0009	Neg	Neg	<i>P. falciparum</i>	<i>Pv+Pf</i>	2/4 (50%)*
RP0022	Neg	<i>P. falciparum</i>	Neg	<i>P. falciparum</i>	2/4 (50%)
RP0077	Neg	<i>P. falciparum</i>	Neg	<i>P. falciparum</i>	2/4 (50%)
RP0085	Neg	<i>Pv+Pf</i>	Neg	<i>Pv+Pf</i>	2/4 (50%)
RP0116	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0155	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0270	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0290	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0317	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0318	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0319	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0321	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP0430	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP237B	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP285B	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP420B	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP545B	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP573B	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP598B	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP251C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP284C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP308C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP420C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)

Continuação - Anexo V

Amostra	18S rRNA		Pvr47/Pfr364		Positividade e concordância espécie, n/total (%)
	Nested-PCR	qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR	
RP493C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP523C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP550C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP574C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP639C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
RP581D	<i>P. vivax</i>	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	2/4 (50%)
n=29					
RP623E	<i>P. falciparum</i>	Neg	Neg	Neg	1/4 (25%)
RP0322	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	Neg	1/4 (25%)
RP241C	Neg	<i>P. vivax</i>	Neg	Neg	1/4 (25%)
RP0016	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP0278	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP0309	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP0405	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP245B	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP550B	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP555B	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP218C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP253C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP277C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP285C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP555C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP571C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP598C	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP553D	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP506E	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
RP582E	Neg	Neg	Neg	<i>P. vivax</i>	1/4 (25%)
n=20					

Neg=resultado negativo para *Plasmodium*; Pv+Pf=deteção de *P. vivax* e *P. falciparum*. Os resultados foram expressos como número de positivos em relação ao total testado (porcentagem de positivos). Os asteriscos se referem a protocolos que concordaram em pelo menos uma espécie de *Plasmodium*.