

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

Abordagens no diagnóstico da malária: análise da variabilidade da proteína PfHRP2
e uso de métodos não invasivos de obtenção de DNA

por

Gabriel Luíz Costa

Belo Horizonte

2021

TESE

DCS-IRR

G. L. COSTA

2021

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

Abordagens no diagnóstico da malária: análise da variabilidade da proteína PfHRP2
e uso de métodos não invasivos de obtenção de DNA

por

Gabriel Luíz Costa

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Taís Nóbrega de Sousa

Coorientação: Dr. Antônio Augusto Pereira Júnior

Belo Horizonte

2021

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

C823a
2021

Costa, Gabriel Luíz.

Abordagens no diagnóstico da malária: análise da variabilidade da proteína PfHRP2 e uso de métodos não invasivos de obtenção de DNA / Gabriel Luíz Costa. – Belo Horizonte, 2021

XIV, 155 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 87-105

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do Título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Malária 2. Diagnóstico 3. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Título. II. Sousa, Taís Nóbrega de (Orientação). III. Pereira Júnior, Antônio Augusto (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Gabriel Luíz Costa

Abordagens no diagnóstico da malária: análise da variabilidade da proteína PfHRP2
e uso de métodos não invasivos de obtenção de DNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Banca Examinadora:

Dra. Taís Nóbrega de Sousa (IRR/FIOCRUZ) Presidente

Dra. Giselle Maria Rachid Viana (IEC/SVS/MS) Titular

Dra. Joseli de Oliveira Ferreira (IOC/FIOCRUZ) Titular

Dra. Lilian Lacerda Bueno (UFMG) Titular

Dr. Pedro Augusto Alves (IRR/FIOCRUZ) Titular

Dra. Lara Cotta Amaral (IRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 03/09/2021.

*Dedico este trabalho a
todos que sofrem com malária no mundo,
que possamos com nossos esforços auxiliar na liquidação de sua mazela.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Taís, por ter me acolhido como mentora e dividido seu conhecimento com muita atenção e cuidado. Serei eternamente grato por todos esses anos sob sua tutela, onde tive o privilégio de trabalhar com o que sempre sonhei.

À Dra. Cristiana, pelos conhecimentos compartilhados, auxiliando no aprimoramento de meus conhecimentos em Biologia Molecular.

À Dra. Luzia, pela liderança e auxílio no direcionamento de nossas pesquisas.

À Dra. Flora, por sempre estar disponível ao esclarecimento de nossas dúvidas.

Ao Dr. Antônio, por ter me recebido e auxiliado nos experimentos de PCR digital, além de aceitar o desafio de minha coorientação.

À Dra. Tatiana, por ter me acompanhado nos experimentos de PCR digital, pela experiência e conhecimento compartilhada, por toda paciência e ser um exemplo como cientista e ser humano.

Aos nossos colaboradores, Dra. Anna Caroline, Dr. Cor Fontes, Dr. Dhélio Batista, Dr. Jaime Louzada, pela disponibilidade e envio das amostras, tão cruciais na realização deste estudo.

À Plataforma de PCR em Tempo Real do IRR, em especial à Dra. Viviane, que sempre me recebeu com atenção, cordialidade, solicitude e muita paciência.

À Laura, Maria Eduarda, Carolina e Jade, que me ajudaram no amadurecimento em como ser um tutor e pelo companheirismo. Desejo a todas o melhor dos destinos.

À Denise, que sempre me auxiliou, desde meu ingresso no grupo de pesquisa, e que teve um papel importante na construção do presente trabalho. Você é um exemplo a ser seguido.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do IRR, pela oferta do curso de qualidade que tanto nos capacita para os desafios da ciência.

Às agências financiadoras CNPq, FAPEMIG e RSTMH pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não seria possível.

Por todos os trabalhadores no IRR, da portaria aos técnicos de laboratório, por ajudarem na segurança e manutenção dos espaços que utilizamos.

Aos colegas de laboratório, compartilhando momentos, experiências, alegrias, decepções, que nos só fez amadurecer como pessoas e cientistas. Desejo a todos muita perseverança e que possamos ter a alegria de trabalharmos juntos novamente.

À minha esposa, por ser minha âncora em todos os momentos onde quase desisti e por ser um exemplo de sucesso como cientista e ser humano.

A todos os amigos que fiz e passaram pelo laboratório, cada um me ensinando algo novo e compartilhando todas as conquistas.

RESUMO

A malária é uma doença febril aguda causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. O diagnóstico padrão-ouro é a microscopia óptica (MO), sendo também utilizados os testes rápidos de diagnóstico (RDT). Porém, tais métodos possuem baixo limite de detecção, cerca de 50 parasitos/ μ L na MO e 100 parasitos/ μ L no RDT. O diagnóstico com alvos moleculares e metodologias mais sensíveis é capaz de identificar as infecções com baixa densidade parasitária, mesmo em amostras não convencionais como a saliva. Outro fator crítico no diagnóstico de malária é a presença de isolados com deleção do gene que codifica a PfHRP2, proteína presente na maioria dos RDTs. Para suplementar essas limitações do diagnóstico da malária, este estudo teve como objetivo identificar o perfil de deleção e variabilidade do gene *pfhrp2*, assim como avaliar a performance de dois métodos moleculares, a PCR em tempo real (qPCR) e *Droplet Digital PCR* (ddPCR), na detecção de DNA do parasito obtido de amostras de sangue, saliva e swab de indivíduos expostos à malária. Uma proporção de 0% a 14,6% de amostras *pfhrp2* negativas foi observada nas regiões analisadas, sendo que apenas 1 amostra com deleção de *pfhrp2* foi negativa no teste com o RDT. Foram identificados 10 padrões da sequência de PfHRP2, exclusivos de cada região. As taxas de detecção da qPCR e ddPCR foram similares para amostras de sangue, 96 e 98,7%, e saliva, 72,4 e 75%, respectivamente. Porém, a ddPCR foi capaz de detectar 16% a mais de infecções no swab. Ainda assim, a concordância entre as duas técnicas em relação às amostras de swab foi baixa. Uma alta proporção de infecções mistas foi detectada no sangue e saliva. Este projeto se torna relevante na padronização de protocolos moleculares sensíveis a baixas parasitemias, utilizando fontes alternativas para obtenção de DNA, assim como no monitoramento das taxas de deleção e variabilidade do gene *pfhrp2*, fator importante na sensibilidade dos RDT utilizados no sistema de saúde.

PALAVRAS-CHAVE: malária; diagnóstico molecular; droplet digital PCR; saliva; variabilidade gênica; RDT

ABSTRACT

Malaria is an acute febrile disease caused by the protozoan of the genus *Plasmodium*. The gold standard malaria diagnosis is the light microscopy (LM), also being used the rapid diagnostic tests (RDT). However, such methods have a low limit of detection, around 50 parasites/ μ L in LM and 100 parasites/ μ L in RDT. The diagnosis using molecular targets and more sensitive methodologies is capable of identification of low parasite density infections, even in non-conventional samples, as saliva. Another critical factor in malaria diagnosis is the presence of isolates harboring the deletion of the gene that encodes the PfHRP2, protein present in most of RDTs. To supplement the limitations of malaria diagnosis, this study had as objective identify the deletion and variability profile of *pfhrp2* gene, as well as evaluate the performance of two molecular methods, Real-time PCR (qPCR) and Droplet Digital PCR (ddPCR), in detection of parasite DNA obtained from blood, saliva and buccal swab samples of individuals exposed to malaria. A proportion of 0% to 14,6% of *pfhrp2* negatives samples was observed in all regions analyzed, where only 1 sample with *pfhrp2* deletion was RDT negative. Ten PfHRP2 patterns were identified, exclusive in each region. The qPCR and ddPCR detection rates were similar to blood samples, 96 and 98,7%, and saliva, 72,4 and 75%, respectively. However, the ddPCR was capable of detection of 16% more infections in buccal swab samples. Nevertheless, the concordance between the two methods and the buccal swab samples was low. A high proportion of mixed infections was detected in blood and saliva. This study becomes relevant in the standardization of sensitive molecular protocols to low parasitemias, using alternative sources to obtain DNA, as well as in surveillance of *pfhrp2* deletion and variability rates, crucial factor in RDT sensibility.

Keywords: malaria; molecular diagnosis; droplet digital PCR; saliva; genetic variability; RDT

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência das espécies de <i>Plasmodium</i> no mundo.....	16
Figura 2: Número de casos de malária no Brasil no período de 1960-2015...	19
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> spp.....	22
Figura 4: Alinhamento da sequência dos alvos Pvr47 e Pfr364.....	29
Figura 5: Alinhamento de diferentes sequências do genoma mitocondrial de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	45
Figura 6: Frequência do perfil genético de <i>pfhrp2</i>	47
Figura 7: Distribuição de frequência dos padrões de sequências de PfHRP2	50
Figura 8: Diferentes padrões de PfHRP2 de diferentes estados do Brasil.....	51
Figura 9: Distribuição dos valores de Cq para as amplificações específicas e não específicas por ensaio.....	53
Figura 10: Gráfico de amplitude para o gradiente de temperatura de <i>P. falciparum</i>	57
Figura 11: Padronização da ddPCR para o alvo Pfr364.....	58
Figura 12: Padronização do ensaio Pvr47.....	59
Figura 13: Quantificação dos ensaios Pfr364 e Pvr47 pela qPCR.....	60
Figura 14: Gráfico de dispersão para os valores de Cq obtidos na qPCR...	67
Figura 15: Comparação dos resultados de sangue, saliva e swab.....	68
Figura 16: Gráfico de densidade por amostra.....	69
Figura 17: Comparação dos resultados da qPCR e ddPCR.....	71
Figura 18: Análise de correlação entre as faixas de parasitemia.....	73
Figura 19: Concordância da densidade parasitária entre MO e qPCR.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo dos dados dos indivíduos incluídos neste estudo.....	35
Tabela 2: Alvos mitocondriais para <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	38
Tabela 3: Sequência dos alvos Pvr47 e Pfr364.....	39
Tabela 4: Equivalente do volume de sangue utilizado no diagnóstico molecular.....	42
Tabela 5: Análise do perfil de deleção do gene <i>pfhrp2</i>	46
Tabela 6: Perfis de deleção encontrados para <i>pfhrp2</i>	46
Tabela 7: Multiplicidade de infecção e diversidade genética das populações de <i>P. falciparum</i>	48
Tabela 8: Frequência alélica dos 3 microssatélites de <i>P. falciparum</i>	49
Tabela 9: Tipos e quantidade de repetições no gene <i>pfhrp2</i>	50
Tabela 10: Frequência dos padrões PfHRP2 na América do Sul.....	52
Tabela 11: Resumo dos dados para cada ensaio dos alvos mitocondriais..	55
Tabela 12: Limite de detecção de <i>P. vivax</i> na qPCR por plasmídeo.....	62
Tabela 13: Limite de detecção utilizando amostras clínicas de <i>P. vivax</i>	62
Tabela 14: Limite de detecção do ensaio Pfr364 por plasmídeo.....	63
Tabela 15: Limite de detecção com amostras clínicas de <i>P. falciparum</i>	63
Tabela 16: Limite de detecção do ensaio Pvr47 de <i>P. vivax</i> na ddPCR.....	65
Tabela 17: Limite de detecção para cada amostra clínica para o Pfr364.....	65
Tabela 18: Resultados da microscopia óptica e qPCR no sangue.....	66
Tabela 19: Resultado das amostras de sangue e saliva na qPCR.....	68

Tabela 20: Determinação da sensibilidade e especificidade dos ensaios Pvr47 e Pfr364.....	70
--	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AMA-1** – Antígeno 1 de Membrana Apical
- CAP** – *Contig Assembly Program*
- Cq** – *Quantification Cycle*
- ddNTP** – *di-deoxynucleotidetriphosphates*
- ddPCR** – *droplet digital polymerase chain reaction*
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – *Desoxiribonucleic Acid*
- dNTP** – deoxynucleotidetriphosphates
- EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético
- g** – Força centrífuga em medida da gravidade da Terra
- HRP** – *histidine-rich protein*
- HRP2** – *histidine-rich protein 2*
- HRP 3** – *histidine-rich protein 3*
- IC** – Intervalo de confiança
- IDT** – *Integrated DNA Technologies*
- IPA** – Incidência Parasitária Anual
- IPTG** - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
- LB** – Luria Bertoni
- LOB** – Limite de Branco
- mg** – mili gramas
- MIQE** – Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
- mL** – mili litros
- mM** – mili molar
- MO** – Microscopia óptica
- MOI** – Multiplicidade de infecção
- NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*
- ng** – nano gramas
- nM** – nano molar
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- pb** – Pares de base
- PBS** – *phosphate buffered saline*

PCR – *polymerase chain reaction*

pfhrp2 – *Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2*

pfhrp3 – *Plasmodium falciparum histidine-rich protein 3*

pLDH – *Plasmodium lactate dehydrogenase*

qPCR – *quantitative polymerase chain reaction*

RDT – *rapid diagnostics tests*

RFU – Unidades de fluorescência relativa

rFU – Unidades arbitrárias de fluorescência

RNA – *ribonucleic acid*

ROC – *Receiver operating characteristic*

rpm – *rotation per minute*

SD – Desvio padrão

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

μL – Microlitro

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Características gerais da malária.....	15
1.2 Malária no Brasil.....	19
1.3 Ciclo biológico dos parasitos da malária humana.....	21
1.4 Diagnóstico laboratorial da malária humana.....	22
1.4.1 Microscopia óptica e testes rápidos de diagnóstico.....	23
1.4.1.1 Deleção dos genes <i>pfhrp2</i> e <i>pfhrp3</i> em <i>Plasmodium falciparum</i>	24
1.4.2 Detecção molecular dos parasitos da malária.....	25
1.4.2.1 Uso da PCR digital.....	26
1.4.2.2 Alvos não ribossomais para o diagnóstico molecular da malária por <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	28
1.4.2.3 O DNA obtido de saliva como alternativa para o diagnóstico molecular da malária.....	30
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 Área e população de estudo.....	35
4.2 Diagnóstico Microscópico.....	35
4.3 Diagnóstico Molecular.....	36
4.3.1 Extração de DNA de sangue total, saliva total e swab bucal.....	36
4.3.2 Desenho de iniciadores e sondas para o alvo mitocondrial.....	38
4.3.3 Utilização dos iniciadores e sondas para os alvos Pvr47 e Pfr364.....	39
4.3.4 Padronização da qPCR e ddPCR para os alvos mitocondriais e não ribossomais.....	40
4.3.4.1 Definição do Limite de Branco para os ensaios de ddPCR.....	41
4.3.5 Determinação do Limite de detecção (LOD) e ensaio de quantificação de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	42
4.4 Análise da variabilidade genética de <i>pfhrp2</i>	43
4.5 Diversidade genética das populações de <i>P. falciparum</i>	43

4.6 Análises Estatísticas.....	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Determinação do perfil de deleção de <i>pfhrp2</i>	45
5.2 Diversidade genética das populações de <i>P. falciparum</i>	47
5.3 Variabilidade das sequências de <i>pfhrp2</i>	49
5.4 Padronização dos protocolos moleculares para amplificação dos alvos mitocondriais.....	52
5.4.1 Padronização da qPCR para os alvos mitocondriais.....	52
5.4.2 Padronização da ddPCR para os alvos mitocondriais.....	58
5.5 Padronização dos protocolos moleculares para amplificação dos alvos nucleares não ribossomais.....	60
5.5.1 Padronização da ddPCR.....	60
5.6 Limite de detecção dos alvos Pvr47 e Pfr364.....	62
5.6.1 Limite de detecção na qPCR.....	62
5.6.2 Limite de detecção na ddPCR.....	64
5.7 Detecção de <i>Plasmodium</i> através de DNA obtido de sangue, saliva e swab pela qPCR.....	67
5.8 Comparação do diagnóstico molecular pela qPCR e ddPCR.....	72
5.9 Determinação da densidade parasitária por qPCR.....	73
6 DISCUSSÃO.....	76
6.1 Estudo de variabilidade genética das proteínas utilizadas nos RDT.	76
6.2 Desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico de malária.....	80
7 REFERÊNCIAS.....	87
8 APÊNDICES.....	106

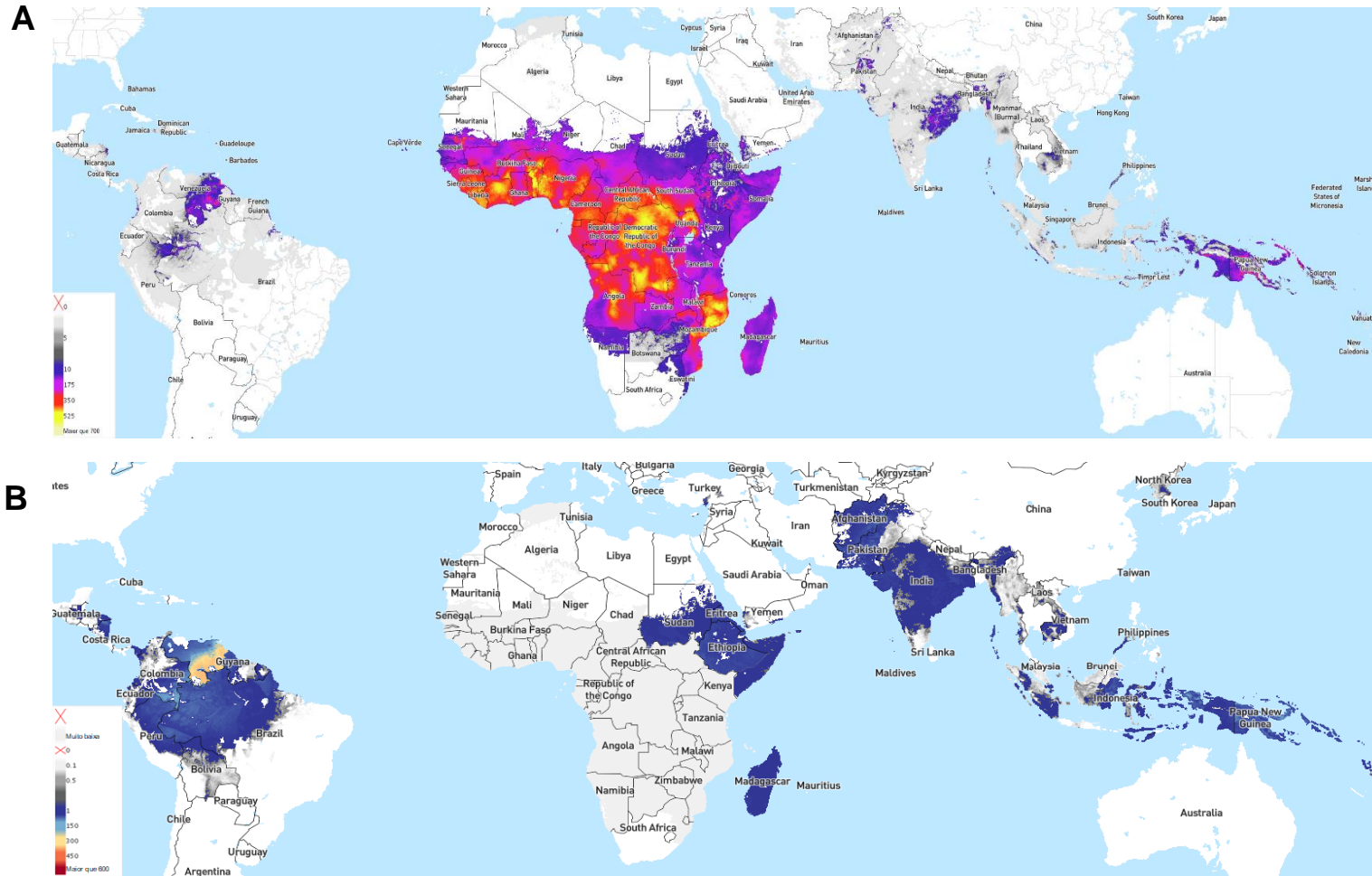
1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da malária

A malária é a doença parasitária de maior letalidade, prevalente em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019 foram estimados cerca de 229 milhões de casos ao redor do mundo, resultando em 409.000 mortes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). A malária é causada por parasitos do gênero *Plasmodium*, sendo cinco espécies causadoras da doença no humano: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*, transmitidos pela picada da fêmea do mosquito vetor do gênero *Anopheles* spp. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Plasmodium falciparum e *P. vivax* são responsáveis por mais de 95% dos casos de malária humana. *Plasmodium falciparum* é a espécie mais prevalente no continente Africano, além de ser responsável pelo maior número de casos e por grande parte dos casos graves da doença e óbitos de malária, enquanto *P. vivax* é a espécie mais prevalente fora deste continente (Figura 1). Nas Américas e na Ásia, as infecções por *P. vivax* correspondem a 74,1% dos casos reportados (BATTLE et al., 2019; WEISS et al., 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Ainda assim, o número de casos de malária vem diminuindo em diferentes regiões do mundo, resultado da adoção de métodos de diagnóstico eficazes, tratamento eficiente dos pacientes e o uso de mosquiteiros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). Entretanto, existem desafios no combate à malária como a diminuição dos financiamentos para o combate à doença em países endêmicos, a contínua emergência de parasitos resistentes aos antimaláricos e a resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Figura 1. Incidência das espécies de *Plasmodium* no mundo. Incidência de casos de **(A)** *P. falciparum* e abaixo, os casos de **(B)** *P. vivax*, ambos em uma escala de 1.000 pessoas por ano. The Malaria Atlas Project, 2021.



Disponível em: <https://malariaatlas.org>. Acesso em 19/07/2021.

Atualmente não existe uma vacina para prevenção da malária, conseqüentemente, seu tratamento e profilaxia são feitos por meio das drogas antimaláricas. Entretanto, um dos maiores desafios no controle da doença é o desenvolvimento da resistência aos antimaláricos pelo *Plasmodium*, sendo presente em praticamente todas as áreas endêmica. No Brasil, a resistência em *P. falciparum* já foi descrita para diversos antimaláricos já utilizados em esquemas de tratamento recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). A utilização da terapia baseada nos derivados da artemisinina é o tratamento preconizado atualmente pela OMS, consistindo na primeira linha terapêutica para malária por *P. falciparum* em todas as áreas endêmicas do mundo (GAMA et al., 2011). Entretanto, indícios de resistência a este tratamento já foram relatados em diferentes países asiáticos (DONDORP et al., 2017; MENARD; DONDORP, 2017). Para *P. vivax*, o tratamento com cloroquina juntamente com primaquina ainda é eficaz. Nos últimos anos, relatos de resistência à cloroquina por *P. vivax* aumentaram, mas a compreensão de seus mecanismos é dificultada devido à falta de marcadores de resistência robustos, dificuldade do estudo molecular desta espécie, devido à dificuldade da manutenção de um cultivo contínuo, e a possibilidade de recidiva da doença devido a formas latentes do parasito no fígado, os hipnozoítos (CHEHUAN et al., 2013; DE SANTANA FILHO et al., 2007; MARQUES et al., 2014).

Além da resistência aos antimaláricos, a presença dos hipnozoítos nas infecções de *P. vivax* também torna seu controle um desafio. Isso porque essas formas do parasito tornam os indivíduos infectados potenciais reservatórios da doença para os mosquitos vetores e contribuem para um maior tempo de infecção, mesmo com a administração dos medicamentos específicos (GETHING et al., 2012). O mesmo se dá pela sua capacidade de produzir gametócitos (forma infectante do parasito para o mosquito) precocemente, mesmo antes do tratamento ser iniciado, possibilitando a infecção de mosquitos vetores (HOWES et al., 2016).

Um grande desafio no diagnóstico da malária é a presença de infecções assintomáticas subpatentes, caracterizadas pela presença de formas sexuais e assexuais em baixas parasitemias, e a ausência dos sintomas clínicos da doença. Estas infecções podem ocorrer pela aquisição de imunidade ao *Plasmodium*, geralmente em residentes de áreas endêmicas, com níveis diferentes entre crianças

e adultos ou como parasitemia residual ou recrudescente após um tratamento mal sucedido (BOUSEMA et al., 2014; LINDBLADE et al., 2013; OKELL et al., 2012).

De forma geral, as infecções por *P. vivax* são mais frequentemente caracterizadas como assintomáticas. Estudos realizados nas Ilhas Salomão e no Brasil evidenciaram uma frequência de assintomáticos igual a 97% e 93%, respectivamente, em infecções por *P. vivax* (ALVES et al., 2002; HARRIS et al., 2010). Porém, *P. falciparum* também pode apresentar uma frequência elevada de casos assintomáticos com parasitemias subpatentes, como demonstrado no estudo de Hoyer e colaboradores (2012), onde 92% dos casos eram assintomáticos quando comparado com *P. vivax* (83%) (HOYER et al., 2012).

Eventualmente, infecções assintomáticas podem se tornar sintomáticas. Porém, os pacientes assintomáticos podem persistir por um longo período de tempo, tendo sido relatada persistência por décadas da infecção assintomática por *P. malariae* em imigrantes fora de área endêmica (BERECZKY et al., 2004; FRADEJAS et al., 2019; MAGESA et al., 2002; VINETZ et al., 1998). Identificar estes indivíduos é de suma importância para o controle da malária, uma vez que servem como reservatórios do *Plasmodium*, permitindo a manutenção da doença. A densidade dos gametócitos têm papel importante na determinação da infectividade do mosquito transmissor durante seu repasto sanguíneo e diferentes estudos já demonstraram que mesmo densidades baixas como 5 gametócitos/ μ L são capazes de infectar os vetores (ALVAR et al., 2020; ALVES et al., 2006; BOUSEMA et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2007; WHITE, 2008). Em uma infecção subpatente, espera-se uma densidade similar a esta, cuja microscopia óptica (MO) e os testes rápidos de diagnóstico (*Rapid Diagnostics Tests* – RDTs) não são capazes de detectar (KAVANAUGH; AZZAM; ROCKABRAND, 2021).

O diagnóstico realizado em áreas endêmicas ou em estudos de campo é feito através da MO e RDT, técnicas que possuem baixo limite de detecção. Uma revisão da literatura publicada por Okell e colaboradores reportou uma falha de 50,8% na detecção de infecção por *Plasmodium* pela microscopia, quando comparado aos métodos moleculares, sendo essa diferença ainda maior em regiões de baixa transmissão (OKELL et al., 2009). Esta falha na detecção de pacientes assintomáticos é também esperada para os RDTs. Uma vez que é importante a identificação destes

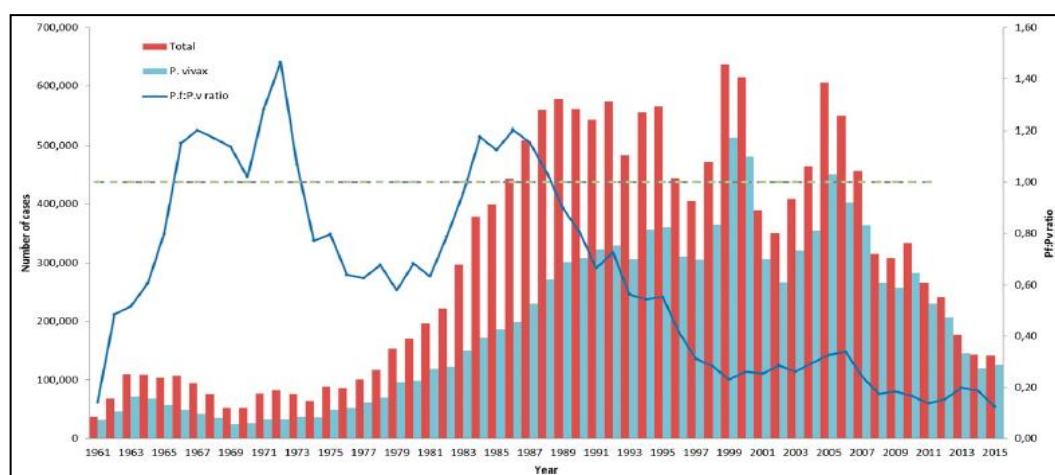
casos, uma ferramenta sensível capaz de diagnosticar e quantificar o parasito é necessária.

1.2 Malária no Brasil

No Brasil, as principais espécies de *Plasmodium* que causam a doença no homem são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Em 2020, 140.974 casos foram registrados no Brasil, sendo 22.182 (15,8% do total de casos) de casos de *P. falciparum*, representando um aumento de 32,6% em relação a 2019, e 118.651 (84,2% do total de casos) casos de *P. vivax*, uma redução de 13,2% em relação ao ano anterior (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

No início dos anos 2000, o país contava com aproximadamente 637 mil casos de malária, sendo o maior registro de casos no Brasil desde os anos 60, número que foi reduzido para cerca de 142 mil casos em 2015, graças ao programa *Roll Back Malaria Initiative* junto a esforços do governo federal brasileiro e iniciativas locais (Figura 2) (SIQUEIRA et al., 2016). Porém, mesmo com a diminuição dos casos, ainda há constante transmissão da malária na região da Amazônia devido à falta de condições sanitárias apropriadas e uma situação socioeconômica e política instável.

Figura 2. Número de casos de malária no Brasil no período de 1960-2015. As barras vermelhas se referem ao número total de casos e as barras em azul aos casos de *P. vivax*, correspondente ao eixo Y à esquerda do gráfico. A linha de tendência azul escura se refere à razão *P. falciparum*:*P. vivax*, eixo Y à direita do gráfico.



Fonte: Siqueira et al., 2016.

Aproximadamente 0,5% dos casos de malária registrados no Brasil são oriundos da região extra-amazônica. Destes, 80% são importados de estados da área

endêmica (376 casos, 50,9% dos casos importados), ou importados de outros países da África, países asiáticos e sul-americanos (363 casos, 49,1%) (PINA-COSTA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2016). Tais números são consequência da baixa incidência de malária nessas regiões, o que dificulta o diagnóstico da doença devido à falta de profissionais treinados e estrutura adequada para a detecção de malária. É importante salientar que, em 2019, 4.117 casos de malária importados de outros países foram registrados, principalmente de países da América do Sul, como a Venezuela com 2.658 casos (64,6%), Guiana Inglesa com 655 casos (15,9%) e Guiana Francesa com 236 casos (5,7%). De janeiro a junho de 2020, 1.049 casos importados de outros países já haviam sido reportados, com maior ocorrência nos estados de Roraima e Amazonas com 60,7% e 14,3% do total de casos, respectivamente (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais foram responsáveis por 57% dos casos autóctones no Brasil (932 casos) em 2014, sendo que o Espírito Santo teve a maior taxa (321 casos) e Minas Gerais, a menor (6 casos) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; PINA-COSTA et al., 2014). Em 2020, o número de casos reduziu para 30 (96,8% menor, quando comparado à 2014). No mesmo período, o número de casos diminuiu para 0 no Espírito Santo e o estado na região extra-amazônica com maior número de casos foi São Paulo (10 casos), seguido do Mato Grosso do Sul com 6 casos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Nos últimos anos a importância da malária em áreas de Mata Atlântica vem aumentando. Suas características ecológicas são ideais para a reprodução de algumas espécies do mosquito vetor, como, por exemplo, os vetores do subgênero *Kerteszia*, capazes de realizar o repasto sanguíneo em humanos e primatas não humanos (F. DOMINGOS; TUBAKI; DI SANTI, 2006; GUIMARÃES et al., 2003). Mais de 1.000 casos foram notificados, entre 2007 a 2016, atribuídos a *P. vivax* e *P. simium* (PINA-COSTA et al., 2014). Nos últimos anos, vêm aumentando os relatos de transmissão zoonótica, sendo os primatas não humanos reservatórios de espécies de *Plasmodium* e capazes de infectar o humano, como *P. simium* e *P. brasilianum* (DE ALVARENGA et al., 2015, 2018).

1.3 Ciclo Biológico dos parasitos da malária humana

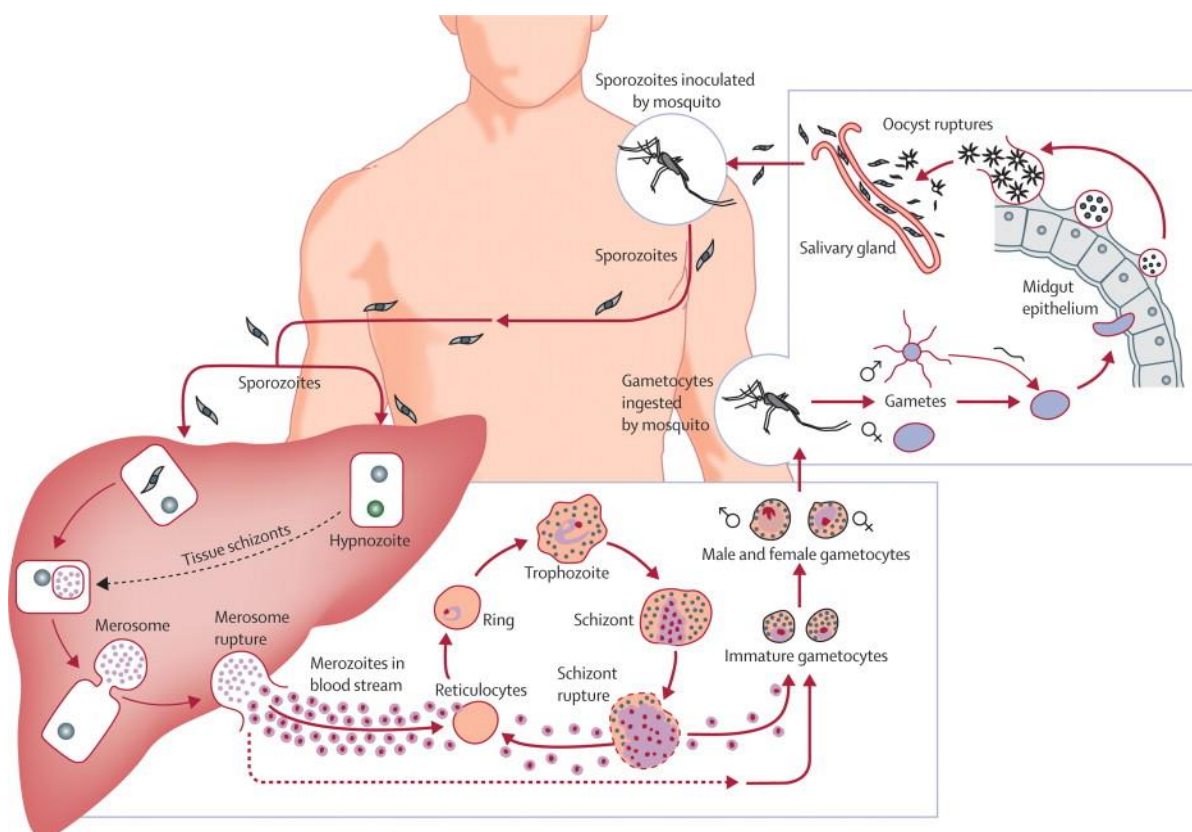
O ciclo biológico do *Plasmodium* inicia-se pela inoculação de esporozoítos na pele durante a picada do mosquito vetor do gênero *Anopheles* spp. durante seu repasto sanguíneo (Figura 3). Aproximadamente 50% destes esporozoítos podem permanecer na pele do hospedeiro e cerca de 10% desenvolver-se na epiderme, derme e folículos pilosos, sobrevivendo durante semanas nestes locais (GUEIRARD et al., 2010; MENARD et al., 2013). Atingindo a corrente sanguínea e migrando para o fígado, o parasito invade vários hepatócitos antes de estabelecer infecção em um deles, sendo esse processo importante para seu ciclo de vida, uma vez que o torna mais apto à invasão. Dentro do hepatócito é formado o vacúolo parasitóforo, local onde o parasito se desenvolve e se multiplica (MOTA et al., 2001). Após se desenvolverem nos hepatócitos por esquizogonia, os merozoítos liberados são capazes de infectar eritrócitos maduros ou os reticulócitos, a forma mais jovem desta célula. Esses merozoítos são liberados diretamente na corrente sanguínea no interior de vesículas denominadas merossomos (STURM; MENARD; HEUSSLER, 2006).

Os eritrócitos são invadidos a partir do reconhecimento e ligação dos merozoítos a estas células. No vacúolo parasitóforo, o parasito passa por diferentes fases: anel, trofozoíto e esquizonte. A partir dos esquizontes, novos merozoítos são formados e liberados com o rompimento dos eritrócitos, e em seguida infectam novas células (BANNISTER; MITCHELL, 2003). Alguns destes merozoítos se diferenciam em gametócitos masculino e feminino, que, ao serem ingeridos pelo mosquito vetor, se diferenciam nos gametas masculino e feminino. Uma vez no mosquito, o parasito passa por uma série de transformações, desenvolvendo-se em esporozoítos, que podem ser inoculados em outro hospedeiro após invadirem as glândulas salivares durante um novo repasto sanguíneo (MUELLER et al., 2009).

Diferente das demais espécies de *Plasmodium*, *P. vivax* possui características particulares em seu ciclo de vida: (1) o gametócito surge precocemente na circulação sanguínea, tornando a transmissão possível antes mesmo do aparecimento dos sintomas clínicos; (2) baixas parasitemias e infecções assintomáticas tornando os indivíduos portadores reservatórios do parasito; (3) desenvolvimento dos hipnozoítos no fígado, podendo permanecer latentes neste órgão por intervalo de tempo variável e podem levar a recaídas da doença e (4) os merozoítos tem preferência pela invasão

dos reticulócitos (GALINSKI et al., 1992; IMWONG et al., 2016; MUELLER et al., 2009; WHITE, 2017).

Figura 3. Ciclo de vida do *Plasmodium* spp. Durante o repasto sanguíneo da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* spp., é realizada a inoculação do *Plasmodium* spp. na forma de esporozoítos. Após a inoculação, uma porcentagem dessa forma fica retida na pele do hospedeiro, e outra segue em direção ao fígado. Os esporozoítos infectam os hepatócitos, onde se desenvolvem em merozoítos, que rompem estas células e caem na corrente sanguínea, podendo infectar novamente os eritrócitos e reticulócitos.



Fonte: Adaptado de Mueller *et al.*, 2009.

1.4 Diagnóstico Laboratorial da malária humana

O diagnóstico e tratamento da malária são componentes fundamentais na sua estratégia de controle e eliminação. Medidas efetivas de diagnóstico são cruciais na prevenção do agravamento da doença no paciente, assim como na redução da possibilidade deste em contribuir para a manutenção da transmissão da malária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). A identificação do parasito antes da administração de antimaláricos é necessária, pois o diagnóstico clínico por si só é duvidoso, podendo acarretar em tratamento errôneo, levar à resistência do parasito

aos antimaláricos e a complicações da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

1.4.1 Microscopia Óptica e Testes Rápidos de Diagnóstico

O diagnóstico da malária é realizado, majoritariamente, utilizando a técnica de gota espessa de sangue, corada por Giemsa, sendo preconizada pelo Ministério da Saúde. Do mesmo modo, o diagnóstico pode ser realizado por esfregaço sanguíneo, e a utilização de cada metodologia depende do objetivo do microscopista, tendo cada uma suas vantagens e desvantagens (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). A estimativa da parasitemia utilizando a MO se baseia na definição semiquantitativa de “cruzes”, definido de acordo com a contagem de parasitos por campo observado no microscópio. Esta estimativa parte da visualização de 1 parasito por campo (uma cruz) a mais de 200 parasitos (quatro cruzes), sendo que a sensibilidade da microscopia pode chegar de 20 a 100 parasitos/ μ L de sangue (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009; GREENWOOD; ARMSTRONG, 1991; SÁ et al., 2005).

Mesmo considerada como padrão ouro de diagnóstico, a MO possui limitações, como a dependência de energia elétrica e necessidade de um treinamento intensivo dos microscopistas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Tais limitações reforçam a necessidade da busca por metodologias mais sensíveis e confiáveis. Não raro, infecções mistas são diagnosticadas incorretamente, principalmente quando em concomitância com *P. falciparum*, que normalmente possui uma alta densidade parasitária (KILIAN et al., 2000). Além disso, indivíduos com parasitemias subpatentes podem continuar atuando como reservatórios da doença, uma vez que são detectados somente por metodologias mais sensíveis (VALLEJO et al., 2016; WAMPFLER et al., 2013).

Em adição à MO, os ensaios imunocromatográficos são utilizados devido sua facilidade de uso (resultados rápidos, entre 15 e 20 minutos) quando o diagnóstico pela microscopia não é acessível, como por exemplo em áreas remotas ou na falta de um profissional treinado. Os RDTs apresentam a vantagem de não requerer fonte de eletricidade, sendo ideal para estudos de campo. Estes testes são capazes de detectar antígenos específicos de *Plasmodium* presentes na corrente sanguínea da pessoa infectada, sendo que alguns deles são capazes de diagnosticar apenas uma

espécie (*P. falciparum*), através da detecção de HRP2 ou da proteína gênero específica lactato desidrogenase de *Plasmodium* (*pLDH*) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Um limite de detecção de 62 parasitos/ μL , similar à MO, para os RDTs já foi reportado no trabalho de Lee e colaboradores (2006) (LEE et al., 2006a). Porém, esta sensibilidade pode variar de acordo com a marca do produto e ainda assim, para a maioria dos RDTs disponíveis ainda há a limitação do baixo limite de detecção (>100 parasitos/ μL), quando comparado à microscopia ($>20-100$ parasitos/ μL) ou aos métodos moleculares, como a PCR ($>0,5$ a 5 parasitos/ μL) (CORDRAY; RICHARDS-KORTUM, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

1.4.1.1 Deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em *Plasmodium falciparum*

A presença das proteínas da família HRP em *P. falciparum* foi descrita nos anos 80 e desde o desenvolvimento dos RDTs nos anos 90, a proteína HRP2 tem sido utilizada como alvo de diagnóstico (HOWARD et al., 1986; ROCK et al., 1987; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Composta principalmente por repetições de histidina e alanina, ela é produzida durante todos os estágios do ciclo de vida do parasito, e diferentes estudos já demonstraram sua persistência na corrente sanguínea após a resolução da parasitemia e desaparecimento dos sintomas clínicos da malária (KAIN et al., 1997; LAFERI; KANDEL; PICHLER, 1997; MILLER et al., 1994).

A sensibilidade dos RDTs depende diretamente da detecção da proteína na corrente sanguínea do indivíduo infectado. Entretanto, no início dos anos 2000, isolados com deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* começaram a ser reportados na África e América do Sul (BAKER et al., 2005, 2010; GAMBOA et al., 2010; HOUZÉ et al., 2011). No Brasil, dois estudos avaliaram até o momento o perfil de deleção destes genes, evidenciando a deleção de *pfhrp2* em isolados dos estados do Acre (31,2%) e Rondônia (3,3%) de acordo com o trabalho de Viana e colaboradores (2017), e 71,7% no estado do Acre e 100% no Amazonas, de acordo com o trabalho de Góes e colaboradores (2021) (GÓES et al., 2021; RACHID VIANA et al., 2017). Em outros estudos realizados na América do Sul, taxas similares foram encontradas no Peru por Gamboa e colaboradores (2010) (41%) e Matlha e colaboradores (2012) (25,7%) (GAMBOA et al., 2010; MALTHA et al., 2012). Entretanto, menores taxas de deleção

foram reportadas na Colômbia por Solano e colaboradores (2015) (18%) e Dorado e colaboradores (2012) (5,5%) (DORADO; MURILLO; MONTENEGRO, 2012; MURILLO SOLANO et al., 2015; OKOTH et al., 2015; TROUVAY et al., 2013). A deleção de *pfhrp2* não foi reportada na Guiana Francesa, como observado nos estudos de Trouvay e colaboradores (2013) e Okoth e colaboradores (2015) (OKOTH et al., 2015; TROUVAY et al., 2013).

O conteúdo de histidina das proteínas HRP2 e HRP3 é bastante similar (34% e 28%, respectivamente), contando com diferentes tipos de repetição de histidina e alanina em sua composição (ROCK et al., 1987). O gene *pfhrp2* está localizado no cromossomo 8 e o gene *pfhrp3*, no cromossomo 13, ambos em regiões subtelo méricas de seus respectivos cromossomos. O conteúdo similar destes aminoácidos contribui para que anticorpos anti-HRP2 também detectem a proteína HRP3 (SHARMA, 1988; WELLEMS; HOWARD, 1986), de maneira que a HRP3 também contribui para o diagnóstico de *P. falciparum* pelo RDT, entretanto, somente em altas parasitemias. Após um estudo extensivo do Programa de Garantia da Qualidade dos RDTs de Malária, foi descoberta uma grande variação na sequência dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em isolados de países asiáticos e do sudoeste do Pacífico (AKBULUT; CELIK; TURGUT BALIK, 2005; BAKER et al., 2005; LEE et al., 2006b; TURGUT-BALIK et al., 2004). Entretanto, ainda não está claro qual a influência dessa variabilidade gênica nos resultados dos RDTs (ATROOSH et al., 2015; BAKER et al., 2010; KUMAR et al., 2012; WILLIE et al., 2018).

1.4.2 Detecção Molecular dos parasitos da malária

A necessidade de diagnósticos mais sensíveis levou ao desenvolvimento de diferentes métodos moleculares visando, principalmente, a detecção de baixas parasitemias, identificação de pacientes assintomáticos e quantificações mais precisas da carga parasitária (KAMAU et al., 2013; ROSANAS-URGELL et al., 2010; TRAN et al., 2014). Entre esses métodos se encontram a PCR convencional. Atualmente, o protocolo molecular comumente utilizado para a malária humana é a *nested* PCR, consistindo em duas rodadas de amplificação do gene ribossomal 18S, sendo a primeira gênero-específica e a segunda, espécie-específica (SNOUNOU et al., 1993). Estas duas rodadas de amplificação garantem uma maior sensibilidade a este protocolo, porém, o torna ao mesmo tempo um processo demorado, além de

aumentar a possibilidade de contaminação devido à manipulação do material genético amplificado na primeira rodada.

Outra técnica utilizada é a PCR em tempo real (*Quantitative Polymerase Chain Reaction* - qPCR), capaz de quantificar a carga parasitária utilizando uma curva-padrão de amostras com parasitemia previamente definida pela microscopia ou DNA plasmidial contendo o alvo desejado. A qPCR é mais precisa que a PCR convencional, permitindo a possibilidade de quantificação precisa da carga parasitária, alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (KAMAU et al., 2013). Esta técnica foi usada para o diagnóstico de malária pela primeira vez em 1990, mas somente nos anos 2000 seu uso se tornou mais constante (HERMSEN et al., 2001; JAUREGUIBERRY et al., 1990; LEE et al., 2002; MANGOLD et al., 2005; MURPHY et al., 2012; ROUGEMONT et al., 2004b). Entretanto, alguns estudos mostram que a sensibilidade da técnica depende de vários fatores, tais como a quantidade do DNA alvo, contaminantes do processo de extração e quantidade de DNA humano (PROUX et al., 2011).

1.4.2.1 Uso da PCR digital

Nos anos 1990, foi desenvolvido o conceito da PCR digital, mas somente nos últimos anos essa tecnologia vem sendo aprimorada, sendo altamente sensível para detecção e quantificação absoluta de patógenos (BAKER, 2012; WILSON et al., 2015). Ela consiste na amplificação do DNA particionado milhares de vezes contendo pelo menos uma cópia do alvo e oferece vantagens como: (1) quantificação absoluta na ausência de uma curva-padrão; (2) maior sensibilidade devido à micropartição da amostra; (3) poder ser realizada com baixas concentrações de DNA e; (4) ser menos sensível a inibidores frequentemente presentes em amostras de DNA extraídas de sangue total (HUGGETT et al., 2013; HUGGETT; COWEN; FOY, 2015).

Atualmente existem dois sistemas distintos de PCR digital: a primeira consiste em um microchip que possui milhares de câmaras microfluídicas onde a amostra é disposta; a segunda é baseada em emulsificação, onde os alvos são amplificados em microgotas, separadamente (HINDSON et al., 2011; MORRISON et al., 2006; WARREN et al., 2006). Esta última, conhecida como *droplet digital PCR* (ddPCR), se baseia na tecnologia microfluídica, onde a solução é particionada em milhares de

gotas compostas por uma superfície oleosa e um núcleo aquoso, onde se encontram os reagentes da PCR e o material genético a ser amplificado. Diferentemente das demais técnicas de PCR que se baseiam na análise final a partir de microlitros de reação, a análise da ddPCR é realizada através da leitura de cerca de 20.000 microgotas de aproximadamente 1 nanolitro (MAZAIKA; HOMSY, 2014).

A ddPCR possui vantagens em relação à qPCR como a possibilidade de quantificação absoluta sem necessidade de construção de uma curva-padrão, maior precisão e reprodutibilidade, além de ser mais resistente à inibidores comuns da PCR (MAZAIKA; HOMSY, 2014). Hindson e colaboradores (2013) avaliaram o desempenho da ddPCR digital e qPCR em quantificar pequenos oligonucleotídeos usados para simular microRNAs humanos em diferentes matrizes: água e plasma. Foi observada uma maior precisão na quantificação destes alvos pela ddPCR, em ambas matrizes (HINDSON et al., 2013). Estes dados se unem a outros estudos que também observaram maior sensibilidade desta técnica (SILLENCE et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Porém, outros dados sugerem que as duas técnicas possuem sensibilidades similares (HAYDEN et al., 2013; TE; CHEN; GIN, 2015).

A ddPCR já é amplamente usada para quantificação absoluta em diferentes áreas de estudo como câncer, doenças virais humanas e animais, bactérias e protozoários, mostrando alta sensibilidade e precisão (HAYDEN et al., 2013; MU et al., 2015; ROBERTS et al., 2013; TAKESHITA et al., 2015; WANG et al., 2015; WILSON et al., 2015). Entretanto seu uso na malária está limitado a poucos trabalhos.

O número de trabalhos que faz uso da ddPCR para a detecção do *Plasmodium* vem aumentando nos últimos anos, como os trabalhos de Koepfli e colaboradores (2016) e Srisutham e colaboradores (2017), ambos baseados na amplificação do gene 18S rRNA (KOEPLI et al., 2016; MAHENDRAN et al., 2020; SRISUTHAM et al., 2017). Outros trabalhos, como o de Mahendran e colaboradores (2020), utilizou o Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) e o gene da plasmepsina para quantificação de *P. vivax* e *P. knowlesi* por ddPCR (KOEPLI et al., 2016; MAHENDRAN et al., 2020; SRISUTHAM et al., 2017). Estes trabalhos evidenciaram uma maior sensibilidade e reprodutibilidade na quantificação de amostras clínicas, mesmo utilizando um ensaio duplex, onde os protocolos padronizados por Koepfli e colaboradores (2016) e Srisutham e colaboradores (2017) também eram capazes de

detectar infecções por *P. malariae* e *P. ovale*. Nestes estudos, a ddPCR foi capaz de detectar infecções em baixas parasitemias, podendo ser mais sensível quando comparada à qPCR. Esta característica é importante principalmente em estudos epidemiológicos, em que infecções subpatentes são frequentes (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015; OKELL et al., 2012).

1.4.2.2 Alvos não ribossomais para o diagnóstico molecular da malária por *P. vivax* e *P. falciparum*

Atualmente, o gene RNA ribossomal 18S é o alvo mais utilizado nos protocolos de diagnóstico molecular da malária, porém se limita a 4-8 cópias no genoma de *Plasmodium spp.* (MERCEREAU-PUIJALON; BARALE; BISCHOFF, 2002). A constante necessidade de protocolos mais sensíveis leva à busca por novos alvos, sendo tais alvos espécie-específicos, localizados em regiões conservadas e tendo múltiplas cópias no genoma (HOFMANN et al., 2015; LLOYD et al., 2018; LUCCHI et al., 2013).

Demas e colaboradores (2011) identificaram dois potenciais alvos para diagnóstico, Pvr47 e Pfr364, localizados em regiões subteloméricas dos genomas de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (DEMAS et al., 2011). O alvo Pvr47 está presente em 14 cópias no genoma de *P. vivax* e o alvo Pfr364 apresenta 41 cópias no genoma de *P. falciparum* (Figura 4). O protocolo até então publicado se baseava na amplificação utilizando PCR convencional, que foi recentemente adaptado para qPCR pelo nosso grupo de pesquisa (AMARAL et al., 2019).

1.4.2.3 DNA obtido de saliva como alternativa para o diagnóstico molecular da malária humana

Mesmo a coleta de sangue sendo necessária para os métodos diagnósticos atualmente utilizados (parasitológico e molecular), o diagnóstico da malária negligencia fatores importantes inerentes ao paciente: seu conforto físico e psicológico. Nos anos 90 já era relatada uma condição médica chamada “fobia de agulha”, presente em pelo menos 10% da população (BIENVENU; EATON, 1998; HAMILTON, 1995; WRIGHT et al., 2009). Esta condição afeta crianças e adultos e representa uma barreira em termos de imunização, coleta de sangue e cuidados com saúde bucal (DOMOTO et al., 1988; NIR et al., 2003; RAO; SEQUEIRE; PETER, 1997). Uma fonte alternativa menos invasiva de material para diagnóstico é a saliva, ainda relativamente pouco utilizada em protocolos moleculares e sorológicos.

A saliva é secretada pelas glândulas salivares e sua base é o líquido intersticial dos capilares sanguíneos, que entra pelos ductos da glândula salivar (TURNER, 1993). É composta por 98% de água e os 2% restantes se constituem de eletrólitos, mucopolissacarídeos e glicoproteínas (composição do muco) e várias enzimas. É uma amostra de fácil obtenção e armazenamento, sendo rica em biomarcadores que podem ser utilizados em dispositivos *point-of-care* e testes rápidos, sendo já reconhecida como uma importante ferramenta para o diagnóstico molecular (MALAMUD, 2011). Além disso, sua coleta oferece um risco mínimo de infecção e é ideal em situações desafiadoras na prática clínica como coleta em recém-nascidos, crianças, pacientes com fobias e populações indígenas (PFAFFE et al., 2011).

A coleta da saliva pode ser realizada em *swab*, tendo atualmente diversos kits comercialmente disponíveis, bastante utilizados em estudos forenses e na análise de polimorfismos de base única associados com doenças específicas. Uma alternativa é a coleta de saliva total, frequentemente utilizada para diagnóstico de doenças sistêmicas (KÖHNEMANN; PFEIFFER, 2011; PFAFFE et al., 2011; VIRKLER; LEDNEV, 2009).

Alguns estudos em malária já avaliaram o diagnóstico molecular e imunocromatográfico usando saliva para detecção da proteína HRP2, lactato desidrogenase, DNA do parasito e biomarcadores (BUPPAN et al., 2010; GBOTOSHO

et al., 2010; GHAYOUR NAJAFABADI et al., 2014; HEDE et al., 2018; TAO et al., 2019). No estudo de Mfuh e colaboradores (2017), foi observada uma prevalência de 28% (de um total de 222 amostras) de *P. falciparum* na saliva por *nested* PCR, prevalência similar (35%) ao que foi detectado pelo mesmo método no sangue (MFUH et al., 2017). Por meio da *nested* PCR, Buppan e colaboradores (2010) obtiveram uma positividade de 43 entre 120 (36%) amostras de saliva congeladas, contudo este número aumentou para 76 (63%) em saliva conservada em álcool (BUPPAN et al., 2010). É importante ressaltar diferentes fatores que podem ter influenciado a sensibilidade do método diagnóstico empregado nesses estudos: (1) número reduzido de cópias no genoma do alvo (18S rRNA) da *nested* PCR e; (2) a adição de álcool, podendo proporcionar a presença de potenciais inibidores da PCR. Um único estudo utilizou como alvo o DNA mitocondrial do parasito extraído da saliva, sendo este um alvo com múltiplas cópias (20 a 150 cópias no genoma). Nesse estudo, foi observada uma taxa de 77% de positividade a partir da amplificação do gene *cox3* por PCR convencional, quando comparado a uma positividade de 62% utilizando o gene *18S rRNA* (LLOYD et al., 2018). Entretanto, mesmo sendo um alvo mais sensível devido ao grande número de cópias, o genoma mitocondrial possui uma taxa de 90% de conservação entre *P. falciparum* e *P. vivax*, o que dificulta o desenho de iniciadores e sondas específicas para cada espécie (MCINTOSH; SRIVASTAVA; VAIDYA, 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Em 2015, o Ministério da Saúde lançou o Plano de Eliminação da Malária, adotando a proposta de redução em até 90% das taxas de mortalidade e incidência de casos da *Estratégia Mundial para o Paludismo 2016-2030*, redigido pela OMS (SAÚDE, 2015). Apesar da redução dos casos de malária no Brasil entre 2007 e 2020, Brasil, Colômbia e Venezuela ainda são responsáveis por 80% dos casos de malária em todo continente americano (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). No primeiro semestre de 2020, os únicos estados que registraram aumento no número de casos foram Mato Grosso (64,5%), Rondônia (27,7%) e Roraima (18,8%) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). A maior frequência de transmissão de malária ocorre em áreas de maior vulnerabilidade sociodemográfica e epidemiológica, como os garimpos, assentamentos, áreas indígenas e áreas rurais. Em 2020, até o primeiro semestre, cerca de 90,1% dos casos ocorreram nessas áreas (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Como muitos casos de malária ocorrem em áreas remotas ou não endêmicas no país, o uso de RDT se faz importante em regiões sem a devida infraestrutura ou microscopistas experientes. Portanto, para garantir o uso seguro dos RDTs é necessário o estudo dos antígenos nos quais eles se baseiam, uma vez que a variabilidade genética desses antígenos pode ter influência na sensibilidade e eficácia do teste (LEE et al., 2006a). Com a constante presença de casos na região extra-amazônica, o diagnóstico se torna um grande desafio devido à necessidade de profissionais treinados e estrutura adequada para o diagnóstico. Entretanto, manter uma estrutura dedicada ao diagnóstico da malária não é viável em regiões onde a doença não faz parte da rotina laboratorial. Além disso, conforme a prevalência da malária diminui na região amazônica, observa-se uma grande proporção de infecções submicroscópicas (50 a 75%) que são diagnosticadas somente por protocolos moleculares (ALVES et al., 2002; BARBOSA et al., 2014; LADEIA-ANDRADE et al., 2009). Os estudos já publicados mostram que a ddPCR é uma técnica com maior sensibilidade e precisão na detecção e quantificação do *Plasmodium*, permitindo que amostras menos invasivas e com menor quantidade de material genético sejam uma opção para o diagnóstico da malária.

Sendo assim, dentro do plano atual de eliminação da malária, tais métodos mais sensíveis de diagnóstico são essenciais para detecção de casos caracterizados por baixas parasitemias e infecções mistas, que são dificilmente detectadas pelas metodologias convencionais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto da variabilidade genética de HRP2 de *P. falciparum* nos testes rápidos de diagnóstico de malária e desenvolver um protocolo de diagnóstico molecular para detecção de malária em amostras de saliva.

3.2 Objetivos Específicos

- 3.2.1** Avaliar a taxa de deleção e caracterizar a variabilidade genética de *pfhrp2* em isolados de *P. falciparum* de diferentes regiões da Amazônia Brasileira;
- 3.2.2** Analisar a diversidade genética de *pfhrp2* em amostras de *P. falciparum*;
- 3.2.3** Avaliar a sensibilidade da qPCR utilizando alvos multicópias (mitocondriais e não ribossomais) e diferentes fontes de DNA (sangue, saliva e swab bucal) do parasito para o diagnóstico da malária;
- 3.2.4** Padronizar um protocolo de ddPCR baseado em alvos multicópias e avaliar sua acurácia no diagnóstico da malária utilizando DNA extraído de diferentes amostras biológicas.

4 METODOLOGIA

4.1 Área e População de estudo

O estudo foi realizado com indivíduos expostos à malária em diferentes municípios da Amazônia Brasileira (Macapá/Amapá, Cuiabá/Mato Grosso, Porto Velho/Rondônia e Boa Vista/Roraima). Segundo o Boletim Epidemiológico de 2021, os municípios de Boa Vista e Porto Velho apresentaram Incidência Parasitária Anual (IPA) de médio risco (IPA entre 10 e <50/1.000 habitantes) e os municípios de Macapá e Cuiabá tendo IPA de muito baixo risco (IPA <1 caso/1.000 habitantes) (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). As amostras utilizadas neste projeto foram gentilmente cedidas por colaboradores da área endêmica e estão localizadas no Biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária, e datam de 2002 a 2012. No total, foram utilizadas 597 amostras, sendo 249 amostras de *P. falciparum*, 321 de *P. vivax* e 27 de pacientes negativos na MO. A maioria era caracterizada como amostras pareadas de sangue, saliva e swab. A tabela 1 resume os dados de gênero e idade dos indivíduos incluídos neste estudo.

Tabela 1. Resumo dos dados dos indivíduos incluídos neste estudo.

Diagnóstico por MO	Gênero masculino (%)	Idade, média (SD)
<i>P. vivax</i>	79,8	38 (13)
<i>P. falciparum</i>	76,4	36 (12)
<i>Negativos</i>	64,3	37 (12)

4.2 Diagnóstico Microscópico

Durante a coleta de sangue, todos os indivíduos foram submetidos à punção digital para o diagnóstico de malária por MO. As lâminas de gota-espessa coradas com Giemsa foram preparadas e examinadas inicialmente por um microscopista local experiente. Todos os casos positivos foram tratados imediatamente nos serviços de saúde locais, conforme protocolos de tratamento da malária recomendados pelo Ministério da Saúde (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). Um segundo microscopista treinado fez a revisão das lâminas e a contagem da densidade parasitária em número de parasitos por microlitro de sangue (parasitos/ μ L).

4.3 Diagnóstico Molecular

A padronização de um protocolo de qPCR e ddPCR para detecção e quantificação de DNA de *P. falciparum* e *P. vivax* obtido de saliva de pacientes com malária envolveu o desenho de iniciadores específicos baseado no genoma mitocondrial e genes nucleares multicópias de *Plasmodium*. Foi realizada a comparação da sensibilidade e especificidade das duas técnicas utilizando amostras de sangue, saliva (total e swab bucal) de indivíduos expostos à malária. O limite de detecção (LOD) foi avaliado a partir da construção de curvas padrão com plasmídeo e amostras clínicas. Os métodos de coleta sangue, saliva total e swab bucal também foram comparados quanto as medidas de acurácia dos métodos de diagnóstico molecular de malária.

4.3.1 Extração de DNA de sangue total, saliva total e swab bucal

O DNA genômico utilizado nos ensaios moleculares foi extraído das amostras de sangue total coletadas em tubos contendo EDTA usando o kit *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante – com alteração do volume da solução de hidratação de DNA no final do protocolo. Em resumo, 900 µL de solução de lise de células vermelhas foram adicionados a 300 µL de sangue total em um tubo de 1,5 mL e invertida 10 vezes e então incubada por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 16.000 x g por 20 segundos. O *pellet* obtido na centrifugação foi ressuspenso com 10 µL do líquido sobrenadante e então foram adicionados 300 µL de solução de lise celular, seguida da adição de 100 µL de solução de precipitação de proteínas, agitado em vórtex por 20 segundos e então centrifugado a 16.000 x g por 1 minuto. A este sobrenadante foram adicionados 300 µL de isopropanol em um tubo de 1,5 mL e invertido por cerca de 50 vezes. Esta solução foi centrifugada por 16.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante descartado e o tubo invertido em um papel absorvente. Logo após, 300 µL de etanol 70% foi adicionado ao tubo e novamente invertido, seguido de centrifugação a 16.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, o tubo invertido em um papel absorvente e em seguida o tubo foi deixado por 5 minutos para evaporação do etanol. Foram adicionados 50 µL de solução de hidratação de DNA e incubado à 65°C por 5 minutos. Posteriormente, a amostra foi deixada *overnight* em temperatura ambiente e após esse período até o momento do uso, as amostras foram mantidas à -20°C.

Para a extração do DNA de saliva total, foi utilizado o protocolo de fluidos corporais do kit *Gentra Puregene Blood Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante – com alteração do volume da solução de hidratação de DNA no final do protocolo. O protocolo consistiu na adição de 5 mL de solução de lise de células e 1 mL de saliva em um tubo de 15 mL, seguida da adição de 30 µL de proteinase K. A solução foi homogeneizada por inversão do tubo (25 vezes), seguido pela incubação à 65°C *overnight* (cerca de 16 horas). Após esse período, foram adicionados 2 mL de solução de precipitação de proteína, agitado em vórtex por 20 segundos, incubado em gelo por 5 minutos e centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos. Foram adicionados 6 mL de isopropanol a este sobrenadante e 10 µL de solução de glicogênio, invertido 50 vezes e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. O material foi centrifugado a 2.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado e o tubo invertido em papel absorvente. Foram adicionados 300 µL de etanol 70% e, após inversão do tubo para lavagem do *pellet* de DNA, centrifugado a 2.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o tubo invertido em papel absorvente, seguido de evaporação do etanol por 10 minutos. Foram adicionados 50 µL de solução de hidratação de DNA e incubado a 65°C por 1 hora. As amostras foram mantidas à -20°C até o momento do uso.

Para a extração de DNA de swab bucal, foi utilizado o kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen), com modificações em diferentes etapas (Agnes Antônia Sampaio Pereira, Comunicação pessoal). Ao swab bucal, contido em um tubo de 2 mL, foi adicionado 200 µL de PBS 1x, 20 µL de proteinase K e 200 µL da solução *Genomic Lysis/Binding Buffer*, e após homogeneizar a solução, incubado a 55°C por 30 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado e então adicionado 200 µL de etanol 100%, submetendo ao vórtex durante 5 segundos. Essa solução foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. O tubo coletor foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução *Wash Buffer 1* e a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto. Novamente o tubo coletor foi descartado e transferido para um novo, onde foi adicionado 500 µL da solução *Wash Buffer 2*. A solução foi centrifugada a 15.000 x g por 3 minutos. A coluna foi então colocada em um tubo de 1,5 mL e adicionado 30 µL da solução *Purelink Genomic Elution Buffer* e incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse período, foi centrifugada 15.000 x g por

1 minuto a temperatura ambiente. As amostras foram mantidas à -20°C até o momento do uso.

4.3.2 Desenho de iniciadores e sondas para o alvo mitocondrial

Os iniciadores e sondas para o alvo mitocondrial foram desenhados através dos programas OLIGO (versão 4.0, 1999) e *OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies)*, com base nos alinhamentos das sequências de DNA de *Plasmodium* spp. realizados pelo grupo. A Tabela 2 resume as sequências obtidas dos iniciadores e sondas para *P. falciparum* e *P. vivax*.

Tabela 2. Ensaios obtidos para os alvos mitocondriais para *P. vivax* e *P. falciparum*.

Ensaio	Sequência dos iniciadores e sonda	
PV_COX3	Senso	5'-GGAGATTACCCGACAAGGAA-3'
	Anti-senso	5'-TCCGATGAATAGTTCAAGTTAC-3'
	Sonda	5'-FAM-ACCGTTTAC-ZEN-GATACAGCCGCC-BHQ-3'
PV_NC_1	Senso	5'-ATCATGGATATCAGGATTAATCA-3'
	Anti-senso	5'-ACATAACCAAATTACTAATACTG-3'
	Sonda	5'-HEX-AGTTACAGC-ZEN-TTTTATAGGTTACGTTTT-BHQ-3'
PF_NC_1	Senso	5'-GGAGATTACCCGACAAGGAA-3'
	Anti-senso	5'-AAGTTACTGACATCTGCCCG-3'
	Sonda	5'-HEX-ACCGTTTAA-ZEN-AATACAGCCGCCG-BHQ-3'
PF_NC_2	Senso	5'-AGATGCCAGGCCAATAACTC-3'
	Anti-senso	5'-TCTTGAGGCAGTTTGTTCCC-3'
	Sonda	5'-FAM-TGACGCTAT-ZEN-CAATTTTTAGCAAGACGG-BHQ-3'
PF_CYTB	Senso	5'-ATCATGGATATCTGGATTGATTT-3'
	Anti-senso	5'-ACATATCCAAATTACTGCTACTG-3'
	Sonda	5'-FAM-TTTATGATA-ZEN-TTTATTGTAAGTCTTTTCG-BHQ 3'

O alinhamento de diferentes sequências do genoma mitocondrial de *Plasmodium* spp. recuperadas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foi realizado utilizando o programa BioEdit (versão 7.0.5, 2005, Ibis Therapeutics) para averiguar a especificidade de cada set desenhado.

4.3.3 Utilização dos iniciadores e sondas para os alvos Pvr47 e Pfr364

Os iniciadores e sondas desenhados por Amaral e colaboradores (2019) para os alvos Pvr47 e Pfr364 foram utilizados nos protocolos de qPCR e ddPCR (AMARAL et al., 2019). Para aumentar a intensidade de fluorescência e sensibilidade do ensaio de *P. falciparum*, modificações foram realizadas na sonda e no iniciador anti-senso (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos alvos Pvr47 e Pfr364.

<i>Pfr364</i>	
Iniciador senso	5'-CTCGCAATAACGCTGCAT-3'
Iniciador anti-senso	5'-TTCCCTGCCCAAAAACG- 3'
Sonda	5'-FAM-TGGTGCCGGGGG-ZEN-TTTCTACGC-lowaBlackFQ-3'
<i>Pvr47</i>	
Iniciador senso	5'-TCCGCAGCTCACAAATGTTC-3'
Iniciador anti-senso	5'-ACATGGGGATTCTAAGCCAATTTA-3'
Sonda	5'-FAM-TCCGCGAGG-ZEN-GCTGCAA-lowaBlackFQ-3'

4.3.4 Padronização da qPCR e ddPCR para os alvos mitocondriais e não ribossomais

Na padronização da qPCR, foram testados os iniciadores nas concentrações de 300, 600 e 900 nM e as sondas em 150, 200 e 250 nM, na temperatura de anelamento de 60°C. Após a escolha das melhores condições, amostras de DNA de indivíduos sabidamente negativos e que não estiveram em área endêmica, além de amostras positivas para *P. vivax* e *P. falciparum* foram utilizadas para a análise da especificidade dos iniciadores e sondas. O DNA de *P. falciparum* e *P. vivax* isolados de sangue de pacientes previamente diagnosticados por microscopistas bem treinados como mono infecções foi utilizado na padronização da qPCR. Todos os ensaios de qPCR foram realizados no equipamento *ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)*, da Plataforma de PCR em Tempo Real do Instituto René Rachou, e analisadas no *QuantStudio™ Real-Time PCR Software (Thermo Fisher Scientific)*.

Para a padronização da ddPCR foram testadas diferentes temperaturas de anelamento, de 58°C a 64°C, nas concentrações de 900 nM para os iniciadores e 250

nM para a sonda (condição recomendada pelo fabricante). Do mesmo modo, a especificidade dos ensaios foi avaliada utilizando amostras negativas para malária e realizado teste cruzado com amostras positivas para as duas espécies após a definição das condições ideais para a ddPCR. Os ensaios foram realizados inicialmente utilizando o *QX200™ Droplet Generator (Bio-Rad)*, um sistema de geração de gotas operado manualmente, e a leitura final realizado no equipamento *QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad)*, localizado nos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária, em Pedro Leopoldo/MG.

Posteriormente, o mesmo protocolo padronizado para a ddPCR foi executado em um novo equipamento de geração de gotas, *QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad)*, sistema automatizado que elimina as variações adicionadas pelo usuário. A leitura final foi realizada no mesmo equipamento *QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad)*, localizado no Instituto René Rachou. A análise dos resultados foi realizada no *QuantaSoft™ Software (Bio-Rad)*, que mensura o número de gotas positivas e negativas, e utiliza as gotas positivas na distribuição de Poisson para determinar a concentração do alvo em cópias/ μ L. Para este cálculo, é necessário que o experimento atinja o mínimo de 10.000 gotas totais.

4.3.4.1 Definição do Limite de Branco para os ensaios de ddPCR

Na ddPCR, eventos falso-positivos podem ocorrer a partir de diferentes fontes e, portanto, determinar um limiar nos ensaios de quantificação se torna crítico, particularmente quando um alvo é esperado em baixas concentrações (ARMBRUSTER; PRY, 2008). O Limite do Branco (LoB) é caracterizado como a menor concentração de um analito que pode ser mensurado com segurança em um procedimento analítico, ou a maior concentração *aparente* de um analito que pode ser detectada quando replicatas de uma amostra sem analito são testadas (ARMBRUSTER; PRY, 2008; CLSI/NCCLS, 2004). Desse modo, para os ensaios Pfr364 e Pvr47 o LoB foi definido utilizando a fórmula (ARMBRUSTER; PRY, 2008):

$$\text{LoB} = \text{média}_{\text{branco}} + 1.645 (\text{Desvio Padrão}_{\text{branco}})$$

onde o “branco” se refere às replicatas que não continham nenhum analito. Para o cálculo do LoB foi considerado o branco dos ensaios de *P. vivax* e *P. falciparum* em conjunto.

4.3.5 Determinação do Limite de detecção (LOD) e ensaio de quantificação de *P. vivax* e *P. falciparum*

Para a avaliação do limite de detecção das técnicas de qPCR e ddPCR, foi realizada a construção de plasmídeos contendo as sequências específicas de cada alvo para a realização de curvas-padrão para *P. falciparum* e *P. vivax*. Brevemente, os alvos amplificados por PCR convencional foram dosados no *NanoDrop 2000 spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*) e clonados no vetor pGEM-T Easy Vector (*Promega*), conforme protocolo do fabricante. Posteriormente, foi realizada a transformação em bactéria *Escherichia coli* TOP10 e após esse processo, 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. No final do processo, as colônias selecionadas foram submetidas à purificação com o kit *QIAprep Miniprep* (*QIAGEN*), conforme instruções do fabricante e digestão do plasmídeo com a enzima *EcoRI* (*Promega*) para confirmação da presença do inserto. Confirmada a presença dos insertos, foi realizada a linearização dos plasmídeos com a enzima de restrição *ApaI* (*Promega*), e quantificados no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (*Life Technologies*). Para o cálculo do número de moléculas dos plasmídeos foi utilizada a fórmula (DE SOUZA et al., 2015):

$$\frac{[(6,02 \times 10^{23} \text{ cópias/mol}) \times \text{quantidade de DNA (g)}]}{[\text{comprimento do DNA (pb)} \times 660 \text{ (g/mol/pb)}]}$$

Após realizada esta estimativa, o DNA plasmidial de cada espécie foi diluído em oito pontos de diluição, com um fator de 5, tendo como ponto inicial a concentração de 2×10^4 cópias/µL de plasmídeo. Os pontos mais concentrados foram realizados em triplicata, e para os mais diluídos, até 8 replicatas.

Amostras clínicas também foram utilizadas na determinação do limite de detecção na qPCR e ddPCR. Para tal, duas amostras foram utilizadas para *P. vivax* e *P. falciparum*, com parasitemia determinada por microscopistas experientes. Diluições seriadas, com um fator de 3, foram realizadas de 220 parasitos/µL a 0,3 parasitos/µL na qPCR e 0,1 parasitos/µL na ddPCR. Na ddPCR todos os pontos foram realizados em triplicata, assim como na qPCR, exceto pelos pontos mais diluídos, que foram realizados em quintuplicata nesta técnica.

Os ensaios de quantificação foram realizados na qPCR usando os plasmídeos (quantificação absoluta) e amostras clínicas (quantificação relativa). Para a quantificação absoluta, foi realizada uma diluição seriada de 5 vezes entre cada ponto com os plasmídeos (de 2×10^4 a $0,128 \times 10^1$ cópias/ μL) em triplicata. As curvas de quantificação relativa foram realizadas com 3 amostras clínicas de *P. vivax* e *P. falciparum* com parasitemias determinadas por microscopistas experientes. Essas amostras foram diluídas em série com fator de 5 vezes entre cada ponto e a quantificação realizada em triplicata. Para a estimativa do número de cópias equivalentes a parasitemia/ μL dos ensaios de quantificação relativa, os valores de Cq obtidos foram interpolados na reta de regressão obtida a partir da curva-padrão realizada na qPCR, utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 7 para Windows (*GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com*). Para a validação desse modelo foram utilizadas 19 amostras clínicas de *P. vivax* e 13 amostras para *P. falciparum*.

Para os ensaios de limite de detecção e quantificação, a parasitemia foi ajustada para o equivalente do volume de sangue usado no diagnóstico molecular, como mostrado na Tabela 4. O fator de concentração do sangue durante a extração do DNA, mais o volume de solução de hidratação utilizado na eluição do DNA foi de 1,2 vezes.

Tabela 4: Equivalente do volume de sangue utilizado no diagnóstico molecular.

Amostra	Volume de sangue extraído	Volume de DNA eluído	Volume de DNA adicionado à PCR (10 μl)	Fator de concentração ¹
Sangue	300 μL	50 μL	2 μL	1,2 vezes

¹ Fator de concentração do *template* do material durante a extração do DNA, mais a solução de hidratação para a eluição do DNA

4.4 Análise da variabilidade genética de *pfhrp2*

A deleção do gene foi inicialmente determinada por PCR convencional por meio da amplificação dos genes *pfhrp2*, MAL7P1_228 e MAL7P1_230 (*downstream* e *upstream* a *pfhrp2*, respectivamente), de acordo com o protocolo de Gamboa e colaboradores (2010) (GAMBOA et al., 2010) (Apêndice 1). Para confirmação dos resultados obtidos, um segundo protocolo foi utilizado baseado na Nested PCR (ABDALLAH et al., 2015) (Apêndice 1).

A análise da variabilidade genética de *pfhrp2* foi realizada a partir do sequenciamento do gene de acordo com o protocolo de Baker e colaboradores (2010) (BAKER et al., 2010). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o sistema *BigDye® Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific)*, que se baseia no método de terminação de cadeia com ddNTPs descrito por Sanger e colaboradores (1977) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Os produtos obtidos pela reação de sequenciamento foram analisados por eletroforese capilar no sequenciador *3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific)*. Para identificar os polimorfismos, as sequências foram alinhadas utilizando os programas *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) e *Contig Assembly Program (CAP)* (HUANG, 1992), dentro do pacote *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). A confirmação da qualidade das bases foi realizada no programa *Phred* (EWING et al., 1998) e o alinhamento das sequências de nucleotídeos e sua tradução em aminoácidos foi realizada com o programa *Mega X* (KUMAR et al., 2018).

4.5 Diversidade genética das populações de *P. falciparum*

As populações de *P. falciparum* foram genotipadas para caracterização da multiplicidade de infecção. Para isso, foram analisados três microssatélites polimórficos: *Polya*, *PfPK2* e *TA87* (SU; WELLEMS, 1996) (Apêndice 1). As reações de genotipagem foram analisadas por eletroforese capilar utilizando o sistema *ABI 3730xL DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific)*.

Os produtos da eletroforese foram analisados no programa *GeneMapper™* versão 4.1 (*Thermo Fisher Scientific*). Os picos deveriam ter no mínimo um pico de 200 unidades arbitrárias de fluorescência (*rFU*) para serem consideradas nas análises. Além disso, um limiar de um terço da altura do pico predominante (o pico com maior fluorescência) foi estabelecido para exclusão de artefatos. Para as análises de genética de populações foi considerado apenas o alelo predominante de cada *locus*. A heterozigosidade esperada (H_E), o número médio de alelos por *locus* e as frequências alélicas foram calculadas no programa Arlequin v.3.5 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007). A multiplicidade de infecção (*MOI*) foi calculada dividindo-se o número total de alelos pelo número de amostras para cada microssatélite.

4.6 Análises Estatísticas

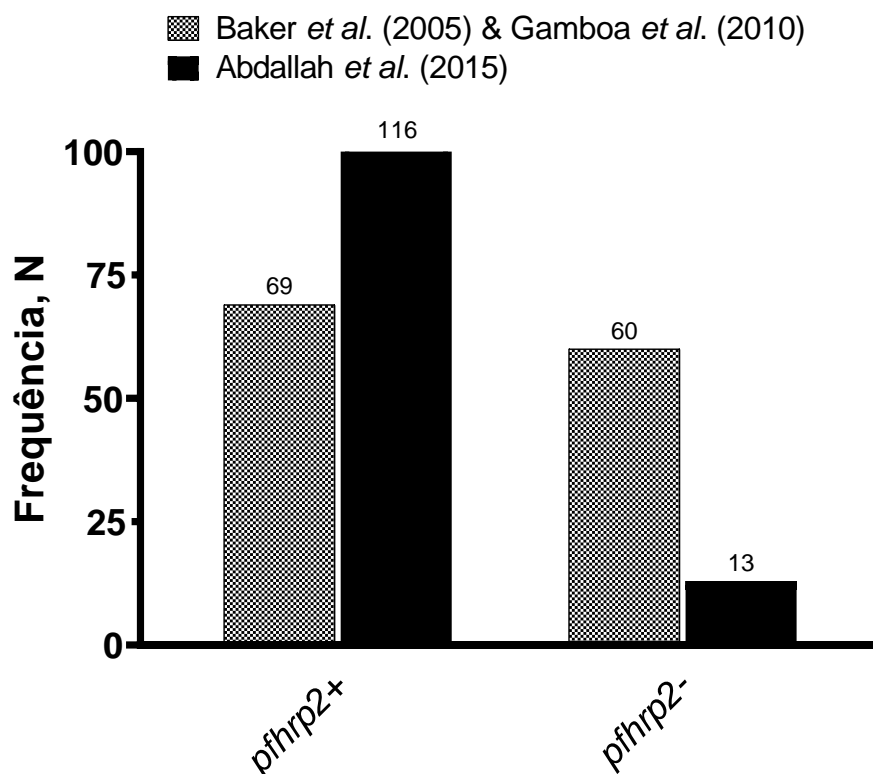
Os resultados da ddPCR e qPCR foram avaliados em termos de sensibilidade, especificidade e limite de detecção. A concordância entre os diferentes protocolos de PCR foi avaliada por índices estatísticos específicos, tais como *kappa*. Testes estatísticos paramétricos e não paramétricos apropriados foram utilizados nas análises de comparação de médias e comparação de proporções entre os grupos definidos no estudo, tais como: teste t, análise de variância, teste de Qui-Quadrado (χ^2) e Teste Exato de Fisher, conforme apropriado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico *R* (*The R Project for Statistical Computing*) e *GraphPad Prism* versão 8.0.2 para Windows (*GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com*). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do perfil de deleção de *pfhrp2*

Para essa parte do estudo, foram avaliadas 129 amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* do Amapá, Mato Grosso, Rondônia e Roraima. Para determinar o perfil de deleção foi utilizado inicialmente o protocolo descrito por Baker e colaboradores (2005) e Gamboa e colaboradores (2010), baseado na PCR convencional, que amplifica o gene *pfhrp2* e genes que o flanqueia *downstream* e *upstream*. Utilizando este protocolo, a taxa de deleção de *pfhrp2* para todas as regiões estudadas foi de 47% (Figura 5).

Figura 5. Frequência do perfil genético de *pfhrp2* segundo os protocolos de Baker e colaboradores (2005) e Gamboa e colaboradores (2010).



Para confirmar estes resultados, o protocolo descrito por Abdallah e colaboradores (2015) foi aplicado às mesmas amostras. A Tabela 5 e a Figura 5 resumem os resultados obtidos para a amplificação do gene *pfhrp2* utilizando este protocolo.

Tabela 5. Análise do perfil de deleção do gene *pfhrp2* utilizando o protocolo de Abdallah e colaboradores (2015).

	Rondônia, % (n=33)	Mato Grosso, % (n=40)	Amapá, % (n=11)	Roraima, % (n=48)
<i>pfhrp2</i> +	31 (93,9)	36 (90)	11 (100)	41 (85,4)
<i>pfhrp2</i> -	2 (6,1)	4 (10)	0	7 (14,6)

Para as 33 amostras analisadas de Rondônia, 2 amostras foram *pfhrp2* negativas (6,1%). Maiores frequências de deleção foram observadas nos estados de Mato Grosso, onde das 40 amostras analisadas, 4 (10%) foram negativas e 7 (14,6%) das 48 amostras do estado de Roraima. No estado do Amapá, as 11 amostras testadas foram positivas para *pfhrp2*. Quando analisadas em conjunto, as taxas de amostras *pfhrp2* negativas em todas as regiões foi de 10%. Diversos perfis de deleção foram encontrados quando foi analisado o *pfhrp2* e seus genes flanqueadores (Tabela 6). A deleção do gene *upstream* MAL7P1.230 foi observada com mais frequência.

Tabela 6. Diferentes perfis de deleção de *pfhrp2* encontrados nas amostras analisadas.

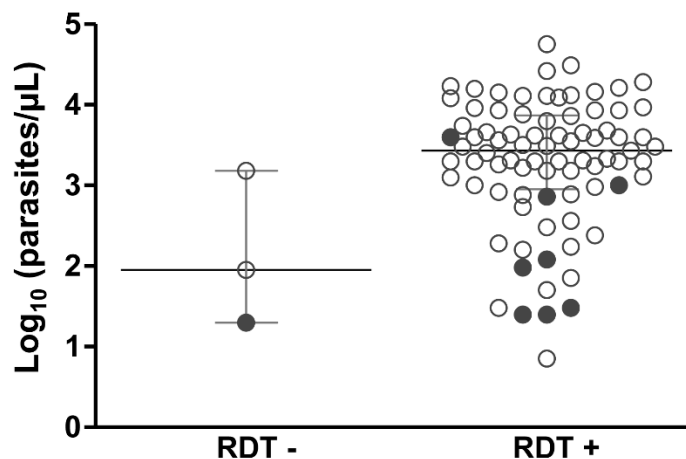
MAL7P1_230	<i>pfhrp2</i>	MALP1_228	N (%) ^a
Presente	Presente	Presente	69 (51,5%)
Ausente	Presente	Presente	45 (33,6%)
Ausente	Presente	Ausente	3 (2,2%)
Presente	Presente	Ausente	2 (1,5%)
Ausente	Ausente	Ausente	8 (6,0%)
Ausente	Ausente	Presente	5 (3,7%)
Presente	Ausente	Ausente	2 (1,5%)

^a Os perfis de deleção de *pfhrp2* estão em negrito

Ao comparar os dois protocolos utilizados, é possível observar uma diferença significativa na taxa de amostras *pfhrp2* negativas (46% para o primeiro protocolo vs. 10% para o segundo) (Figura 5). Em geral, não houve reprodutibilidade entre os protocolos para as amostras com baixa parasitemia (Média geométrica = 1.795 parasitos/ μ L, 95% IC = 1.131 – 2.847 para amostras com resultados concordantes vs. Média geométrica = 1.304, 95% IC = 776 – 2.190 para amostras com resultados discordantes, $P = 0,166$ pelo teste Mann-Whitney).

Noventa e quatro amostras (71%) foram testadas com RDTs e somente 4 (4,3%) foram negativas para *P. falciparum*. Uma amostra testada de 94 (1,1%) foi negativa no RDT e apresentou deleção de *pfhrp2*. No entanto, esta era uma amostra com baixa parasitemia (20 parasitos/ μ L) (Figura 6).

Figura 6. Associação entre o resultado dos RDTs e parasitemia das amostras testadas. Amostras de Rondônia e Roraima foram avaliadas com o teste *SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan test* (Aboot) no momento da coleta de sangue; amostras de papel de filtro de Mato Grosso foram avaliadas com o teste *SD Bioline Malaria Ag P.f (Standard Diagnostics)*. Amostras *pfhrp2* negativas estão em negrito. RDT -, resultado negativo no RDT; RDT +, resultado positivo.



Para 84 amostras com parasitemia definida por MO, a maioria das amostras com resultado negativo no RDT apresentava baixa parasitemia (de 20 a 1.500 parasitos/ μ L) (Figura 6). Oito amostras *pfhrp2* negativas tiveram resultado positivo no RDT. Análises preliminares por PCR convencional mostraram que essas amostras também foram negativas para *pfhrp3*. Os dados de RDT para as demais amostras *pfhrp2* negativas não estavam disponíveis.

5.2 Diversidade genética das populações de *P. falciparum*

Para a caracterização genética, as amostras foram genotipadas utilizando três microssatélites: *TA87*, *Polya* e *PfPK2*. No total, 99/132 (75%) amostras foram genotipadas com sucesso. A maioria das amostras foi definida como policlonal (62/99), tendo o valor de MOI variando de 1,06 a 1,66 (Tabela 7). De forma geral, as populações de *P. falciparum* aqui analisadas mostraram alta diversidade genética, sendo ela maior em Rondônia e Roraima, enquanto Mato Grosso apresentou a menor diversidade.

Tabela 7. Multiplicidade de infecção e diversidade genética das populações de *P. falciparum* de 4 estados da Amazônia Brasileira.

População	N	MOI	Nº. de alelos por locus, média ± SD	Diversidade genética (H_E), média ± SD
Amapá	11	1,06	2,6 ± 1,1	0,527 ± 0,191
Mato Grosso	9	1,66	2,0 ± 1,7	0,250 ± 0,433
Rondônia	33	1,20	6,0 ± 2,0	0,636 ± 0,192
Roraima	46	1,27	5,3 ± 2,5	0,595 ± 0,111

Das amostras *pfhrp2* negativas, 10/13 amostras puderam ser genotipadas. Destas, 9 amostras eram infecções policlonais (Tabela 8). Além disso, destas 10 amostras genotipadas, 9 foram testadas com RDT e apenas uma, com baixa parasitemia (20 parasitos/ μ L), foi negativa no RDT (Figura 6).

Tabela 8. Frequência alélica dos 3 microssatélites de *P. falciparum* genotipados nesse estudo.

Locus, alelo	Amapá (N = 11)	Mato Grosso (N = 9)	Rondônia (N = 33)	Roraima (N = 46)
TA87				
90	0,090	0,111	0,121	0,065
93	0,454	0,444	0,303	0,087
96	0,363	-	0,151	0,109
99	-	-	0,060	-
102	-	-	0,060	0,022
108	0,090	0,333	0,090	0,522
111	-	0,111	0,181	0,022
114	-	-	-	0,109
Polya				
162	-	-	0,030	-
165	0,545	-	0,242	0,130
174	0,454	1,000	0,696	0,173
180	-	-	-	0,695
PfPK2				
163	-	-	0,030	-
166	-	-	0,030	-
169	-	-	0,090	0,391
172	-	1,000	0,212	0,021
175	0,182	-	0,030	-
178	0,818	-	0,606	0,500
184	-	-	-	0,065

5.3 Variabilidade das sequências de *pfhrp2*

Para a análise de variabilidade de HRP2, 34 amostras foram sequenciadas e a composição de aminoácidos dessas sequências foi agrupada em diferentes tipos de repetições, de acordo com Baker e colaboradores (2005; 2010). A composição das repetições de aminoácidos das amostras foi similar para todas as regiões (Tabela 9). Todas as amostras começaram com a repetição do tipo 1 (AHHAHHVAD) e terminaram com o tipo 12 (AHHAAAHHEAATH). As repetições com maior número de unidades repetitivas por amostra foram os tipos 2 (AHHAHHAAD) e 7 (AHHAAD). Algumas repetições foram mais raras, como o tipo 4 (AHH), presente somente no

estado de Mato Grosso, assim como os tipos 9 (AAY), 11 (AHN), 13 (AHHASD) e tipo 14 (AHHAAHHATD), ausentes em todos os estados.

Tabela 9. Tipos e quantidade de repetições no gene *pfhrp2* nas 34 amostras de *P. falciparum* analisadas.

Região	Número mínimo e máximo de repetições ^a													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Amapá (N = 9)	4-6	9	1-2	0	2	3-4	6-10	1	0	2-3	0	1	0	0
Mato Grosso (N = 6)	2-4	9-12	2	0-1	0-2	3-6	8-11	0-1	0	0-3	0	1	0	0
Rondônia (N = 10)	2-4	9-12	1-2	0	1-2	2-4	9-8	1	0	0-2	0	1	0	0
Roraima (N = 9)	2-4	9-12	2	0	0-2	3-5	8-11	0-1	0	0-3	0	1	0	0

^a As repetições de aminoácidos foram identificadas como descrito por Baker e colaboradores (2005; 2010).

Tendo como base as repetições encontradas, foram definidos 10 padrões de sequências para as amostras analisadas neste trabalho (Figura 7). Cada estado apresentou um perfil distinto dos padrões identificados de PfHRP2 (Figura 8). Somente em Rondônia e Mato Grosso o padrão III foi observado em alta frequência.

Figura 7. Distribuição de frequência dos padrões de sequências de PfHRP2 para os isolados de *P. falciparum* da Amazônia Brasileira.

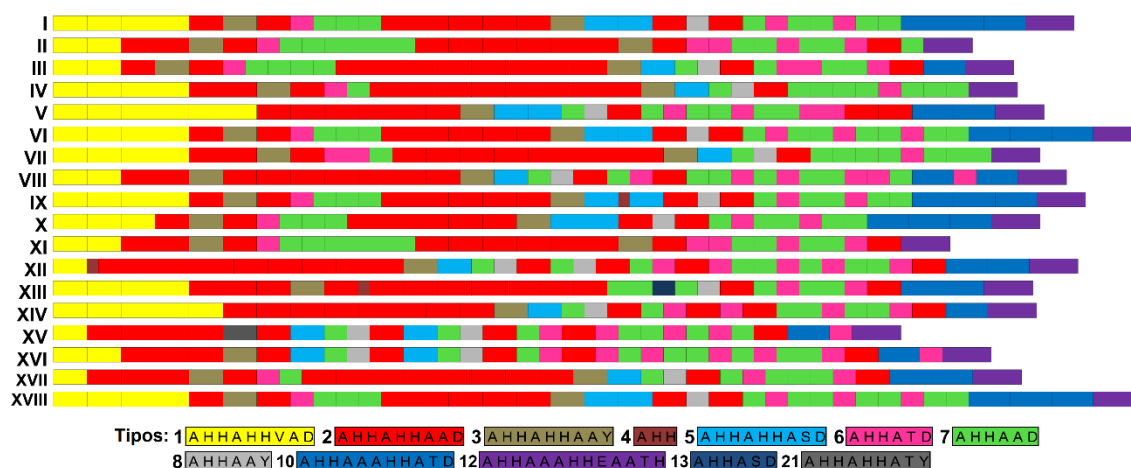
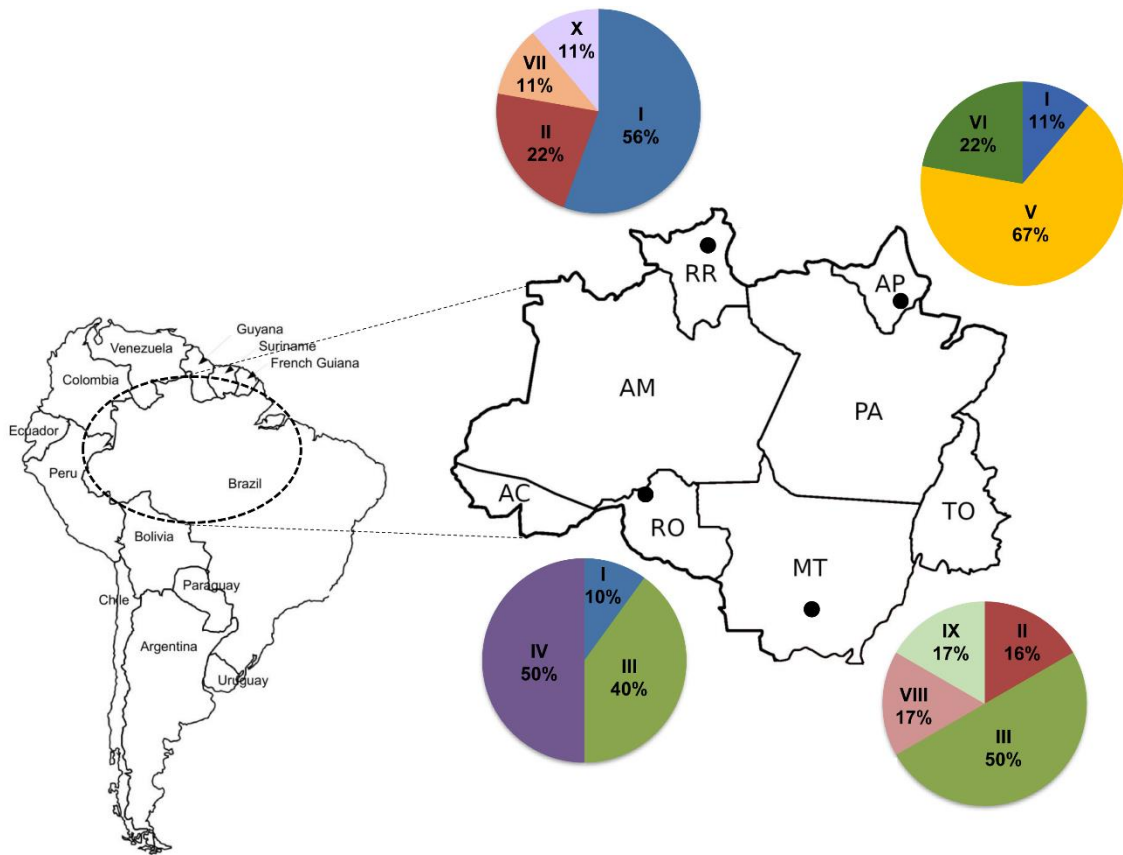


Figura 8. Diferentes padrões encontrados nos estados analisados neste estudo.



Em uma análise de variabilidade genética de *pfhrp2* de amostras da América do Sul, onde foi possível encontrar 8 diferentes padrões não observados nas amostras analisadas neste estudo, observamos que o padrão I é o mais prevalente no Brasil e Guiana Francesa (Tabela 10). Os resultados obtidos neste estudo para o perfil de deleção e variabilidade de *pfhrp2* foram compilados no artigo “A comprehensive analysis of genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) in the Brazilian Amazon” (Apêndice 2).

Tabela 10. Frequência dos padrões das sequências de PfHRP2 das amostras da América do Sul.

Padrões	Brasil, N (%)	Guiana Francesa, N (%)	Colômbia, N (%)	Peru, N (%)	Suriname, N (%)
I	11 (26,2)	16 (55,2)	0	0	0
II	3 (7,1)	0	0	0	0
III	8 (19,0)	0	0	1 (25,0)	0
IV	6 (14,3)	0	0	0	0
V	6 (14,3)	4 (13,8)	0	0	0
VI	2 (4,8)	3 (10,3)	0	0	0
VII	1 (2,4)	0	0	0	0
VIII	1 (2,4)	1 (3,5)	0	0	0
IX	1 (2,4)	0	0	0	0
X	1 (2,4)	0	0	0	0
XI	1 (2,4)	1 (3,5)	0	0	0
XII	1 (2,4)	0	0	0	1 (100,0)
XIII	0	0	0	2 (50,0)	0
XIV	0	0	0	1 (25,0)	0
XV	0	0	1 (50,0)	0	0
XVI	0	0	1 (50,0)	0	0
XVII	0	3 (10,3)	0	0	0
XVIII	0	1 (3,5)	0	0	0
Total, N	42	29	2	4	1

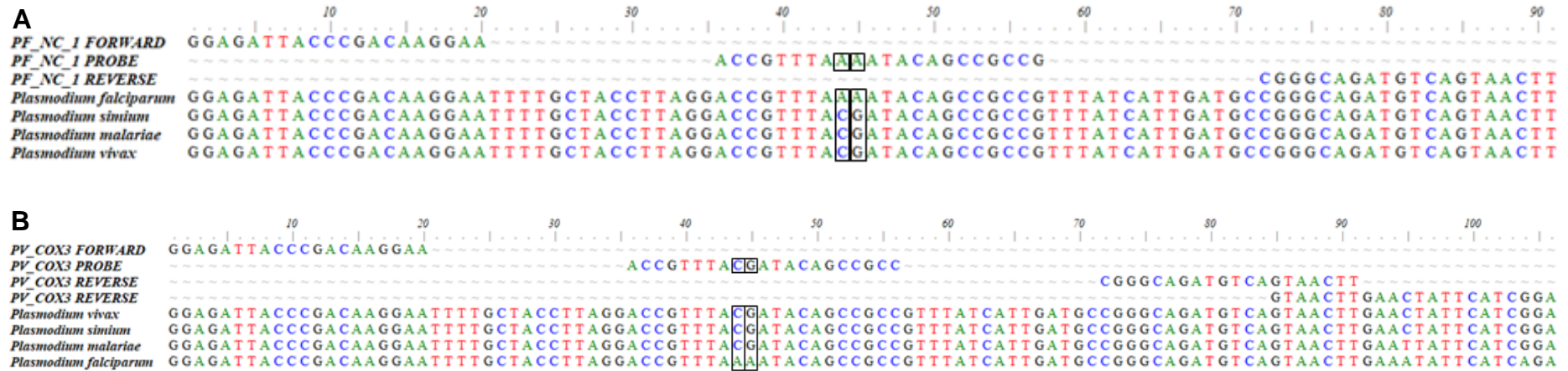
5.4 Padronização dos protocolos moleculares para amplificação dos alvos mitocondriais

5.4.1 Padronização da qPCR para os alvos mitocondriais

Cinco diferentes ensaios foram desenhados para a detecção de *P. falciparum* e *P. vivax*, tendo como alvo diferentes regiões no genoma mitocondrial (Tabela 2). Embora o genoma mitocondrial ser altamente conservado entre as espécies de *Plasmodium*, o alinhamento dos iniciadores e sondas de cada ensaio com as sequências do genoma de diferentes espécies de *Plasmodium* mostra a presença de alguns polimorfismos utilizados para a sua diferenciação (Figura 9).

Um amplo *screening* foi realizado com todos os ensaios para avaliar a reação cruzada entre *P. falciparum* e *P. vivax*, além de amostras de humanos não infectados por *Plasmodium*. No total, 60 amostras clínicas e 26 amostras de humanos não infectados foram utilizadas nos testes. A Tabela 11 resume os dados de parasitemia das amostras utilizadas.

Figura 9. Alinhamento de diferentes seqüências do genoma mitocondrial de *P. falciparum* e *P. vivax*. As regiões de diferenciação de cada espécie estão destacados em preto; em **(A)** está o conjunto obtido para *P. falciparum* e em **(B)**, para *P. vivax*.



Para o ensaio que tem como alvo o citocromo oxidase 3, PV_COX3, uma taxa de 23,4% de amplificação não específica com *P. falciparum* foi observada, com valores de Cq de 35,1 a 39,9, e uma sobreposição de Cq com as amostras específicas de 3,8%. A amplificação não específica foi observada para 1 de 67 (1,5%) reações com as amostras de humanos não infectados por *Plasmodium* (Tabela 11).

Para o ensaio PV_NC_1, três de 6 amostras de outras espécies de *Plasmodium* (50%) tiveram amplificação inespecífica com Cq médio de 34,8 (intervalo = 32,7 – 38,8) e 11% (8 de 68) das reações utilizando amostras de humanos não infectados por *Plasmodium* amplificaram para este ensaio (Cq médio = 36,5; intervalo = 31,3 – 38,6) (Tabela 11). Para a amplificação específica de *P. vivax*, este ensaio teve uma taxa de 95,7%, com Cq médio de 30,6 (27,0 – 37,4). Todas as amplificações inespecíficas tiveram valores de Cq acima da média das específicas. Uma sobreposição entre o Cq das amplificações inespecíficas e específicas foi observada em 31,8% das amostras analisadas.

Dois ensaios tiveram como alvo regiões não codificantes do genoma mitocondrial de *P. falciparum*. Para o ensaio PF_NC_1, o Cq médio das amostras específicas foi de 22,0 (12,7 – 34,6), e para o ensaio PF_NC_2, o Cq médio foi de 25,9 (19,3 – 29,8). Para o ensaio PF_NC_1, quatro de 15 amostras de *P. falciparum* não amplificaram, sendo que este resultado não está associado com baixa parasitemia (média geométrica = 1.224 parasitos/ μ L) (Tabela 11). Este ensaio apresentou amplificação inespecífica em 14,6% (11 de 75) das reações, sendo 11,8% (2 de 17) delas de amostras de *P. vivax*. Para o ensaio PF_NC_2, 27,8% (27 de 97) de amplificação inespecífica foi observada, sendo 38,9% (7 de 18) delas de *P. vivax*. Para as amostras de humanos não infectados por *Plasmodium*, observou-se uma taxa de 20,9% (9 de 43) e 33,3% (20 de 60) de amplificação, para os ensaios PF_NC_1 e PF_NC_2, respectivamente (Tabela 11). Houve uma sobreposição de 18,1% e 8,9% entre o Cq das amplificações inespecíficas e específicas para os ensaios PF_NC_1 e PF_NC_2, respectivamente.

Tabela 11. Resumo dos dados para cada ensaio dos alvos mitocondriais.

Ensaio	Parasitemia por MO	Amplificação específica de <i>Plasmodium</i> *		Amplificação não específica*				Total*	Cutoff
	Média geométrica (parasitos/ μ L)			Outras espécies de <i>Plasmodium</i> **		Humano não infectado por <i>Plasmodium</i>		Amplificação não específica (%)	
		Positividade (%)	Cq médio (intervalo)	Positividade (%)	Cq médio (intervalo)	Positividade (%)	Cq médio (intervalo)		
PV_COX3	3.802 (Cl ₉₅ 2.745-5.265)	41/43 (95,3)	26,5 (18,0 - 35,4)	11/47 (23,4)	37,7 (35,1 - 39,9)	1/67 (1,5)	-	12/157 (7,6)	34,1
PV_NC_1	1.159 (Cl ₉₅ 343,7-3.911)	22/23 (95,7)	30,6 (27,0 - 37,4)	3/6 (50)	34,8 (32,7 - 38,8)	8/68 (11,8)	36,5 (31,3 - 38,6)	11/97 (11,3)	34,3
PF_NC_1	1.587 (Cl ₉₅ 380,9-6.614)	11/15 (73,3)	22,0 (12,7 - 34,6)	2/17 (11,8)	34,7 (33,4 - 36,0)	9/43 (20,9)	36,3 (33,0 - 39,7)	11/75 (14,6)	32,9
PF_NC_2	1.255 (Cl ₉₅ 415,0-3.795)	18/19 (94,7)	25,9 (19,3 - 29,8)	7/18 (38,9)	34,6 (29,2 - 37,4)	20/60 (33,3)	36,6 (32,7 - 38,8)	27/97 (27,8)	31,2
PF_CYTB	1.337 (Cl ₉₅ 325,6-5.489)	36/66 (54,5) [#]	23,2 (13,0 - 33,3)	5/8 (62,5)	38,3 (38,0 - 38,4)	33/171 (19,3)	37,1 (34,8 - 39,8)	38/245 (15,5)	34,9

* Nesta tabela foram incluídas a soma de todas as reações testadas. ** Outras espécies de *Plasmodium* testadas: no ensaio PV_COX3 foram testadas 47 amostras de *P. falciparum*; no ensaio PV_NC_1 foram testadas 6 amostras de *Plasmodium*: *Plasmodium simium* (n=2), *P. malariae/P. brasilianum* (n=2) e *P. falciparum* (n=2); para PF_NC_1 foram testadas 17 amostras de *P. vivax*; para PF_NC_2 foram testadas 18 amostras de *P. vivax*; para o ensaio PF_CYTB, foram testadas 8 amostras de *Plasmodium*: : *P. simium* (n=2), *P. malariae/P. brasilianum* (n=2) e *P. vivax* (n=2). [#]PF_CYTB: 21 amostras não amplificaram devido ao uso de DMSO.

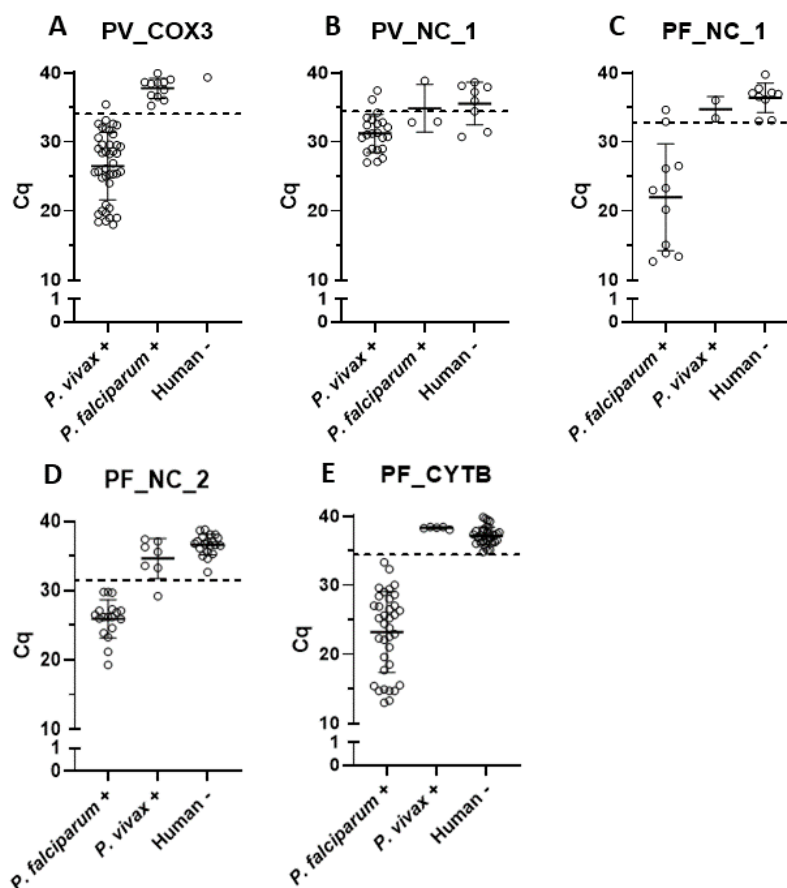
A amplificação inespecífica para o ensaio que teve como alvo o citocromo b de *P. falciparum*, PF_CYTB, foi identificada em 15,5% (38 de 245) das reações, incluindo 62,5% (5 de 8) amostras de *P. vivax* e 19,3% (33 de 171) das reações utilizando amostra de humanos não infectados por *Plasmodium* (Tabela 11). Neste ensaio, diferentes concentrações de DMSO (1% a 5%) foram utilizadas para reduzir a amplificação não específica, assim como avaliar seu efeito em relação às amplificações específicas. De 52 amostras testadas com DMSO (amostras de humanos não infectados por *Plasmodium* e *P. vivax*), quatro tiveram amplificação não específica (7,7%), e 21 de 66 (31,8%) amostras específicas de *Plasmodium* não amplificaram devido à inibição do DMSO, diminuindo a sensibilidade do ensaio PF_CYTB (Tabela 11). Seis de 66 amostras específicas testadas sem DMSO não amplificaram e esse resultado não foi associado com baixa parasitemia (média geométrica = 1.240 parasitos/ μ L). O maior valor de Cq para as amplificações específicas foi de 33,3, quase um ciclo menor que o Cq mínimo das amplificações não específicas (intervalo = 34,8 – 39,8). Não houve sobreposição entre as amplificações específicas e não específicas para este ensaio.

Inicialmente, para minimizar a amplificação inespecífica, diferentes parâmetros foram modificados, como a concentração dos iniciadores e sondas de cada ensaio, as condições de desnaturação e anelamento dos iniciadores e o número de ciclos da reação. A concentração dos iniciadores variou de 0,3 μ M a 0,9 μ M e das sondas de 0,15 μ M a 0,25 μ M. A temperatura de anelamento variou de 52° C à 63° C. Essas modificações diminuiram o número de amplificações inespecíficas em alguns casos, entretanto, não as eliminou na sua totalidade. Além disso, o valor de Cq para as amostras específicas aumentou, mostrando que as alterações na temperatura de anelamento e na concentração dos iniciadores e sondas interferiram na sensibilidade dos ensaios.

Um limiar de detecção (*cutoff*) foi estabelecido para cada ensaio usando os valores de Cq das amplificações específicas e inespecíficas, baseado na sensibilidade e especificidade dados pela curva ROC. O valor ótimo do *cutoff* foi determinado como >90% de especificidade (Tabela 11). Mesmo com a utilização do *cutoff*, não foi possível separar as amplificações específicas das inespecíficas (Figura 10). Os resultados observados do processo de padronização dos ensaios baseados no

genoma mitocondrial de *Plasmodium* foram compilados no artigo “*Malaria diagnosis based on mitochondrial targets: Challenges and Pitfalls*” e será submetido em breve na revista *Malaria Journal* (Apêndice 3).

Figura 10. Distribuição dos valores de Cq para as amplificações específicas e inespecíficas por ensaio na qPCR. (A) *P. vivax* citocromo oxidase 3. (B) *P. vivax* região não codificante 1. (C) *P. falciparum* região não codificante 1. (D) *P. falciparum* região não codificante 2. (E) *P. falciparum* citocromo oxidase b. *P. vivax* + e *P. falciparum* +, amostras positivas para *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente, previamente testadas usando diferentes protocolos moleculares; *Human* -, amostras de voluntários saudáveis de uma área não endêmica para malária (testadas com protocolos diferentes de PCR). As barras de erros representam o Cq médio e desvio padrão. A linha tracejada representa o *cutoff* definido para cada ensaio pela curva ROC.

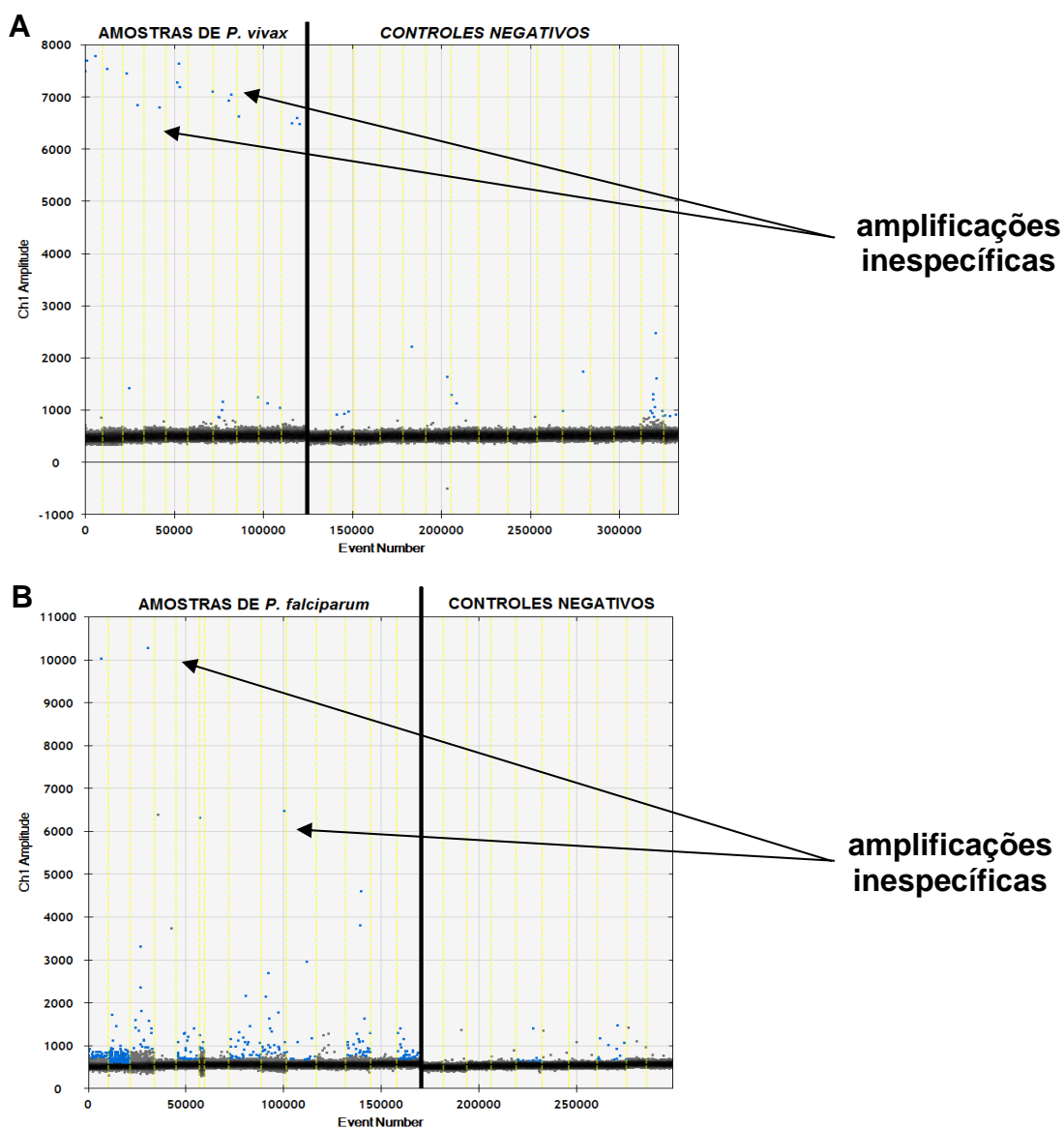


5.4.2 Padronização da ddPCR para os alvos mitocondriais

Para a padronização da ddPCR, os mesmos alvos mitocondriais desenhados para *P. vivax* e *P. falciparum* na qPCR foram utilizados, simultaneamente. De forma similar, para sua padronização, foi realizado um gradiente de temperatura (58°C a 62°C), na concentração de iniciadores de 900 nM e sonda, 250 nM, como recomendado pelo

manual da ddPCR (*Bio-Rad*). Mesmo com a amplificação eficiente para as amostras específicas de cada espécie, amplificações inespecíficas também foram observadas neste método realizando o teste cruzado entre *P. vivax* e *P. falciparum* e amostras de humanos não infectados por *Plasmodium* (Figura 11).

Figura 11. Teste de especificidade para *P. falciparum* e *P. vivax*. Cada ponto (azul e preto) representa uma gota gerada pelo QX200 Droplet Generator (*Bio-Rad*). Cada gota pode apresentar nenhuma, uma ou mais moléculas de DNA. Quando não existe material genético a ser amplificado, essa gota é considerada negativa quando lida no QX200 Droplet Reader (*Bio-Rad*) (pontos pretos); os pontos azuis são as gotas positivas. **(A)** Teste de especificidade de um ensaio de *P. falciparum* utilizando amostras de *P. vivax* e de humanos não infectados por *Plasmodium*. **(B)** Teste de especificidade de um ensaio de *P. vivax* utilizando amostras de *P. falciparum* e de humanos não infectados por *Plasmodium*.



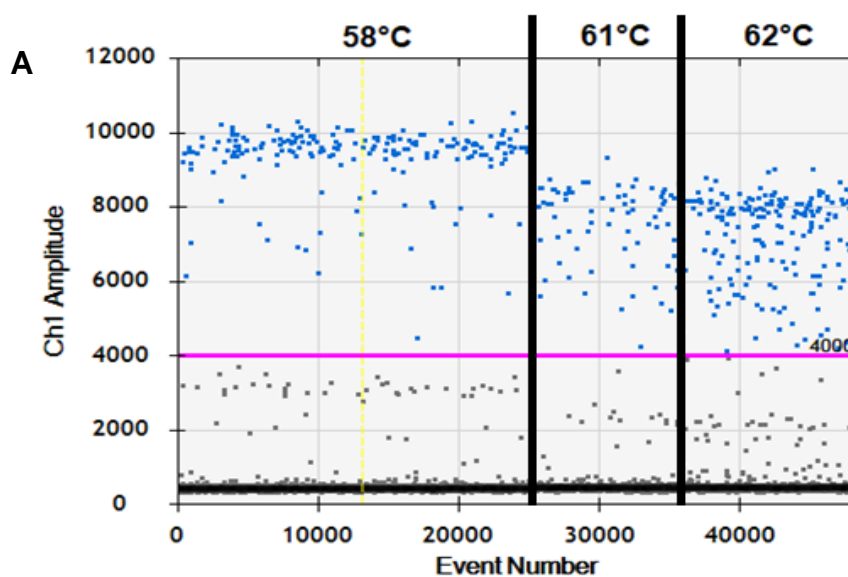
Ajustes nas concentrações para os ensaios de *P. vivax* e *P. falciparum* foram realizados, assim como na temperatura, na tentativa de diminuir as amplificações inespecíficas, embora sem sucesso. Diante da impossibilidade de obter ensaios específicos, tanto na ddPCR, quanto na qPCR, os ensaios com alvos mitocondriais não foram mais utilizados.

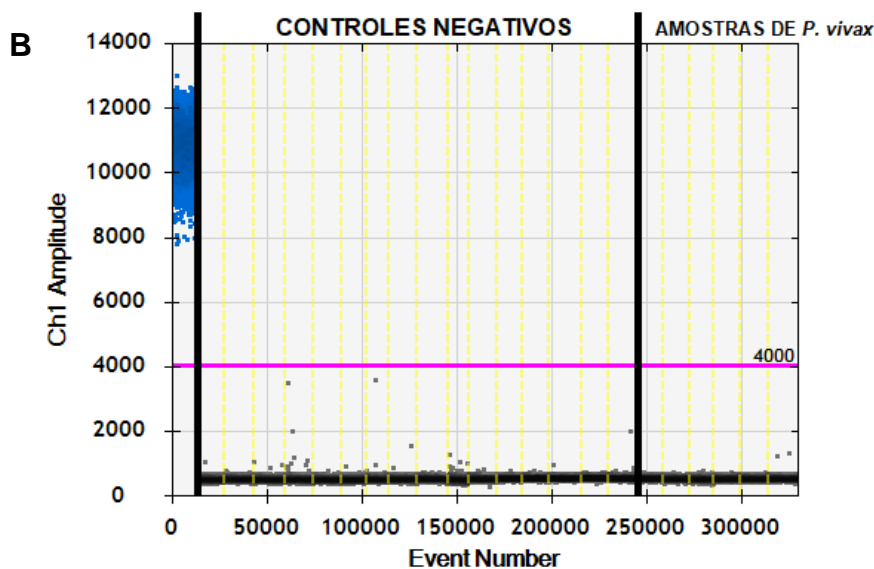
5.5 Padronização dos protocolos moleculares para amplificação dos alvos nucleares não ribossomais

5.5.1 Padronização da ddPCR

Para o ensaio de *P. falciparum* (Pfr364), foi realizado um teste com as temperaturas de 58°C, 61°C e 62°C. É importante ressaltar que para esta espécie duas populações bem definidas de gotas positivas são visíveis, sendo essas populações de amplicons com tamanhos distintos devido às cópias não idênticas do alvo Pfr364 no genoma de *P. falciparum*. Adicionalmente, um *threshold* de 4.000 unidades de fluorescência relativa (RFU) foi definido, auxiliando assim na eliminação das populações de menor amplitude (Figura 12). O ensaio permaneceu sem amplificação inespecífica quando testado com amostras de controle negativo e de *P. vivax* (Figura 12B). A temperatura de 58°C foi definida como a temperatura ótima.

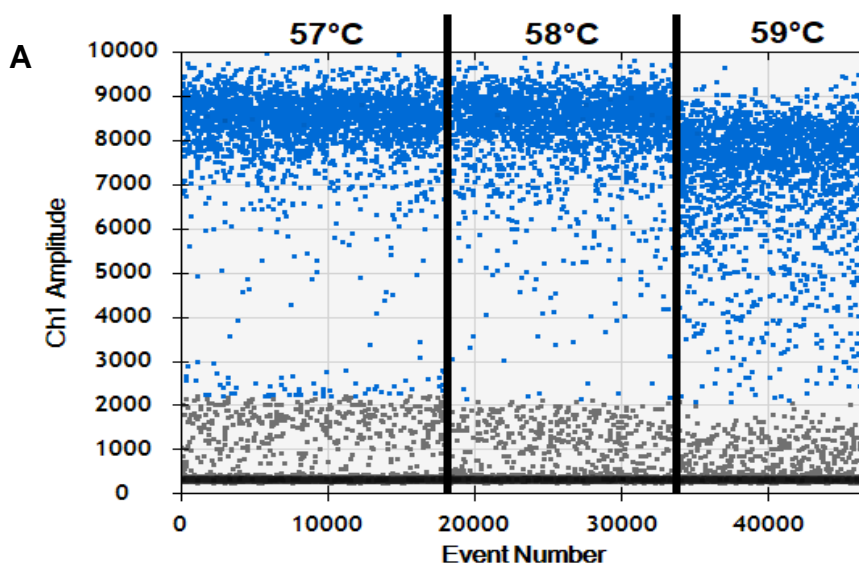
Figura 12. (A) Padronização da temperatura de anelamento dos primers utilizados na ddPCR para o alvo Pfr364. **(B)** Teste de especificidade com amostras de *P. vivax* e controles negativos de humanos não infectados por *Plasmodium*. A primeira coluna se refere a um controle positivo para *P. falciparum*.

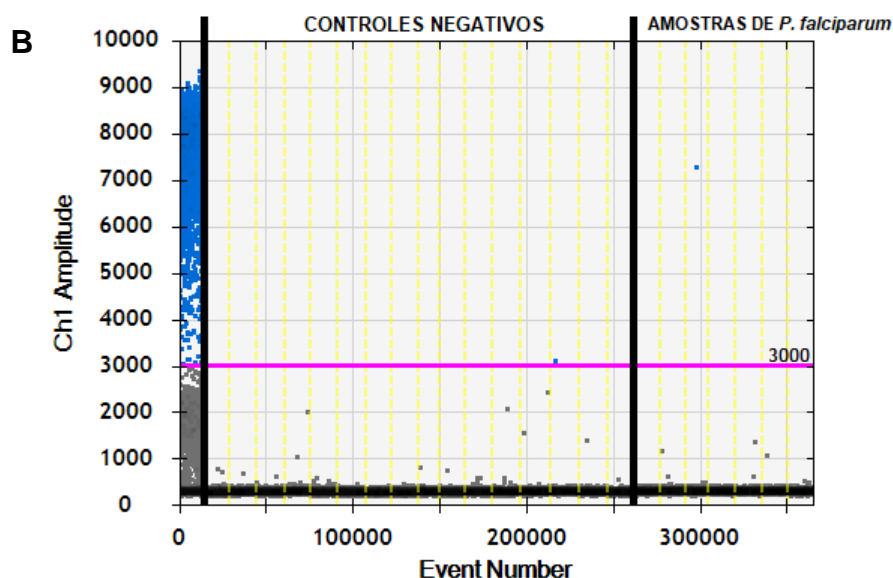




Para o ensaio de *P. vivax* (Pvr47) foi possível obter uma boa amplitude em todas as temperaturas testadas (57 a 59°C) com uma queda discreta na amplitude na temperatura de 59°C (Figura 13). O ensaio não apresentou amplificação inespecífica quando testado com amostras de *P. falciparum* ou controles negativos (Figura 13B). A temperatura de 58°C foi definida como a ótima e o *threshold* de 3.000 RFU foi estabelecido.

Figura 13. (A) Padronização do ensaio Pvr47. **(B)** Teste de especificidade com amostras de *P. falciparum* e controles negativos de humanos não infectados por *Plasmodium*. A primeira coluna se refere a um controle positivo para *P. vivax*.





Adicionalmente ao *threshold* estabelecido para ambos os ensaios, o LoB também foi aplicado. O número de gotas positivas de quatorze amostras sem analito de sete experimentos independentes foram selecionados para o cálculo do LoB (dados não mostrados). O valor obtido foi de 2 gotas e aplicado aos resultados das quantificações. Ou seja, as amostras foram consideradas positivas somente acima deste valor de gotas positivas.

5.6 Limite de detecção dos alvos Pvr47 e Pfr364

5.6.1 Limite de detecção na qPCR

Para realizar os ensaios com os alvos de *P. vivax* (Pvr47) e *P. falciparum* (Pfr364) na qPCR, foram utilizadas as condições padronizadas previamente por Amaral e colaboradores (2019). Inicialmente, utilizando um plasmídeo contendo o fragmento do alvo Pvr47 de *P. vivax* foi realizada uma diluição seriada, de 2×10^4 a $2,56 \times 10^{-1}$ cópias/ μL . Nos dois experimentos realizados em triplicata, é possível observar a amplificação do alvo até a concentração de 1,28 cópias/ μL (Tabela 12).

Tabela 12. Determinação do limite de detecção para o alvo Pvr47 de *P. vivax* na qPCR utilizando plasmídeo.

Plasmídeo (cópias/ μ L)	Nº replicatas positivas/total (%)		Cq médio (Cq SD)				Total
	Exp1	Exp2	Exp1		Exp2		
2,00E+04	3/3 (100%)	3/3 (100%)	24,8	(0,2)	24,9	(0,1)	6/6
4,00E+03	3/3 (100%)	3/3 (100%)	27,1	(0,2)	27,2	(0,1)	6/6
8,00E+02	3/3 (100%)	3/3 (100%)	29,2	(1,3)	29,7	(0,1)	6/6
1,60E+02	3/3 (100%)	3/3 (100%)	32,1	(0,5)	32,2	(0,1)	6/6
3,20E+01	3/3 (100%)	3/3 (100%)	34,8	(0,1)	34,8	(0,2)	6/6
6,40E+00	3/3 (100%)	3/3 (100%)	36,7	(0,3)	37,3	(0,3)	6/6
1,28E+00	2/3 (66,6%)	3/3 (100%)	38,5	(0,5)	39,5	(0,4)	5/6
2,56E-01	0/3 (0%)	0/3 (0%)	-	-	-	-	0/6

Para definir o limite de detecção utilizando amostras clínicas, duas amostras diferentes foram utilizadas com parasitemias determinadas por microscopia (Tabela 13). Na concentração de 0,9 parasitos/ μ L, todas as amostras foram amplificadas com sucesso. Além disso, o alvo foi amplificado com sucesso (> 80%) na concentração de 0,3 parasitos/ μ L nas duas amostras testadas.

Tabela 13. Determinação do limite de detecção utilizando amostras clínicas de *P. vivax*.

Parasitemia (parasitos/ μ L)	Nº replicatas positivas/total (%)		Cq médio (Cq SD)				Total
	Exp1	Exp2	Exp1		Exp2		
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	25,7	(0,28)	27,1	(0,01)	6/6
73	3/3 (100%)	3/3 (100%)	28,1	(0,36)	29,2	(0,1)	6/6
24	3/3 (100%)	3/3 (100%)	29,8	(0,38)	30,9	(0,18)	6/6
8	5/5 (100%)	5/5 (100%)	31,5	(0,87)	32,6	(0,39)	10/10
2,7	5/5 (100%)	5/5 (100%)	34,0	(0,92)	34,5	(0,47)	10/10
0,9	5/5 (100%)	5/5 (100%)	35,2	(1,59)	36,1	(0,83)	10/10
0,3	4/5 (80%)	4/5 (80%)	37,2	(0,93)	37,5	(1,22)	8/10

Já para *P. falciparum*, as concentrações de 2×10^4 até $2,56 \times 10^{-1}$ cópias/ μ L também foram utilizadas na construção das curvas para o limite de detecção. Para o alvo Pfr364, a concentração mínima detectada nos dois experimentos foi de 6,4 cópias/ μ L (Tabela 14).

Tabela 14. Determinação do limite de detecção do ensaio Pfr364 de *P. falciparum* utilizando plasmídeo.

Plasmídeo (cópias/ μ L)	Nº replicatas positivas/total (%)		Cq médio (Cq SD)				Total
	Exp1	Exp2	Exp1		Exp2		
2,00E+04	3/3 (100%)	4/4 (100%)	25,5	(0,08)	25,6	(0,09)	7/7
4,00E+03	3/3 (100%)	4/4 (100%)	28,0	(0,25)	28,1	(0,18)	7/7
8,00E+02	3/3 (100%)	4/4 (100%)	30,5	(0,37)	30,5	(0,14)	7/7
1,60E+02	3/3 (100%)	4/4 (100%)	31,9	(0,42)	32,6	(0,86)	7/7
3,20E+01	8/8 (100%)	4/4 (100%)	35,9	(0,85)	35,2	(0,64)	12/12
6,40E+00	7/8 (87,5%)	3/4 (75%)	37,0	(0,48)	37,01	(0,53)	10/12
1,28E+00	0/8 (0%)	1/4 (25%)	-	-	36,4	-	1/12
2,56E-01	1/8 (12,5%)	0/4 (0%)	37,3	-	25,6	-	1/12

Para as amostras clínicas, houve uma boa concordância de detecção até o valor de 2,7 parasitos/ μ L, onde acima de 80% das amostras amplificaram (Tabela 15).

Tabela 15. Determinação do limite de detecção utilizando amostras clínicas de *P. falciparum*.

Amostra (cópias/ μ L)	Nº replicatas positivas/total (%)		Cq médio (Cq SD)				Total
	Exp1	Exp2	Exp1		Exp2		
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	30,5	(0,19)	25,1	(0,84)	6/6
73	3/3 (100%)	3/3 (100%)	32,3	(0,54)	27,1	(0,64)	6/6
24	3/3 (100%)	3/3 (100%)	34,1	(0,59)	28,8	(1,64)	6/6
8	5/5 (100%)	5/5 (100%)	36,1	(1,13)	30,8	(1,29)	10/10
2,7	3/5 (60%)	5/5 (100%)	37,4	(0,94)	33,5	(0,87)	8/10
0,9	1/5 (20%)	5/5 (100%)	37,8	-	35,7	(0,51)	6/10
0,3	0/5 (0)	5/5 (100%)	-	-	37,2	(0,56)	5/10

5.6.2 Limite de detecção na ddPCR

Para definir o limite de detecção na ddPCR, amostras clínicas com parasitemia conhecida foram utilizadas. Diluições seriadas foram realizadas de 24 parasitos/ μ L a 0,1 parasitos/ μ L. Para o ensaio Pvr47 de *P. vivax*, o alvo foi detectado em todas as concentrações em pelo menos 2 replicatas para a amostra testada (Tabela 16). O ensaio foi capaz de detectar e quantificar até o limite de 0,1 parasitos/ μ L.

Para o ensaio Pfr364 de *P. falciparum*, a amplificação e quantificação foi realizada com sucesso (>66%) em todas as concentrações avaliadas (Tabela 17). Apesar da diferença de gotas positivas e quantificação entre as amostras testadas, pode-se observar que para a amostra 1 houve 100% de detecção em todos os pontos da curva.

Tabela 16. Determinação do limite de detecção do ensaio Pvr47 de *P. vivax* na ddPCR.

Parasitemia (parasitos/ μ L)	Amostra 1 (%)	Nº médio gotas positivas	Concentração média (cópias/ μ L) \pm SD	Amostra 2 (%)	Nº médio gotas positivas	Concentração média (cópias/ μ L) \pm SD	Total
24	3/3 (100%)	359	20,6 \pm 0,5	3/3 (100%)	36	2 \pm 0,2	6/6
8	3/3 (100%)	127	7,2 \pm 0,7	3/3 (100%)	10	1 \pm 0,2	6/6
2,7	3/3 (100%)	46	2,6 \pm 0,6	3/3 (100%)	3	0,2 \pm 0,04	6/6
0,9	3/3 (100%)	16	0,9 \pm 0,5	0/3 (0)	1	0,04 \pm 0,03	3/6
0,3	2/3 (66,6%)	4	0,3 \pm 0,2	0/3 (0)	0	0	2/6
0,1	2/3 (66,6%)	2	0,1 \pm 0,1	0/3 (0)	0	0	2/6

Tabela 17. Limite de detecção para cada amostra clínica testada com o ensaio Pfr364.

Parasitemia (parasitos/ μ L)	Amostra 1 (%)	Nº médio gotas positivas	Concentração média (cópias/ μ L) \pm SD	Amostra 2 (%)	Nº médio gotas positivas	Concentração média (cópias/ μ L) \pm SD	Total
24	3/3 (100%)	534	30,1 \pm 0,5	3/3 (100%)	100	5,1 \pm 0,9	6/6
8	3/3 (100%)	202	11,8 \pm 0,8	3/3 (100%)	30	1,6 \pm 0,1	6/6
2,7	3/3 (100%)	69	4,1 \pm 0,3	2/3 (66,6%)	9	0,5 \pm 0,4	5/6
0,9	3/3 (100%)	24	1,4 \pm 0,2	3/3 (100%)	6	0,3 \pm 0,2	6/6
0,3	3/3 (100%)	4	0,3 \pm 0,1	1/3 (33,3%)	2	0,1 \pm 0,03	4/6
0,1	3/3 (100%)	3	0,2 \pm 0,1	1/3 (33,3%)	1	0,1 \pm 0,1	4/6

5.7 Detecção de *Plasmodium* através de DNA obtido de sangue, saliva e swab pela qPCR

Nessa parte do estudo, foram incluídas 234 amostras, sendo 229 delas avaliadas com sucesso na qPCR para o DNA obtido de sangue. No sangue, a qPCR detectou 91% das amostras de *P. vivax* positivas na MO e 77% de *P. falciparum* (Tabela 18).

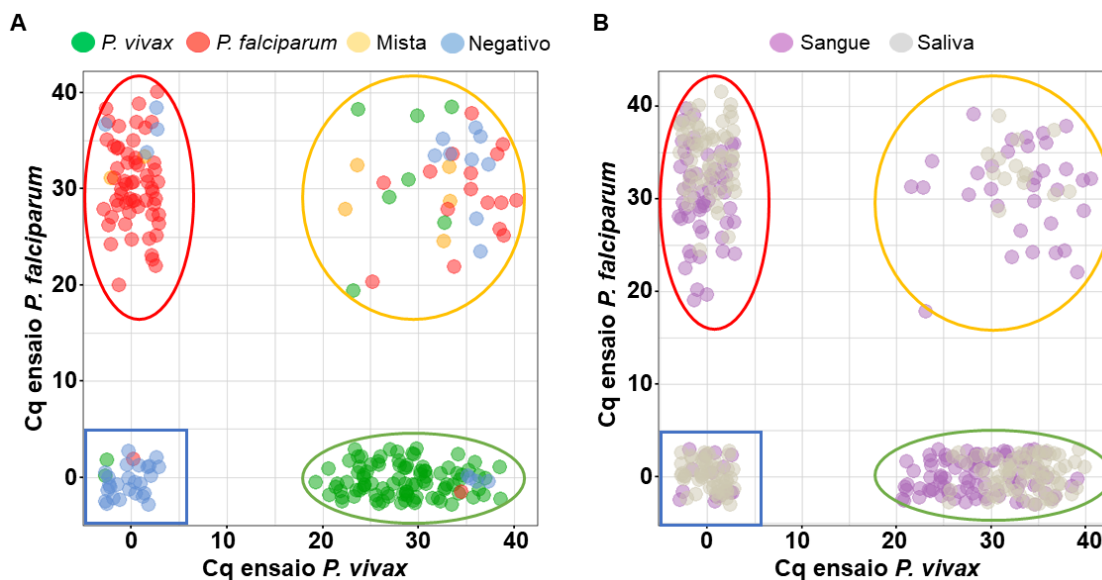
Tabela 18. Resumo dos resultados da MO e qPCR para as amostras de sangue.

MO	qPCR no sangue, n (%)			
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Mista ^a	Negativo
<i>P. vivax</i>	93 (91,2)	0	7 (6,9)	2 (2,0)
<i>P. falciparum</i>	1 (1,3)	59 (76,6)	16 (20,8)	1 (1,3)
Mista	0	2 (28,6)	5 (71,4)	0
Negativo	4 (9,3)	4 (9,3)	9 (20,9)	26 (60,5)

^a Infecção mista (*P. falciparum*/*P. vivax*)

Houve uma discordância entre 32 amostras diagnosticadas como monoinfecção ou negativa na MO e infecção mista na qPCR. De forma geral, a qPCR foi capaz de detectar 17 amostras a mais que a MO. Três amostras positivas na MO que não amplificaram na qPCR tiveram amplificação quando utilizado um gene de controle humano, ABO, excluindo a possibilidade de presença de inibidores da PCR. Uma ampla variação nos valores de Cq foi observada, refletindo diferenças na parasitemia das amostras clínicas (Figura 14A). Em geral, os resultados discordantes entre MO e qPCR estavam associados a altos valores de Cq. A maioria das infecções mistas detectadas pela qPCR tiveram valores de Cq acima de 30 ciclos, principalmente para *P. vivax*.

Figura 14. Gráfico de dispersão para os valores de Cq obtidos na qPCR. (A) qPCR das amostras de sangue. As diferentes cores indicam os resultados do diagnóstico pela MO para cada amostra (círculos menores). **(B)** qPCR para as amostras de sangue e saliva para cada amostra (círculos menores). As regiões delimitadas no gráfico indicam onde as amostras de *P. falciparum* (vermelho), *P. vivax* (verde), infecções mistas (laranja) e amostras negativas (azul) devem ser localizadas.



Foram avaliadas 193 amostras pareadas de sangue e saliva na qPCR. A qPCR da saliva foi capaz de amplificar 72% das amostras de *P. vivax* e 79% das amostras de *P. falciparum* que foram positivas nas amostras de sangue (Tabela 19). Foram observados resultados discordantes para as infecções mistas, com uma concordância de apenas 24% entre as amostras de sangue e saliva. De forma surpreendente, a qPCR foi capaz de detectar infecções mistas nas amostras de saliva que não foram detectadas pela MO ou na qPCR para as amostras de sangue. Para estas amostras o Cq médio foi de 33,5 (SD = 1,34) para o ensaio de *P. vivax* e 33,2 (SD = 1,0) para o ensaio de *P. falciparum*. Dessas amostras, quando o DNA obtido de sangue foi testado com o controle humano ABO, todas amplificaram. Como esperado, as amostras de saliva positivas na qPCR apresentaram valores de Cq maiores quando comparados às amostras de sangue (Figura 14B).

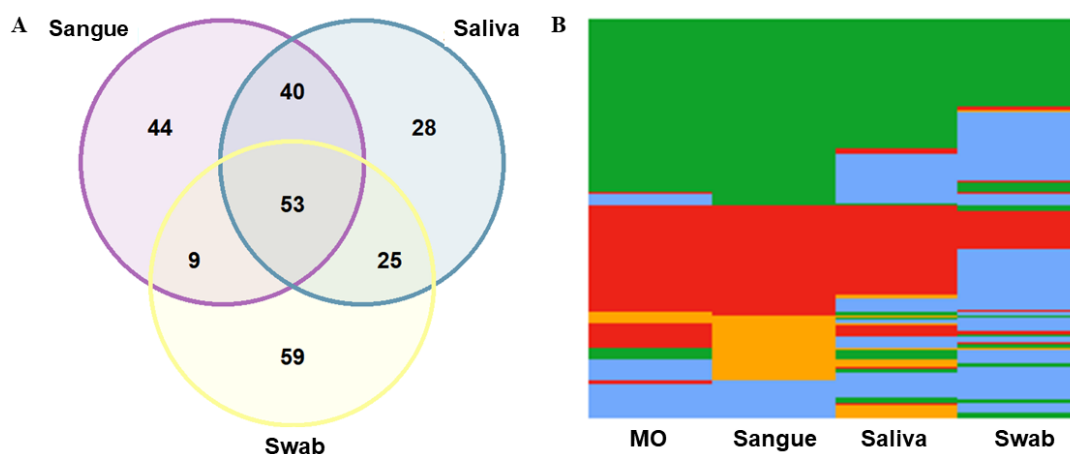
Tabela 19. Resultado para 193 amostras pareadas de sangue e saliva na qPCR.

Sangue	Saliva, n (%)			
	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	Mista ^a	Negativo
<i>P. vivax</i>	64 (71,9)	2 (2,2)	0	23 (25,8)
<i>P. falciparum</i>	1 (1,8)	44 (78,6)	1 (1,8)	10 (17,9)
Mista	5 (15,2)	9 (27,3)	8 (24,2)	11 (33,3)
Negativo	2 (13,3)	1 (6,7)	5 (33,3)	7 (46,7)

^a Infecção mista (*P. falciparum*/*P. vivax*)

Para avaliar o desempenho da qPCR na detecção do *Plasmodium* em diferentes fontes de DNA, 146 amostras pareadas de sangue, saliva e swab foram analisadas. De forma geral houve uma concordância para 53 (36%) amostras (Figura 15A). Resultados similares foram observados para 93 (64%) amostras de sangue e saliva, 62 (42%) de sangue e swab, e 78 (53%) de saliva e swab. A maioria das amostras de swab não amplificou na qPCR, apesar de todas serem positivas quando testadas para o controle humano ABO (Figura 15B). As amostras de sangue e saliva detectaram as mesmas espécies de *Plasmodium* para a maioria das amostras positivas na qPCR (87 de 140). Algumas das infecções mistas foram detectadas apenas no sangue pela qPCR.

Figura 15. Comparação dos resultados obtidos para a qPCR das 146 amostras pareadas de sangue, saliva e swab. (A) Diagrama de Venn demonstrando o número absoluto das concordâncias e diferenças relativas à positividade entre as amostras de sangue, saliva e swab. **(B)** Heatmap dos resultados da MO e qPCR das amostras de sangue, saliva e swab: *P. vivax*, em verde; *P. falciparum*, em vermelho; infecções mistas, em laranja; amostras negativas, em azul.



Posteriormente, a acurácia da qPCR foi estimada para este conjunto de amostras. Para isto, todos os resultados da qPCR foram combinados e definidos como método de referência, ou seja, todas as amostras que amplificaram em qualquer momento na qPCR (para o sangue, saliva ou swab) foram consideradas como positivas para *Plasmodium*. Assim, a sensibilidade da qPCR para o sangue foi 94,3% (isto é, a porcentagem das amostras positivas na MO corretamente identificadas pela qPCR no sangue), seguido por 77,9% na saliva e 47,1% no swab (Tabela 20). A especificidade foi de 100% (ou seja, a porcentagem das amostras positivas na MO corretamente identificadas na qPCR) para sangue, saliva e swab, apesar do baixo número de verdadeiros negativos para este conjunto de amostras. A concordância entre os testes foi avaliada pelo coeficiente Kappa utilizando os resultados da qPCR para os três conjuntos de amostras como método de referência. Todos os testes, com exceção os realizados com a saliva, demonstraram concordância moderada.

Observou-se que a detecção de *Plasmodium* foi eficiente em uma densidade parasitária de ≥ 1.500 parasitos/ μL ($\text{Log}_{10} = 3,18$) no sangue, saliva e swab (69%, 188 de 272) (Figura 16). Por outro lado, as amostras de saliva e swab falharam em amplificar o DNA parasitário para 55% (45 de 82) amostras com baixa parasitemia (<1.500 parasitos/ μL).

Figura 16. Gráfico de densidade por amostra analisada por qPCR de acordo com sua parasitemia. A distribuição em log_{10} da densidade parasitária estimada por MO está representada pelas amostras que amplificaram (PCR +) e que não amplificaram (PCR -) pela qPCR das amostras de sangue (curvas roxas), saliva (curvas azuis) e swab (curvas amarelas). As linhas pontilhadas indicam a densidade parasitária de 1.500 parasitos/ μL ($\text{Log}_{10} = 3,18$).

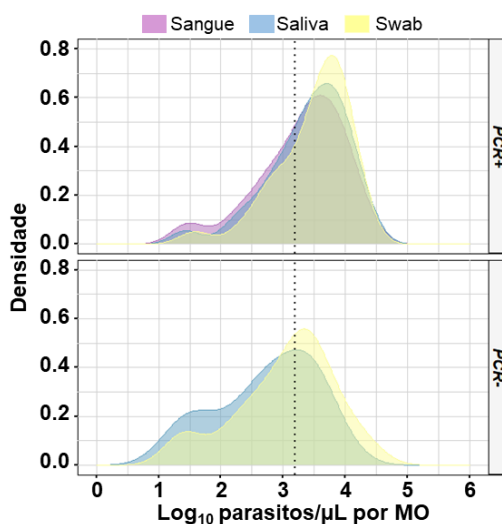


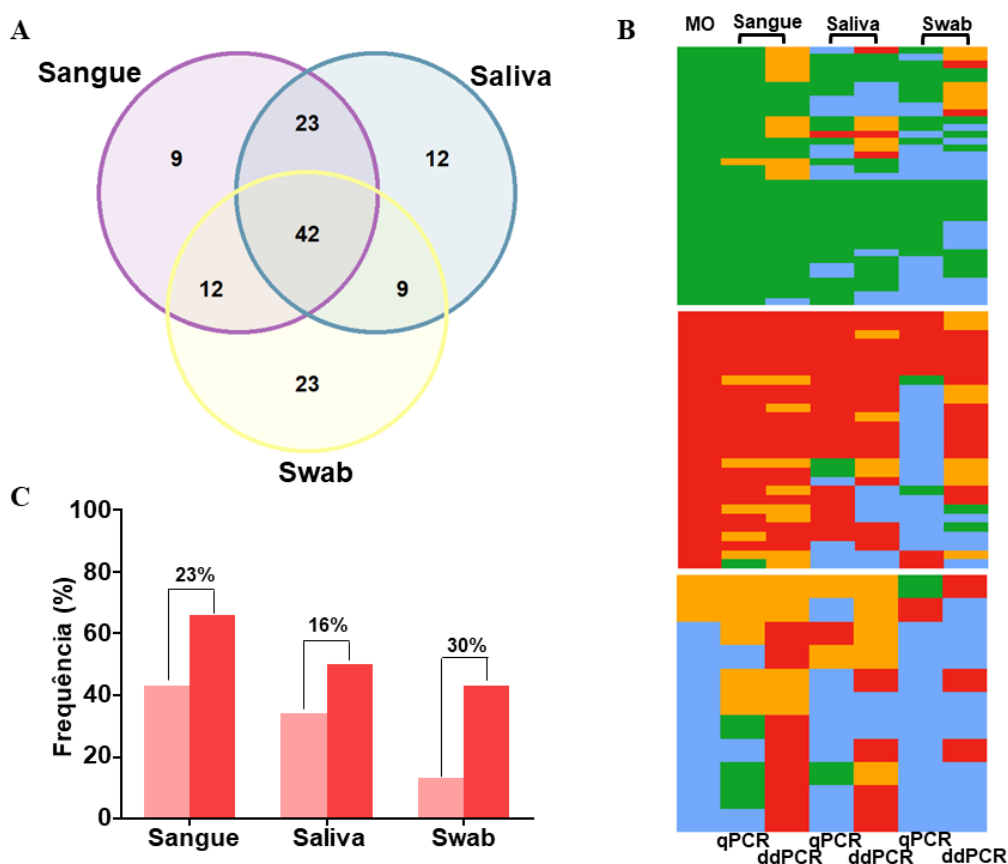
Tabela 20. Determinação da sensibilidade e especificidade dos ensaios de *P. vivax* e *P. falciparum* para as 146 amostras pareadas.

Protocolo	Verdadeiro positivo	Falso positivo	Falso negativo	Verdadeiro negativo	Sensibilidade^a (95% CI)	Especificidade (95% CI)	Kappa (95% CI)
MO	120	1	20	5	85,7% (78,8-91,1)	83,3% (35,9-99,6)	0,27 (0,07-0,48)
Sangue	132	0	8	6	94,3% (89,1-97,5)	100% (54,1-100)	0,57 (0,32-0,83)
Saliva	109	0	31	6	77,9% (70,1-84,4)	100% (54,1-100)	0,22 (0,07-0,38)
Swab	66	0	74	6	47,1% (38,7-55,7)	100% (54,1-100)	0,07 (0,01-0,12)

5.8 Comparação do diagnóstico molecular pela qPCR e ddPCR

Com os resultados do diagnóstico molecular pela qPCR, o desempenho da ddPCR na detecção do *Plasmodium* foi avaliada para 86 amostras pareadas de sangue, saliva e swab. Para este conjunto de amostras, observou-se uma concordância geral de 45% (39 de 86) e 72% (62 de 89) entre as amostras de sangue e saliva. Resultados concordantes foram obtidos para 59% (51 de 86) das amostras de sangue e swab e do mesmo modo, para saliva e swab (Figura 17A).

Figura 17. Comparação dos resultados da qPCR e ddPCR para as amostras pareadas de sangue, saliva e swab. (A) Diagrama de Venn contendo o número absoluto das concordâncias e diferenças referentes à positividade/negatividade pela ddPCR para 86 amostras pareadas de sangue, saliva e swab. (B) Heatmap para os resultados da qPCR e ddPCR das amostras de sangue, saliva e swab: *P. vivax*, em verde; *P. falciparum*, em vermelho; infecções mistas, em laranja; amostras negativas; em azul. Os dados foram agrupados de acordo com os resultados da MO (37 infecções por *P. vivax*, 28 infecções por *P. falciparum* e 11 infecções mistas ou negativas). (C) Proporção de infecções por *P. falciparum* (mono ou infecção mista) detectadas pela qPCR (vermelho claro) e ddPCR (vermelho escuro). As diferenças nas proporções estão indicadas acima das barras.



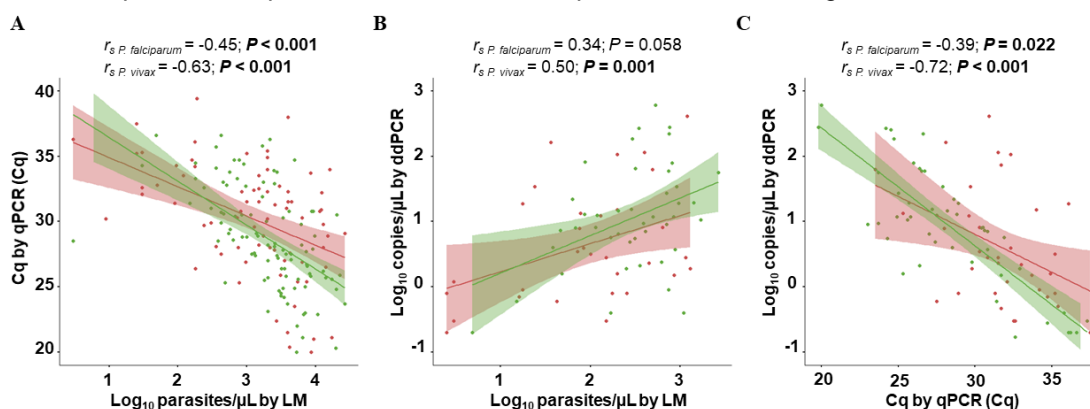
Um subconjunto de 76 amostras foi avaliado pelas duas técnicas usando diferentes fontes de DNA. De forma geral, uma proporção similar de infecção por

Plasmodium foi detectada pela qPCR e ddPCR no sangue (73 e 75, respectivamente) e saliva (55 pela qPCR e 57 pela ddPCR). Entretanto, a ddPCR detectou 16% a mais das infecções no swab (n = 46) comparado à qPCR (n = 34) (Figura 17B). Além disso, um maior número de infecções mistas foi detectado pela ddPCR no sangue (22 e 11 pela ddPCR e qPCR, respectivamente), saliva (9 pela ddPCR e 2 pela qPCR) e swab (14 pela ddPCR e 0 pela qPCR). As diferenças entre esses dois protocolos moleculares foram devido ao maior número de detecção de *P. falciparum* pela ddPCR (Figura 17C).

5.9 Determinação da densidade parasitária por qPCR

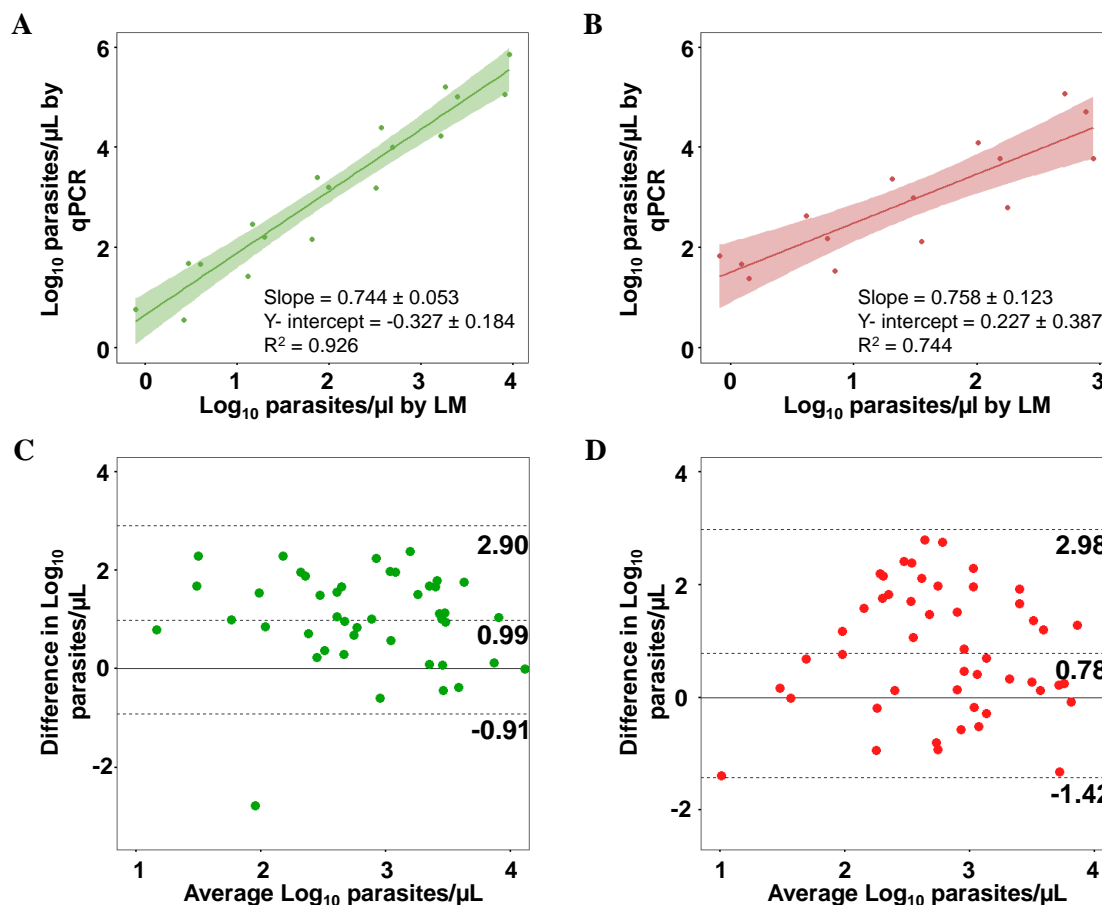
Foi avaliado o nível de concordância das estimativas da densidade parasitária entre os diferentes métodos no sangue. Inicialmente, o Cq obtido pela qPCR foi comparado com a estimativa de densidade parasitária obtida pela MO (parasitos/ μ L) e ddPCR (cópias/ μ L). De forma geral, houve uma correlação moderada entre as estimativas obtidas pelos diferentes métodos no sangue. Para *P. vivax*, uma correlação significativa foi observada para as três análises realizadas (Figura 18A-C). Para *P. falciparum*, não houve correlação entre a densidade estimada obtida pela ddPCR e MO (Figura 18B). A média geométrica da densidade estimada pela ddPCR foi 11,5 cópias/ μ L (95% IC, 6,1 – 21,8 cópias/ μ L) e 4,1 cópias/ μ L (95% IC, 1,8 – 9,4 cópias/ μ L), para *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente.

Figura 18. Análise de correlação entre as faixas de parasitemia estimada por MO e os métodos de diagnóstico molecular. (A) Faixa de parasitemia por MO (parasitos/ μ L) versus Cq. **(B)** Faixa de parasitemia por MO e ddPCR (cópias/ μ L). **(C)** Valor de Cq da qPCR versus faixa de parasitemia pela ddPCR. A correlação de Spearman foi calculada independentemente para as amostras positivas para *P. vivax* (verde) e *P. falciparum* (vermelho). Os valores *p* de <0,05 são mostrados em negrito. As faixas estimadas de parasitemia por MO e ddPCR estão representadas como log base 10.



Considerando que houve uma correlação significativa entre a qPCR e MO para ambas as espécies, a densidade parasitária por qPCR foi estimada como na MO (parasitos/ μ L). Para isso, inicialmente foi determinada a quantidade de número de cópias de plasmídeo que é equivalente à contagem de parasitos no sangue. Assim, os valores de Cq obtidos da curva plasmidial foram associadas aos valores de Cq obtidos das curvas construídas com amostras clínicas com parasitemia determinada por MO. As análises pela regressão linear indicam que 0,5 cópias de plasmídeo correspondem a 1 parasito/ μ L para *P. vivax* (Log_{10} parasitos/ μ L = 0,744 Log_{10} cópias de Pvr47 - 0,327) (Figura 19A). Para *P. falciparum*, 1,7 cópias de plasmídeo é equivalente a 1 parasito/ μ L (Log_{10} parasitos/ μ L = 0,758 Log_{10} cópias de Pfr364 - 0,227) (figura 19B).

Figura 19. Concordância entre a densidade parasitária estimada pela MO e qPCR. (A-B) Análise por regressão linear entre os níveis de parasitemia estimada pela MO e qPCR (Log_{10} parasitos/ μL) para as amostras de *P. vivax* (A) e *P. falciparum* (B). A área sombreada representa o intervalo de confiança de 95% para a linha de regressão. (C-D) Gráficos Bland-Altman de concordância entre as densidades parasitárias estimadas por MO e qPCR em sangue para as amostras de *P. vivax* (C) e *P. falciparum* (D). A linha pontilhada central e as linhas adjacentes representam a região de 95% de concordância.



As densidades parasitárias (parasitos/ μL) foram determinadas para 44 amostras clínicas de *P. vivax* e 52 amostras de *P. falciparum*, utilizando a equação da regressão linear. Para estas amostras, a média geométrica da densidade parasitária detectada pela MO foi de 1.326 parasitos/ μL (95% IC, 771 – 2.280 parasitos/ μL) para *P. falciparum* e 2.137 parasitos/ μL (95% IC, 1.328 – 3.437 parasitos/ μL) para *P. vivax*. Houve uma correlação moderada entre a densidade parasitária estimada pela qPCR no sangue e MO ($\rho = 0,487$, $p = 0,0008$ para *P. vivax*; $\rho = 0,412$, $p = 0,006$ pelo teste Spearman para *P. falciparum*). As estimativas da densidade parasitária pela qPCR foram aproximadamente 5 a 10 vezes menores que a parasitemia estimada pela MO. A média geométrica da densidade parasitária estimada pela qPCR foi de 222

parasitos/ μL (95% IC, 119 – 412 parasitos/ μL) e 256 parasitos/ μL (95% IC, 145 – 452 parasitos/ μL), para *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente.

Uma análise de concordância foi realizada para avaliar o grau de concordância entre a densidade parasitária estimada entre a MO e qPCR no sangue. As diferenças entre as estimativas obtida entre as duas técnicas foram uniformemente dispersas, demonstrando uma concordância similar para todo intervalo de parasitemia avaliado (Figura 19C-D). A diferença média é positiva e estatisticamente significativa para ambas as espécies, 0,99 unidades de log (95% IC, 0,70 – 1,29, $P < 0,001$ pelo teste t pareado) para *P. vivax* e 0,78 unidades de log (95% IC, 0,46 – 1,09, $P < 0,001$ pelo teste t pareado) para *P. falciparum*, implicando que as estimativas da densidade parasitária pela MO são maiores que as da qPCR. Assim, esses valores podem ser usados para ajustar a estimativa da parasitemia no sangue avaliada pela qPCR. O gráfico Bland-Altman para *P. falciparum* demonstra uma maior dispersão na estimativa obtida pela MO e qPCR, como observado pela distância entre os dois limites de concordância (2,98 – 1,39), indicando uma menor concordância com a contagem da MO para essa espécie.

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo da variabilidade genética das proteínas utilizadas nos RDT

Um fator importante no estudo dos métodos diagnósticos da malária é a determinação do perfil de deleção do gene *pfhrp2* e sua variabilidade genética, fatores que podem estar relacionados com a sensibilidade dos RDTs. Os RDTs são largamente utilizados em regiões de difícil acesso a outras técnicas de diagnóstico, tal como a microscopia e a PCR. A acurácia do teste é essencial para o direcionamento do tratamento correto do paciente. Nos últimos anos, estudos vêm relatando a presença de isolados com deleção do gene *pfhrp2*, levando a resultados falso-negativos. Grande parte destes isolados foi identificado em países que fazem fronteira com o Brasil, como o Peru e Venezuela (BAKER et al., 2010; CUNNINGHAM, 2017; GAMBOA et al., 2010; MURILLO SOLANO et al., 2015), além da observação de isolados com deleção no Brasil (GÓES et al., 2021; RACHID VIANA et al., 2017). Por outro lado, o fluxo migratório entre o Brasil e essas regiões é intenso devido a atividades de mineração e extrativismo rural (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Neste trabalho foi avaliado o perfil de deleção do gene *pfhrp2* de 132 amostras de 4 diferentes estados da Amazônia Brasileira. Observou-se que a deleção de *pfhrp2* é presente nestas regiões, no entanto, a proporção de RDTs negativos devido a essas deleções foi muito baixa (1%). De forma geral, 10% das amostras de *P. falciparum* apresentavam deleção no gene *pfhrp2*. Esse resultado foi confirmado pela presença de deleção nas regiões que flanqueiam *pfhrp2*. O estado de Roraima apresentou a maior taxa de deleção (15%), seguido de Mato Grosso (10%) e Rondônia (6%). Estes dados contrastam com o que já foi relatado na Amazônia Brasileira, onde taxas de 32% a 72% foram reportadas no estado do Acre, e 54% a 100% no Amazonas (DORADO; MURILLO; MONTENEGRO, 2012; GÓES et al., 2021; RACHID VIANA et al., 2017). Similar aos nossos resultados, Rachid Viana e colaboradores (2017) reportaram uma baixa proporção de deleção de *pfhrp2* (3%) em Rondônia, no município de Monte Negro.

Este trabalho foi o primeiro a avaliar o perfil de deleção do estado do Amapá, e, embora sendo um número limitado de amostras, nenhuma delas apresentou deleção para o gene *pfhrp2*. O Amapá faz fronteira principalmente com o estado do Pará e a

Guiana Francesa, e estudos anteriores já haviam reportado a ausência de amostras *pfhrp2* negativas nestas duas áreas (RACHID VIANA et al., 2017; TROUVAY et al., 2013). Por outro lado, uma alta proporção de isolados com deleção de *pfhrp2* (15%) foi reportada em Roraima, estado que faz fronteira com a Venezuela e Guiana. As amostras de *P. falciparum* coletadas em Roraima foram principalmente originárias de viajantes ou trabalhadores vindos da Venezuela, um país que tem contribuído de forma significativa para o aumento dos casos de malária nessa região (ARISCO; PETERKA; CASTRO, 2021; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b). Os resultados aqui obtidos enfatizam a necessidade de um sistema de vigilância, particularmente nestas áreas fronteiriças que possuem um maior número de casos de malária.

Apesar da importância do monitoramento da presença de parasitos com deleção de *pfhrp2*, essas análises devem ser realizadas com cautela. Aplicando dois diferentes protocolos de PCR, foi possível observar resultados discordantes na proporção de deleção para as mesmas amostras. Enquanto o protocolo de PCR convencional mostrou uma taxa de 46% de amostras *pfhrp2* negativas, o protocolo baseado na Nested PCR teve apenas uma taxa de 10%. Recentemente, o trabalho de Parr e colaboradores (2018) apontou questões relacionadas à sensibilidade e especificidade dos ensaios de PCR para *pfhrp2*. Os autores mostraram um aumento de 10 vezes no limite de detecção quando a temperatura de alongamento da PCR foi diminuída de 72°C para 60°C (PARR et al., 2018). Por outro lado, por meio da análise de três microssatélites demonstramos que a maioria das infecções eram caracterizadas como infecções policlonais, ou seja, apresentavam clones geneticamente distintos do parasito. Desse modo, em tese, as infecções policlonais podem prejudicar as análises feitas por PCR uma vez que diferentes populações do parasito, com e sem deleção de *pfhrp2*, podem estar presentes na mesma infecção. Adicionalmente, os resultados dos RDTs podem ser influenciados pela presença de parasitos geneticamente distintos com expressão diferencial de PfHRP2 na mesma infecção. Neste trabalho foram encontradas 8 amostras *pfhrp2* negativas, mas positivas no RDT. Entre elas, todas com exceção de uma, continha infecção policlonal. Muito embora esse resultado possa ser explicado pela presença do gene *pfhrp3*, a diversidade das populações de *P. falciparum* também pode resultar na detecção da infecção pelos RDTs.

As amostras analisadas neste estudo cobrem um intervalo de 18 anos (2002 – 2020), o que nos mostra como o perfil de deleção de *pfhrp2* evoluiu com o passar do tempo na Amazônia Brasileira. Aqui foi demonstrado uma proporção moderada (10%) de deleção de *pfhrp2* através dos anos. Em contrapartida, taxas distintas de amostras *pfhrp2* negativas foram reportadas no Peru e Colômbia. Dorado e colaboradores (2016) reportaram uma taxa de 6% em amostras da Colômbia coletadas em diferentes regiões do país entre 2003 e 2010, enquanto que no estudo de Solano e colaboradores (2015) a taxa encontrada foi de 18%, em amostras coletadas de 1999 a 2009 (DORADO et al., 2016; DORADO; MURILLO; MONTENEGRO, 2012; MURILLO SOLANO et al., 2015). De forma similar, dois estudos no Peru reportaram taxas de deleção distintas para amostras coletadas em diferentes regiões do país com uma diferença de 5 anos (GAMBOA et al., 2010; MALTHA et al., 2012). Gamboa e colaboradores (2010) reportaram uma taxa de 41% de deleção (amostras coletadas entre 2003 e 2007), enquanto que Maltha e colaboradores (2012) encontraram uma taxa de 26% de amostras *pfhrp2* negativas. Um sistema de vigilância contínuo poderá oferecer um melhor panorama de como essas taxas de deleção podem se comportar com o passar do tempo em diferentes regiões.

Apesar das sequências de *pfhrp2* apresentarem uma extensa diversidade ao redor do mundo, parece que essa diversidade não tem um papel crucial na performance dos RDTs (ATROOSH et al., 2015; BAKER et al., 2010; KUMAR et al., 2012; WILLIE et al., 2018). Existem evidências que polimorfismos na sequência dos aminoácidos da PfHRP2 podem afetar a sensibilidade dos RDTs apenas em baixas parasitemias (<200 parasitos/ μ L) (BAKER et al., 2010). Para melhor caracterizar a variabilidade de PfHRP2 foi realizado o sequenciamento do gene para amostras de *P. falciparum* de 4 regiões. Assim como já foi reportado previamente em outros países (BAKER et al., 2005, 2010), aqui todas as sequências começaram com a repetição do tipo 1, terminaram com a repetição do tipo 12 e apresentaram principalmente a repetição do tipo 2, 6 e 7. De forma interessante, uma relação significativa já foi descrita entre os tipos de repetição 2 e 7 a uma maior sensibilidade dos RDTs em baixas parasitemias (BAKER et al., 2005; KUMAR et al., 2012).

Neste estudo foram identificados 10 padrões da sequência de PfHRP2 baseados no tipo de repetição e quantidade presentes em cada sequência, onde foi possível

observar que cada um destes padrões foi exclusivo para cada região. A única exceção foi o padrão III encontrado com alta frequência nas amostras de Rondônia e Mato Grosso, coletadas no mesmo período. Cabe salientar que muitas amostras de Mato Grosso eram de indivíduos que possivelmente haviam se infectado em Rondônia. As análises realizadas aqui, que incluíram sequências de PfHRP2 da América do Sul, revelaram que o Brasil e a Guiana Francesa compartilham um perfil similar de variabilidade em PfHRP2, particularmente três padrões (I, V e VI) encontrados predominantemente em Roraima e Amapá. As fronteiras do nordeste do Brasil que incluem estes estados fazem parte do Planalto das Guianas, que inclui o Suriname, Guiana, Guiana Francesa e partes da Colômbia e Venezuela. Essa região é caracterizada por um intenso movimento de trabalhadores em atividades mineradoras ilegais e casos de malária entre as fronteiras (ARISCO; PETERKA; CASTRO, 2021; FERREIRA; CASTRO, 2019). Desse modo, pode se esperar encontrar um intenso fluxo genético e compartilhamento dos padrões de sequências de PfHRP2.

Neste trabalho foram encontrados níveis moderados de deleção de *pfhrp2* em diferentes regiões da Amazônia Brasileira. De forma importante, a presença de isolados *pfhrp2* negativos não resultou na ineficácia dos RDTs. A multiplicidade de infecção pode em parte explicar estes resultados; entretanto, não se pode excluir a possibilidade da reação cruzada com a proteína PfHRP3. O estudo teve como foco o estudo da variabilidade do gene *pfhrp2* uma vez que a proteína PfHRP2 é o principal antígeno reconhecido pelos RDTs. Porém, há evidência de reação cruzada entre PfHRP2 e PfHRP3, demonstrada por alguns anticorpos monoclonais encontrados em RDTs (LEE et al., 2006a). No Brasil, de forma similar ao que tem sido descrito em outros países da América do Sul (40 a 70% de deleção de *pfhrp3*), a proporção de deleção de *pfhrp3* é usualmente alta (35 a 98%) (DORADO et al., 2016; GAMBOA et al., 2010; GÓES et al., 2021; MURILLO SOLANO et al., 2015; RACHID VIANA et al., 2017).

Uma limitação desta parte do trabalho foi a não possibilidade de averiguar os níveis de PfHRP2 por testes sorológicos ou testar uma segunda marca de RDT para confirmar a ausência da proteína. Um achado importante foi a discrepância na proporção da deleção de *pfhrp2* entre os protocolos utilizados, o que reforça a necessidade de se realizar um processo cuidadoso no estudo da deleção gênica. De

forma geral, os resultados aqui encontrados ressaltam a importância do monitoramento contínuo da presença e disseminação de parasitos com deleção de *pfhrp2* na região Amazônica Brasileira para assegurar um melhor desempenho dos RDTs.

6.2 Desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico de malária

Para o desenvolvimento de um diagnóstico molecular mais sensível é necessário o uso de um ensaio capaz de amplificar alvos multicópias, tais como regiões subteloméricas do genoma e o DNA mitocondrial de *Plasmodium*. Além disso, este ensaio deve ser idealmente espécie-específico, uma vez que o tratamento da malária é definido pela espécie do parasito responsável por causar a infecção. Para um melhor desempenho do teste, é importante unir um alvo com múltiplas cópias a uma técnica que ofereça uma boa acurácia diagnóstica. Assim, neste estudo foram desenhados diferentes iniciadores e sondas tendo como alvo o genoma mitocondrial de *Plasmodium*, assim como o uso de alvos nucleares não ribossomais já descritos na literatura para detecção e quantificação do DNA obtido a partir de amostras de sangue, saliva e swab. Duas diferentes metodologias moleculares foram utilizadas: a qPCR e a ddPCR.

Neste trabalho foi avaliada a especificidade de 5 diferentes ensaios tendo como alvo o genoma mitocondrial de *P. vivax* e *P. falciparum*. O ajuste de diferentes parâmetros da qPCR foi realizado no intuito de reduzir as amplificações não específicas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o que é estipulado pelo guia “Informação Mínima para Publicação de Experimentos de qPCR” (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments – MIQE*), documento que dá as diretrizes para obtenção das informações essenciais e desejáveis que devem ser reportadas para permitir ao revisor avaliar a validade do trabalho, e ao leitor, reproduzir o protocolo e os resultados (HUGGETT et al., 2013).

Um amplo painel de amostras clínicas de *Plasmodium* foi utilizado para os ensaios de especificidade. Uma vez que a qPCR, tendo como alvo o genoma mitocondrial, pode ser mais sensível e tem potencial para detectar infecções submicroscópicas, é esperado que também seja capaz de detectar infecções mistas. Desse modo, a exclusão desse tipo de infecção foi essencial para avaliar a especificidade dos

ensaios. Então, amostras de monoinfecção bem caracterizadas com parasitemia conhecida e confirmadas por outros protocolos de PCR foram utilizadas. Apesar de uma extensa avaliação de diferentes parâmetros, todos os ensaios de qPCR para o genoma mitocondrial apresentaram um grau de amplificações inespecíficas para outra espécie de *Plasmodium* ou DNA humano.

Diferentes trabalhos já demonstraram o uso do genoma mitocondrial de *Plasmodium* como sendo um alvo eficiente para o diagnóstico da malária utilizando PCR convencional (ISOZUMI et al., 2015), nested PCR (STEENKESTE et al., 2009) e qPCR (HAANSHUUS et al., 2019). Entretanto, apenas alguns estudos demonstraram um diagnóstico espécie-específico para malária, sendo elas baseado na amplificação isotérmica mediada por *loop* (*loop-mediated isothermal amplification – LAMP*) (BRITTON et al., 2016), PCR (CUNHA et al., 2009) e qPCR (DOS SANTOS et al., 2020; GRUENBERG et al., 2018; SOUZA et al., 2012). Nestes trabalhos, não fica claro se a reatividade cruzada entre as espécies de *Plasmodium* ou humanos não infectados por *Plasmodium* foi avaliada. Apesar de a maioria dos estudos terem avaliado um grande painel de amostras, não havia informação sobre a especificidade desses ensaios, como os testes de reação cruzada ou curva de dissociação nos ensaios que utilizaram intercalantes de DNA.

Para diferenciar as amplificações específicas das inespecíficas baseado nos valores de Cq, um *cutoff* foi estabelecido para cada ensaio aplicando uma análise obtida da curva ROC. Os valores de Cq foram associados a $\geq 90\%$ da especificidade para identificar corretamente os indivíduos que não possuíam malária, e ao mesmo tempo, assegurar um valor de sensibilidade confiável. Entretanto, mesmo a determinação do *cutoff* não foi capaz de excluir por completo os resultados não específicos para a maioria dos ensaios. Isso porque os valores para a sensibilidade e especificidade foram praticamente inversamente proporcionais. A identificação correta das espécies de *Plasmodium* é de grande importância e um dos maiores desafios no diagnóstico da malária, podendo ter um impacto negativo na eficácia do tratamento e prognóstico da doença.

Mesmo os ensaios sendo elaborados em regiões polimórficas do genoma mitocondrial de *Plasmodium*, a amplificação inespecífica com outras espécies de *Plasmodium* e humanos não infectados foram observadas. Neste trabalho, apesar da

série de modificações implementadas em cada ensaio com objetivo de diminuir as amplificações inespecíficas, nenhuma foi capaz de as eliminar. Para alguns ensaios, essas modificações causaram um aumento nos valores de Cq para as amplificações específicas, diminuindo sua sensibilidade. Essa redução pode ter um impacto significativo particularmente na detecção de infecções por *P. vivax* que são frequentemente caracterizadas por baixas parasitemias. Na tentativa de aumentar a especificidade, o aditivo DMSO foi utilizado. Já foi demonstrado que o uso deste aditivo aumenta consideravelmente a sensibilidade e eficiência da polimerização do DNA (SIMONOVIC et al., 2012). O DMSO, dentre outros, interfere nas ligações de hidrogênio, facilitando a separação das fitas de DNA, diminuindo sua temperatura de dissociação e, conseqüentemente, aumentando a especificidade da hibridização dos iniciadores. Porém, mesmo o DMSO reduzindo as amplificações inespecíficas, ele não foi capaz de as eliminar; além disso, seu uso prejudicou a eficiência das amplificações específicas.

O uso do genoma mitocondrial de *Plasmodium* é um atrativo para os protocolos moleculares. Entretanto, como *P. vivax* e *P. falciparum* têm pelo menos 90% de conservação deste genoma, o desenho de iniciadores e sondas espécie-específico é um desafio (MCINTOSH; SRIVASTAVA; VAIDYA, 1998). Este alto grau de conservação pode ser devido a restrições estruturais. Portanto, um teste rigoroso incluindo uma triagem utilizando um painel de amostras bem caracterizadas deve ser realizado para averiguar a existência das amplificações não específicas em todos os ensaios de *Plasmodium* baseados no genoma mitocondrial.

Utilizando o protocolo de qPCR para os alvos Pvr47 e Pfr364, respectivamente, de *P. vivax* e *P. falciparum*, já padronizado por nosso grupo de pesquisa, foi possível observar que a concordância entre a MO e qPCR no sangue foi alta, exceto pelas infecções mistas que foram detectadas preferencialmente na qPCR. Esse resultado reforça os resultados obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa, onde os ensaios de qPCR Pvr47 e Pfr364 são mais sensíveis na detecção de infecções mistas de *P. vivax* e *P. falciparum* em baixas parasitemias (AMARAL et al., 2019). Entretanto, a qPCR não foi capaz de amplificar cinco amostras positivas na MO e, de forma interessante, três amostras com uma baixa parasitemia (<50 parasitos/ μ L) foram detectadas somente pela MO. Devido ao fato da discordância entre a MO e qPCR

estar associado a altos valores de Cq, assume-se que, de forma geral, infecções com baixas parasitemias foi um dos fatores responsáveis por estas discrepâncias entre os dois métodos de detecção. De fato, 58% das amostras discordantes entre a MO e qPCR no sangue tinham parasitemia abaixo de 1.000 parasitos/ μ L. Além disso, foi observado com frequência ampliações tardias com o alvo de *P. vivax* (Pvr47) nas infecções mistas na qPCR. Esse resultado, junto com os dados de que a maioria das discrepâncias foram de mono infecções de *P. falciparum* na MO e infecções mistas na qPCR, sugere uma menor densidade parasitária de *P. vivax* nas infecções mistas aqui analisadas.

A qPCR pode ser facilmente empregada na estimativa de cargas parasitárias; desse modo, este trabalho comparou as estimativas obtidas por MO e qPCR no sangue. De forma consistente com trabalhos já publicados, houve uma discrepância na estimativa entre MO e qPCR, onde a MO apresentou uma maior estimativa da contagem parasitária (ROUGEMONT et al., 2004a; SUTHERLAND; HALLETT, 2009). Foi possível observar que as estimativas pela MO foram em média 6 vezes maiores para *P. falciparum* e 10 vezes maior para *P. vivax*, quando comparada às estimativas da qPCR. Contudo, é importante salientar que houve uma correlação positiva significativa entre as estimativas de densidades parasitárias obtidas pelos dois métodos.

Neste trabalho foi avaliada a detecção de *Plasmodium* utilizando os alvos não ribossomais em amostras de saliva e swab, fontes de DNA que podem ser coletadas de forma não invasiva, tendo diversas vantagens para os pacientes que possuem restrições em relação à coleta de sangue ou que requerem múltiplas coletas para testagem para infecções por *Plasmodium* (DOMOTO et al., 1988; NIR et al., 2003; RAO; SEQUEIRE; PETER, 1997). De forma geral, houve uma boa concordância entre a qPCR da saliva e sangue. Para a saliva, a qPCR amplificou 73% no ensaio de *P. vivax* e 79% para *P. falciparum*, das amostras que foram positivas no sangue. Uma vez que o ensaio de *P. falciparum* amplifica um maior número de cópias no genoma do parasito (DEMAS et al., 2011), isso pode explicar a maior sensibilidade deste alvo na detecção de mono e infecções mistas na qPCR para a saliva.

De forma contrária à saliva, a concordância entre a qPCR das amostras de swab e sangue foi baixa. Como demonstrado anteriormente, a sensibilidade na detecção de

Plasmodium depende do volume de amostra utilizada (HOFMANN et al., 2018). Nosso protocolo incluiu a análise de 1 mL de saliva, o que pode aumentar significativamente a sensibilidade do método quando comparado ao swab. Dos resultados obtidos, ficou claro que a saliva e swab não foram capazes de detectar o DNA parasitário principalmente em baixas parasitemias (<1.500 parasitos/ μ L). As amostras aqui analisadas permaneceram congeladas (-20°C e -80°C) por diferentes períodos de tempo (2-12 meses), até o momento da extração de DNA. Alguns estudos mostram que a qualidade do DNA obtido de saliva pode ser afetado pelo modo da coleta, condições de armazenagem e o protocolo de extração do DNA (GARBIERI et al., 2017). Aqui, não foi realizada uma avaliação sistemática da integridade ou estabilidade da saliva ou swab, em termos de tempo e armazenamento. Entretanto, as análises realizadas sugerem que estes parâmetros não interferiram na sensibilidade do método. Modificações nos procedimentos de coleta e armazenamento das amostras ou no protocolo de extração do DNA, como o uso de kits comercialmente disponíveis com reagentes que estabilizam a saliva antes de sua extração, podem aumentar a sensibilidade do método (GARBIERI et al., 2017).

Observando o limite de detecção utilizando amostras clínicas, a ddPCR foi capaz de detectar menores parasitemias (0,1 parasitos/ μ L) quando comparada à qPCR. A ddPCR também mostrou uma boa consistência de detecção em todos os pontos de diluição testados. Outros trabalhos já avaliaram a robustez e sensibilidade da ddPCR (KOEPLI et al., 2016). No estudo de Koepfli e colaboradores (2016), menos de 1 cópia/ μ L de DNA plasmodial foi detectado na ddPCR cujo alvo era o 18S rRNA. É importante ressaltar que para amostras de campo, assim como para amostras de cultivo de *P. falciparum*, o limite de detecção não ultrapassou o valor de 10^{-1} cópias/ μ L. Outra observação deste grupo foi uma concordância dos limites de detecção para ddPCR e qPCR, quando realizada a quantificação absoluta utilizando plasmídeo. Além disso, foi observada uma concordância moderada entre a ddPCR e MO, como observado no presente estudo. De forma geral, eles observaram uma detecção média de 1,41 cópias/parasito para *P. falciparum*, e 1,05 cópias/ μ L para *P. vivax*. No trabalho de Srisutham e colaboradores (2017), utilizando um ensaio ultrasensível com 1 mL de sangue, a menor taxa de detecção foi de 0,01 parasitos/ μ L para *P. falciparum* (SRISUTHAM et al., 2017). Nesse estudo, os autores não observaram diferença na quantificação pela ddPCR quando realizadas em simplex ou dúplex, muito embora o

limite de detecção pela dúplex foi de 0,16 parasitos/mL e 0,84 parasitos/mL para *P. falciparum* e *P. vivax*, respectivamente.

Aqui, a concordância na detecção de *Plasmodium* foi moderada entre a ddPCR e qPCR para o conjunto de amostras analisadas. Além disso, a ddPCR foi capaz de detectar um maior número de infecções no swab (16% a mais que a qPCR). É importante notar que na ddPCR um maior número de infecções mistas foi detectado no sangue. Curiosamente, no trabalho de Koepfli e colaboradores (2016) uma maior detecção de coinfeções também foi reportada (9% na ddPCR e 4% na qPCR) em amostras de sangue. Este resultado deixa claro que a ddPCR é capaz de detectar um maior número de infecções mistas. A ddPCR ainda tem outras vantagens sobre a qPCR, como a maior resistência a inibidores da PCR. O trabalho de Taylor e colaboradores (2017) demonstrou que as quantificações da ddPCR são menos susceptíveis à inibidores da PCR (TAYLOR; LAPERRIERE; GERMAIN, 2017), assim como no trabalho de Dingle e colaboradores (2013) onde foi observado essa mesma característica utilizando SDS, EDTA e heparina (DINGLE et al., 2013). Desse modo, o uso de amostra com um maior teor de proteínas e compostos orgânicos, como a saliva, não deve ser um empecilho no diagnóstico utilizando a ddPCR.

Outra diferença importante observada foi a maior proporção de infecções por *P. falciparum* detectadas pela ddPCR comparada à qPCR, independente da fonte de DNA. Observou-se uma diferença de detecção de 22, 16 e 26% para o sangue, saliva e swab, respectivamente, entre as duas técnicas. Primeiramente, esse resultado pode ser explicado pelo maior número de cópias que o alvo de *P. falciparum* (Pfr364) é capaz de amplificar no genoma do parasito. Do mesmo modo, uma maior proporção de infecções por *P. falciparum* também foi detectada por Koepfli e colaboradores (2016). No presente estudo foi possível observar que a ddPCR tem uma maior eficiência na detecção do DNA plasmodial em amostras de sangue, saliva e swab, principalmente para infecções mistas e de *P. falciparum*. Outros estudos mostram uma boa concordância entre as duas técnicas, mas é importante ressaltar que estes trabalhos tiveram como alvo o gene ribossomal 18S, que possui um menor número de cópias que os alvos aqui utilizados.

Em suma, o presente estudo traz importantes contribuições para o aprimoramento do diagnóstico da malária no Brasil. Proporções moderadas a reduzidas de deleção

de *pfhrp2* foram observadas nas diferentes regiões da Amazônia Brasileira. Mesmo não refletindo em uma alta porção de RDTs negativos em nosso estudo, esses achados indicam a necessidade de um monitoramento contínuo da performance dos testes baseados na detecção da HRP2, principalmente nas regiões de fronteira. Em relação ao diagnóstico molecular, não foi possível desenvolver um ensaio específico utilizando o genoma mitocondrial de *Plasmodium spp.* A alta conservação da sequência de *P. vivax* e *P. falciparum* deve ser levada em consideração no desenho de ensaios baseados neste genoma. Em contrapartida, o uso dos alvos nucleares multicópias (Pvr47 e Pfr364) na ddPCR e qPCR provou ser eficiente no diagnóstico da malária em amostras de sangue, mesmo em baixas parasitemias. Um resultado importante foi a detecção de uma maior taxa de infecções mistas e infecções por *P. falciparum* na ddPCR, incluindo na saliva e swab. A possibilidade de amplificação do DNA de *Plasmodium* na saliva e swab abre uma nova possibilidade de diagnóstico da malária em amostras não invasivas.

7 REFERÊNCIAS

ABDALLAH, J. F. et al. Prevalence of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 19, 2015.

AKBULUT, E.; CELIK, V.; TURGUT BALIK, D. **Comparative analysis at the nucleotide level of the genes encoding the lactate dehydrogenase enzyme of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum.** *Turkiye Parazitol Derg*, v. 29, n. 3, p. 149-153, 2005

ALEMAYEHU, S. et al. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 277, 2013.

ALVAR, J. et al. Implications of asymptomatic infection for the natural history of selected parasitic tropical diseases. **Seminars in immunopathology**, v. 42, n. 3, p. 231–246, jun. 2020.

ALVARENGA, D. A. M. et al. New potential Plasmodium brasilianum hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 71, 2017.

ALVES, F. P. et al. Asymptomatic Carriers of Plasmodium spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 5, p. 777-779, 2005.

ALVES, F. P. P. et al. High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 6, p. 641-648, 2002. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.641

AMARAL, L. C. et al. Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2019

ARISCO, N. J.; PETERKA, C.; CASTRO, M. C. Cross-border malaria in Northern Brazil. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 135, 2021.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 29, Suppl 1, p. S49–S52, 2008..

ATROOSH, W. M. et al. Genetic variation of pfhrp2 in Plasmodium falciparum isolates from Yemen and the performance of HRP2-based malaria rapid diagnostic test. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 388, 2015.

BAKER, J. et al. Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 870–7, 2005.

BAKER, J. et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. **Malaria journal**, v. 9, p. 129, 2010.

BAKER, M. Digital PCR hits its stride. **Nature Methods**, v. 9, n. 6, p. 541–544, 2012.

BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 209–213, 2003.

BARBOSA, S. et al. Epidemiology of Disappearing Plasmodium vivax Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, e3109, 2014.

BATTLE, K. E. et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of Plasmodium vivax, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10195, p. 332–343, 2019.

BERECZKY, S. et al. Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. **International Journal for Parasitology**, 2004.

BIENVENU, O. J.; EATON, W. W. The epidemiology of blood-injection-injury phobia. **Psychological Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1129-1136, 1998.

BOUSEMA, T. et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected *Plasmodium falciparum* gametocyte carriers. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e42821, 2012.

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

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. p. 112p, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 2015. v. 46, p. 43–2015, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da malária. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. [s.l: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 2020. 2020b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dia mundial de luta contra a malária. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 15, p. 1–27, 2021.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet. Global health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, 2017.

BRITTON, S. et al. Sensitive Detection of *Plasmodium vivax* Using a High-Throughput, Colourimetric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004443, 2016.

BUPPAN, P. et al. Comparative detection of *plasmodium vivax* and *plasmodium falciparum* DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. **Malaria Journal**, v. 9, 72, 2010. doi: 10.1186/1475-2875-9-72

CHEHUAN, Y. F. et al. In vitro chloroquine resistance for *Plasmodium vivax* isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 12, p. 226, 2013.

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

CLSI/NCCLS. **EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline Global Consensus Standardization for Health Technologies**. [s.l: s.n.]. v. 24

CORDRAY, M. S.; RICHARDS-KORTUM, R. R. Review: Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 2, p. 223–230, 2012.

CUNHA, M. G. et al. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 35–38, 2009.

CUNNINGHAM, J. Update on *Plasmodium falciparum* hrp2 / 3 gene deletions. n. March, p. 1–32, 2017. Disponível em < <https://www.who.int/malaria/mpac/mpac-mar2017-hrp2-3-deletions-session7-presentation.pdf>>

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: First description of natural infection of capuchin monkeys (*Cebinae* subfamily) by *Plasmodium simium*. **Malaria Journal** vol. 14, n. 1, p. 606, 2015.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1. p. 1-10, 2018.

DE SANTANA FILHO, F. S. et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 1125–1126, 2007.

DE SOUZA, A. M. et al. Multiple-clone infections of *Plasmodium vivax*: definition of a panel of markers for molecular epidemiology. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 330, 2015.

DEMAS, A. et al. Applied Genomics: Data Mining Reveals Species-Specific Malaria Diagnostic Targets More Sensitive than 18S rRNA. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 49, n. 7, p. 2411–2418, 2011.

DINGLE, T. C. et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. **Clinical chemistry**, v. 59, n. 11, p. 1670–1672, 2013.

DIVIS, P. C. S. et al. A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 344, 2010.

DOMOTO, P. K. et al. Results of a dental fear survey in Japan: implications for dental public health in Asia. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, 1988.

DONDORP, A. M. et al. How to Contain Artemisinin- and Multidrug-Resistant Falciparum. **Malaria Trends in Parasitology**, v. 33, n. 5, p. 353-363. 2017.

DORADO, E. J. et al. Genetic Characterisation of Plasmodium falciparum Isolates with Deletion of the pfhrp2 and/or pfhrp3 Genes in Colombia: The Amazon Region, a Challenge for Malaria Diagnosis and Control. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163137, 2016.

DORADO, E.; MURILLO, C.; MONTENEGRO, M. Plasmodium falciparum lacking histidine rich protein 2 and 3 genes in Colombia. **Malaria Journal**, v. 11, n. Suppl 1, p. P27, 2012.

DOS SANTOS, E. H. et al. A new Real Time PCR with species-specific primers from Plasmodium malariae/P. brasilianum mitochondrial cytochrome b gene. **Parasitology international**, v. 76, p. 102069, 2020.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, 2007.

F. DOMINGOS, M.; TUBAKI, R.; DI SANTI, S. **Malária no Estado de São Paulo 1975 - 2006. SUCEN**, v. 3, 10-12, 2006

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Malaria Situation in Latin América and the Caribbean: Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2013, p. 57–70, 2019.

FRADEJAS, I. et al. Prevalence of submicroscopic malaria infection in immigrants living in Spain. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, 2019. DOI:10.1186/s12936-019-2870-3

GALINSKI, M. R. et al. A reticulocyte-binding protein complex of plasmodium vivax merozoites. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1213–1226, 1992.

GAMA, B. E. et al. Chemoresistance of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasites in Brazil: Consequences on disease morbidity and control. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, Suppl 1, p. 159-166, 2011.

GAMBOA, D. et al. A Large Proportion of P. falciparum Isolates in the Amazon Region of Peru Lack pfhrp2 and pfhrp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, e8091, 2010.

GARBIERI, T. F. et al. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 25, n. 2, p. 147–158, 2017.

GBOTOSHO, G. O. et al. Rapid detection of lactate dehydrogenase and genotyping of Plasmodium falciparum in saliva of children with acute uncomplicated malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 496–501, 2010.

GETHING, P. W. et al. A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, e1814, 2012.

GHAYOUR NAJAFABADI, Z. et al. Detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA in human saliva and urine: Loop-mediated

isothermal amplification for malaria diagnosis. **Acta Tropica**, v. 136, p. 44-49 2014.

GÓES, L. et al. Evaluation of histidine-rich proteins 2 and 3 gene deletions in plasmodium falciparum in endemic areas of the Brazilian Amazon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2021.

GREENWOOD, B. M.; ARMSTRONG, J. R. M. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 2, p. 186–188, 1991.

GRUENBERG, M. et al. Plasmodium vivax molecular diagnostics in community surveys: Pitfalls and solutions. **Malaria Journal**, v. 17, n. 55, p. 1-10, 2018.

GUEIRARD, P. et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18640–18645, 2010.

GUIMARÃES, A. É. et al. Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil: 1 Distribuição por hábitat. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, 1107, 2003.

HAANSHUUS, C. G. et al. Assessment of malaria real-time PCR methods and application with focus on low-level parasitaemia. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0218982, 2019.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/N. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMILTON, J. G. Needle phobia: A neglected diagnosis. **J Fam Pract**, v. 41, n. 2, p. 169-175, 1995.

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. **Malaria Journal**, v. 9, 254, 2010.

HAYDEN, R. T. et al. Comparison of Droplet Digital PCR to Real-Time PCR for Quantitative Detection of Cytomegalovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 540 LP – 546, 2013.

HEDE, M. S. et al. Detection of the Malaria causing Plasmodium Parasite in Saliva from Infected Patients using Topoisomerase I Activity as a Biomarker. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-22378-7.

HERMSEN, C. C. et al. Detection of Plasmodium falciparum malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 247–251, 2001.

HIKOSAKA, K. et al. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 Plasmodium species. **Parasitology international**, v. 60, n. 2, p. 175–180, 2011.

HINDSON, B. J. et al. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8604–8610, 2011.

HINDSON, C. M. et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. **Nature Methods**, v. 10, p. 1003, 2013.

HOFMANN, N. et al. Ultra-Sensitive Detection of Plasmodium falciparum by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets. **PLoS Med**, v. 12, n. 3, e1001788, 2015. doi: 10.1371/journal.pmed.1001788.

HOFMANN, N. E. et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 18, n. 10, p. 1108–1116, 2018.

HOUZÉ, S. et al. Combined deletions of pfhrp2 and pfhrp3 genes result in plasmodium falciparum malaria false-negative rapid diagnostic test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2694–2696, 2011.

HOWARD, R. J. et al. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 4, p. 1269–1277, 1986.

HOWES, R. E. et al. Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 95, 6 Suppl, p. 15-34, 2016. doi: 10.4269/ajtmh.16-0141

HOYER, S. et al. Focused Screening and Treatment (FSAT): A PCR-Based Strategy to Detect Malaria Parasite Carriers and Contain Drug Resistant *P. falciparum*, Pailin, Cambodia. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, e45797, 2012.

HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 18–25, 1992.

HUGGETT, J. F. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 2013.

HUGGETT, J. F.; COWEN, S.; FOY, C. A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 79–88, 2015.

IMWONG, M. et al. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 8, p. 1322–1329, 2016.

ISOZUMI, R. et al. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. **Parasitology international**, v. 64, n. 3, p. 304–308, 2015.

JAUREGUIBERRY, G. et al. PCR detection of *Plasmodium falciparum* by oligonucleotide probes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 4, n. 5, p. 409–414, 1990.

KAIN, K. C. et al. ParaSight®F Test Compared with the Polymerase Chain Reaction and Microscopy for the Diagnosis of *Plasmodium falciparum* Malaria in

Travelers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 1, p. 44–48, 1997.

KAMAU, E. et al. Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71539, 2013.

KAVANAUGH, M. J.; AZZAM, S. E.; ROCKABRAND, D. M. Malaria rapid diagnostic tests: Literary review and recommendation for a quality assurance, quality control algorithm. **Diagnostics**, v. 11, n. 5, 2021.

KILIAN, A. H. D. et al. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, n. 1, p. 3–8, 2000.

KOEPFLI, C. et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). v. 6, p. 39183, 2016.

KÖHNEMANN, S.; PFEIFFER, H. Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 3, p. 216-221, 2011.

KUMAR, N. et al. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian Plasmodium falciparum population: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 298, 2012.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LADEIA-ANDRADE, S. et al. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the amazon basin of Brazil . *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 80, n. 3, p. 452–459, 2009.

LAFERI, H.; KANDEL, K.; PICHLER, H. False Positive Dipstick Test for Malaria. **The New England journal of medicine**, v. 337, n. 3, p. 148–53, 1997.

LEE, M.-A. et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4343–4345, 2002.

LEE, N. et al. Effect of sequence variation in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2773–2778, 2006a.

LEE, N. et al. Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4547–4549, 2006b.

LINDBLADE, K. A. et al. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 6, p. 623–639, 2013.

LLOYD, Y. M. et al. PCR-based detection of Plasmodium falciparum in saliva using mitochondrial cox3 and varATS primers. **Trop Med Health**, v. 46, 22, 2018. doi: 10.1186/s41182-018-0100-2

LUCCHI, N. W. et al. Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era. **Public Health Genomics**, v. 16, n. 1-2, p. 37-43, 2013 2013.

MAGESA, S. M. et al. Diversity of Plasmodium falciparum clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania. **Acta Tropica**, v. 84, n. 2, p. 83-92, 2002.

MAHENDRAN, P. et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the detection of Plasmodium knowlesi and Plasmodium vivax. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 241, 2020.

MALAMUD, D. Saliva as a Diagnostic Fluid. **Dental Clinics of North America**, v. 55, n. 1, 159-178, 2011.

MALTHA, J. et al. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Diagnosis in the Peruvian Amazon: Impact of pfhrp2 Gene Deletions and Cross-Reactions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2012.

MANGOLD, K. A. et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of Plasmodium spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 2005.

MARQUES, M. M. et al. Plasmodium vivax Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 342–347, 2014.

MAZAIKA, E.; HOMSY, J. Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. **Current protocols in human genetics**, v. 82, n. July, p. 7.24.1-7.24.13, 2014.

MCINTOSH, M. T.; SRIVASTAVA, R.; VAIDYA, A. B. Divergent evolutionary constraints on mitochondrial and nuclear genomes of malaria parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 69-80, 1998.

MENARD, D.; DONDORP, A. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 7, a025619, 2017.

MENARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 701–712, 2013.

MERCEREAU-PUIJALON, O.; BARALE, J. C.; BISCHOFF, E. Three multigene families in Plasmodium parasites: Facts and questions. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 11, 1323-1344, 2002.

MFUH, K. O. et al. Detection of Plasmodium falciparum DNA in saliva samples stored at room temperature: Potential for a non-invasive saliva-based diagnostic test for malaria. **Malaria Journal**, Malaria Journal, v. 16, n. 1, 2017. DOI:10.1186/s12936-017-2084-5

MILLER, R. L. et al. Diagnosis of Plasmodium falciparum infections in mummies using the rapid manual ParaSight™-F test. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 31–32, 1994.

MORRISON, T. et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 18, p. e123–e123, 2006.

MOTA, M. M. et al. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141–4, 2001.

MU, D. et al. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 10, p. 2063-2073, 2015.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

MURILLO SOLANO, C. et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombian Parasites. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0131576, 2015.

MURPHY, S. C. et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 3, p. 383–394, 2012.

NIR, Y. et al. Fear of injections in young adults: Prevalence and associations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 3, p. 341-344, 2003.

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

OKELL, L. C. et al. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. **Nature Communications**, v. 3, 1237, 2012. doi: 10.1038/ncomms2241.

OKOTH, S. A. et al. Variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (Pfhrp2) and *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 3 (Pfhrp3) gene deletions in Guyana and Suriname. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

PARR, J. B. et al. Streamlined, PCR-based testing for pfhrp2- and pfhrp3-negative *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 137, 2018.

PFAFFE, T. et al. Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. **Clinical Chemistry**, v. 3, 1237, 2012. doi: 10.1038/ncomms2241.

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

PROUX, S. et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 323, 2011.

RACHID VIANA, G. M. et al. Histidine-rich protein 2 (pfrhp2) and pfrhp3 gene deletions in Plasmodium falciparum isolates from select sites in Brazil and Bolivia. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0171150, 2017.

RAO, A.; SEQUEIRE, P. S.; PETER, S. Characteristics of dental fear amongst dental and medical students. **Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research**, 1997.

ROBERTS, C. H. et al. Development and Evaluation of a Next-Generation Digital PCR Diagnostic Assay for Ocular *Chlamydia trachomatis* Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2195 LP – 2203, 2013.

ROCK, E. P. et al. Comparative analysis of the Plasmodium falciparum histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. **Parasitology**, v. 95, Pt 2, n. 1987, p. 209–27, 1987.

ROSANAS-URGELL, A. et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric Plasmodium species in field samples from Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 361, 2010.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5636-5643, 2004a.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5636-5643, 2004b.

SÁ, J. M. et al. Plasmodium vivax: allele variants of the mdr1 gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains. **Experimental Parasitology**. v. 9, n. 4, p. 256-259, 2005. doi: 10.1016/j.exppara.2004.12.005.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SAÚDE, O. M. DA. Estratégia técnica mundial para o paludismo 2016-2030. **Saúde, Organização Mundial da Saúde**, p. 30, 2015.

SCHNEIDER, P. et al. Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte densities frequently result in mosquito infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 470-474, 2007.

SHARMA, Y. D. Genomic organization, structure and possible function of histidine-rich proteins of malaria parasites. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 471–477, 1988.

SILLENCE, K. A. et al. Fetal Sex and &em>RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1399 LP – 1407, 2015.

SIMONOVIĆ, A. et al. Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and QRT-PCR amplification of low-expressed transgenes. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 865–876, 2012.

SIQUEIRA, A. M. et al. Plasmodium vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, 2016.

SNOUNOU, G. et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 61, n. 2, p. 315–320, 1993.

SOUZA, C. R. T. et al. Prevalence of Plasmodium falciparum and P. vivax in an area of transmission located in Pará State, Brazil, determined by amplification of mtDNA using a real-time PCR assay. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 3409–3413, 2012.

SRISUTHAM, S. et al. Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

STEENKESTE, N. et al. Towards high-throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers. **Malaria journal**, v. 8, p. 86, abr. 2009.

STURM, A.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes into Liver Sinusoids. **Science**, v. 1287, n. 2006, 2006.

SU, X. Z.; WELLEMS, T. E. Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. **Genomics**, v. 33, n. 3, p. 430–444, 1996.

SUTHERLAND, C. J.; HALLETT, R. Detecting malaria parasites outside the blood. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 11, p. 1561–1563, 2009.

TAKESHITA, T. et al. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of *ESR1* mutations in 325 breast cancer specimens. **Translational Research**, v. 166, n. 6, p. 540- 553.e2, 2015.

TAO, D. et al. A saliva-based rapid test to quantify the infectious subclinical malaria parasite reservoir. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 473, eaan4479, 2019. doi: 10.1126/scitranslmed.aan4479.

TAYLOR, S. C.; LAPERRIERE, G.; GERMAIN, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

TE, S. H.; CHEN, E. Y.; GIN, K. Y.-H. Comparison of Quantitative PCR and Droplet Digital PCR Multiplex Assays for Two Genera of Bloom-Forming Cyanobacteria, *Cylindrospermopsis* and *Microcystis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 15, p. 5203 LP – 5211, 2015.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TRAN, T. M. et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. **Malar J**, v. 13, p. 393, 2014.

TROUVAY, M. et al. High Performance of Histidine-Rich Protein 2 Based Rapid Diagnostic Tests in French Guiana are Explained by the Absence of *pfhrp2* Gene Deletion in *P. falciparum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–7, 2013.

TURGUT-BALIK, D. et al. Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 13, p. 1051–1055, 2004.

TURNER, R. J. Mechanisms of Fluid Secretion by Salivary Glands. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, n. 1, p. 24–35, 1993.

VALLEJO, A. F. et al. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 48, 2016.

VINETZ, J. M. et al. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 6, p. 367-371, 1998. doi: 10.1056/NEJM199802053380605

VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. **Forensic Science International**, v. 188, n. 1-3, 1-17, 2009. doi: 10.1016/j.forsciint.2009.02.013.

WAMPFLER, R. et al. Strategies for Detection of Plasmodium species Gametocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e76316, 2013.

WANG, P. et al. Absolute quantification of lung cancer related microRNA by droplet digital PCR. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 836–842, 2015.

WARREN, L. et al. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17807–17812, 2006.

WEISS, D. J. et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of Plasmodium falciparum, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10195, p. 322–331, 2019.

WELLEMS, T. E.; HOWARD, R. J. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of Plasmodium falciparum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 6065–6069, 1986.

WHITE, G. B. Essential malariology (2nd edition). **Parasitology Today**, v. 2, n. 1, p. 28, 2017.

WHITE, N. J. The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria. **Malaria Journal**, v. 7, Suppl 1, S8, 2008. doi: 10.1186/1475-2875-7-S1-S8

WILLIE, N. et al. Insights into the performance of sD bioline malaria ag p.f/Pan rapid diagnostic test and plasmodium falciparum histidine-Rich protein 2 gene variation in Madagascar. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1683–1691, 2018.

WILSON, M. et al. Development of droplet digital PCR for the detection of Babesia microti and Babesia duncani. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 24–31, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New Perspectives: malaria diagnosis. **World Health Organization**, n. October 1999, 2000. Disponível em <https://www.who.int/tdr/publications/documents/malaria-diagnosis.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The use of malaria rapid diagnostic tests. **World Health Organization**, p. 1–20, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2015. **World Health Organization**, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria microscopy quality assurance manual. **World Health Organization**, v. 2, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Malaria Programme; ISBN 978-92-4-156565-3; Malaria; World Health Organization; World malaria report 2018.** [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report.** [s.l: s.n.]. v. WHO/HTM/GM

WRIGHT, S. et al. Fear of needles: Nature and prevalence in general practice. **Australian Family Physician**, 2009.

ZHAO, S. et al. Sensitive detection of Porcine circovirus-2 by droplet digital polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 6, p. 784–788, 21 set. 2015.

8 APÊNDICES

Apêndice 1. Descrição dos protocolos utilizados na avaliação do perfil de deleção, variabilidade e genotipagem de microsatélites.

Gene	Sequência dos iniciadores	Condições da PCR	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>pfhr2</i>	5' CAA AAG GAC TTA ATT TAA ATA AGA G 3' 5' AAT AAA TTT AAT GGC GTA GGC A 3'	0,75 mM de Mg ₂ Cl, 10X de tampão de PCR, 1,25 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 2 µL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 20 µL, consistindo de 34 rodadas de acordo com as seguintes condições: 94°C por 10 min, seguido de 94°C por 50 s, 53°C por 50 s, 72°C por 1 min e uma etapa final à 72°C por 5 min.	809	Baker et al. (2005)
MAL7P1.228	5' AGA CAA GCT ACC AAA GAT GCA GGT G 3' 5' TAA ATG TGT ATC TCC TGA GGT AGC 3'	2,5 mM de Mg ₂ Cl, 5X de tampão de PCR, 2 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1 µL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 10 µL, consistindo de 34 rodadas de acordo com as seguintes condições: 94°C por 3 min, seguido de 94°C por 40 s, 60°C por 40 s, 72°C por 1 min e uma etapa final à 72°C por 5 min.	227	Gamboa et al. (2010)
MAL7P1.230	5' TAT GAA CGC AAT TTA AGT GAG GCA G 3' 5' TAT CCA ATC CTT CCT TTG CAA CAC C 3'	2,5 mM de Mg ₂ Cl, 5X de tampão de PCR, 2 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1 µL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 10 µL, consistindo de 34 rodadas de acordo com as seguintes condições: 94°C por 3 min, seguido de 94°C por 40 s, 60°C por 40 s, 72°C por 1 min e uma etapa final à 72°C por 5 min.	346	
<i>pfhr2</i>	Primário 5' GGT TTC CTT CTC AAA AAA TAA AG 3' 5' TCT ACA TGT GCT TGA GTT TCG 3'	2 mM de Mg ₂ Cl, 10X de tampão de PCR, 1,25 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 µM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 2 µL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 20 µL, consistindo de: 94°C por 5 min, seguido de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 68°C por 30 seg por 30 rodadas e uma etapa final à 68°C por 5 min.	228	Abdallah et al. (2015)

	Nested	5' GTA TTA TCC GCT GCC GTT TTT GCC 3' 5' CTA CAC AAG TTA TTA TTA AAT GCG GAA 3'	2 mM de Mg ₂ Cl ₂ , 10X de tampão de PCR, 1,25 mM de dNTP (Promega), 0,5 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 2 μL de DNA em uma reação de 20 μL, de acordo com as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 95°C por 30 s, 62°C por 30 s, 68°C por 30 seg por 30 rodadas e uma etapa final à 68°C por 5 min.	
	Primário	5' AGA CAA GCT ACC AAA GAT GCA GGT G 3' 5' TAA ATG TGT ATC TCC TGA GGT AGC 3'	2 mM de Mg ₂ Cl ₂ , 5X de tampão de PCR, 2 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1 μL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 10 μL, de acordo com as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 95°C por 30 s, 60°C por 30 s, 68°C por 30 seg por 30 rodadas e uma etapa final à 68°C por 5 min.	
MAL7P1.228	Nested	5' CCA TTG CTG GTT TAA ATG TTT TAA G 3' 5' TAA ATG TGT ATC TCC TGA GGT AGC 3'	2 mM de Mg ₂ Cl ₂ , 5X de tampão de PCR, 2 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 1 μL de DNA em uma reação de volume de 10 μL, de acordo com as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 95°C por 30 s, 63°C por 30 s, 68°C por 30 seg por 30 rodadas e uma etapa final à 68°C por 5 min.	198
	Primário	5' GAT ATC ATT AGA AAA CAA GAG CTT AG 3' 5' TAT CCA ATC CTT CCT TTG CAA CAC C 3'	1 mM de Mg ₂ Cl ₂ , 5X de tampão PCR, 2 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 2 μL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 10 μL, de acordo com as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 95°C por 30 s, 63°C por 30 s, 68°C por 30 seg por 30 rodadas e uma etapa final à 68°C por 5 min.	
MAL7P1.230	Nested	5' TAT GAA CGC AAT TTA AGT GAG GCA G 3' 5' TAT CCA ATC CTT CCT TTG CAA CAC C 3'	1 mM de Mg ₂ Cl ₂ , 5X de tampão de PCR, 2 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 2 μL de DNA em uma reação de volume de 10 μL, de acordo com as seguintes condições: 94°C por 5 min, seguido por 95°C por 30 s, 65°C por 30 s, 68°C por 30 seg por 30 rodadas e uma etapa final à 68°C por 5 min.	301

Polya	5' AAA ATA TAG ACG AAC AGA 3' 5' ATC AGA TAA TTG TTG GTA 3'	1,5 mM de Mg ₂ Cl, 10X de tampão PCR, 1,25 mM de solução de dNTP (Promega), 0,5 µM de cada iniciador, 0,1 U de <i>Taq</i> DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e 2 µL de DNA (~10 ng) em uma reação de volume de 15 µL, consistindo de 40 rodadas de acordo com as seguintes condições: 94°C por 2 min, seguido por 94°C por 30 s, 47°C por 30 s, 72°C por 40 s e uma etapa final à 72°C por 3 min.	223	Su and Wellems (1996)
PfPK2	5' CTT TCA TCG ATA CTA CGA 3' 5' AAA GAA GGA ACA AGC AGA 3'		167	
TA87	5' AAT GGC AAC ACC ATT CAA C 3' 5'ACA TGT TCA TAT TAC TCA C 3'		111	
Gene	Sequência dos iniciadores	Condições da PCR	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>pfhr2</i>	5' CAA AAG GAC TTA ATT TAA ATA AGA G 3' 5' AAT AAA TTT AAT GGC GTA GGC A 3'	0,5 µL de BigDye Terminator, 1 µL de tampão de BigDye Terminator 5X, 0,5 µM de cada iniciador e DNA de acordo com seu tamanho, em uma reação de volume de 10 µL, consistindo de 35 rodadas de acordo com as seguintes condições: 96°C por 1 min, seguido por 96°C por 15 s, 58°C por 15 s e 60°C por 4 min.	809	Baker et al. (2005)



A Comprehensive Analysis of the Genetic Diversity of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (PfHRP2) in the Brazilian Amazon

OPEN ACCESS

Edited by:
 Ashley Vaughan,
 Seattle Children's Research Institute,
 United States
Reviewed by:
 Lemu Golassa,
 Addis Ababa University, Ethiopia
 Gustavo Fontecha,
 National Autonomous University of
 Honduras, Honduras
***Correspondence:**
 Tais Nóbrega de Sousa
 tais.sousa@focruz.br

[†]These authors have contributed
 equally to this work and
 share first authorship

[‡]These authors have contributed
 equally to this work and
 share last authorship
Specialty section:
 This article was submitted to
 Parasite and Host,
 a section of the journal
*Frontiers in Cellular and Infection
 Microbiology*
Received: 16 July 2021**Accepted:** 19 August 2021**Published:** 21 September 2021**Citation:**
 Costa GL, Mascarenhas MEP,
 Martin TOG, Fortini LG,
 Louzada J, Pereira DB,
 Aguiar ACC, Carvalho LH,
 de Brito CFA, Fontes CJF
 and de Sousa TN (2021) A
 Comprehensive Analysis of the
 Genetic Diversity of *Plasmodium
 falciparum* Histidine-Rich Protein 2
 (PfHRP2) in the Brazilian Amazon.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:742681.
 doi: 10.3389/fcimb.2021.742681

Gabriel Luiz Costa^{1†}, Maria Eduarda Pereira Mascarenhas^{1†},
 Thamires Oliveira Gasquez Martin², Laura Guimarães Fortini¹, Jaime Louzada³,
 Dhélio Batista Pereira⁴, Anna Caroline Campos Aguiar⁵, Luzia Helena Carvalho¹,
 Cristiana Ferreira Alves de Brito¹, Cor Jesus Fernandes Fontes^{2‡}
 and Tais Nóbrega de Sousa^{1*‡}

¹ Molecular Biology and Malaria Immunology Research Group, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Belo Horizonte, Brazil, ² Hospital Universitário Júlio Müller, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, Brazil, ³ Federal University of Roraima, Boa Vista, Brazil, ⁴ Center for Research in Tropical Medicine (Cepem), Porto Velho, Brazil, ⁵ Bioscience Department, University of São Paulo, Santos, Brazil

Early diagnosis and treatment are fundamental to the control and elimination of malaria. In many endemic areas, routine diagnosis is primarily performed microscopically, although rapid diagnostic tests (RDTs) provide a useful point-of-care tool. Most of the commercially available RDTs detect histidine-rich protein 2 (HRP2) of *Plasmodium falciparum* in the blood of infected individuals. Nonetheless, parasite isolates lacking the *pfhrp2* gene are relatively frequent in some endemic regions, thereby hampering the diagnosis of malaria using HRP2-based RDTs. To track the efficacy of RDTs in areas of the Brazilian Amazon, we assessed *pfhrp2* deletions in 132 *P. falciparum* samples collected from four malaria-endemic states in Brazil. Our findings show low to moderate levels of *pfhrp2* deletion in different regions of the Brazilian Amazon. Overall, during the period covered by this study (2002-2020), we found that 10% of the *P. falciparum* isolates were characterized by a *pfhrp2* deletion. Notably, however, the presence of *pfhrp2*-negative isolates has not been translated into a reduction in RDT efficacy, which in part may be explained by the presence of polyclonal infections. A further important finding was the discrepancy in the proportion of *pfhrp2* deletions detected using two assessed protocols (conventional PCR versus nested PCR), which reinforces the need to perform a carefully planned laboratory workflow to assess gene deletion. This is the first study to perform a comprehensive analysis of PfHRP2 sequence diversity in Brazilian isolates of *P. falciparum*. We identified 10 PfHRP2 sequence patterns, which were found to be exclusive of each of the assessed regions. Despite the small number of PfHRP2 sequences available from South America, we found that the PfHRP2 sequences identified in Brazil and neighboring French Guiana show similar sequence patterns. Our findings highlight the importance of continuously monitoring the occurrence and spread of parasites with *pfhrp2* deletions, while also taking

into account the limitations of PCR-based testing methods associated with accuracy and the complexity of infections.

Keywords: malaria, *Plasmodium falciparum*, *pfhrp2* deletion, rapid diagnostic test (RDT), genetic diversity

INTRODUCTION

Between 2000 and 2019, malaria-related deaths worldwide were reduced by 44%, from 736,000 in 2000 to 409,000 in 2019 (World Health Organization, 2020). Nevertheless, the spread of the COVID-19 pandemic to all malaria-endemic countries was responsible for the disruption of essential malaria services (World Health Organization, 2020). This has compromised the WHO global strategy, which had been designed to reduce the incidence of malaria and mortality rates by at least 90% by 2030 (World Health Organization, 2015). In 2020, Brazil reported approximately 141,000 cases of malaria (84% caused by *Plasmodium vivax* and 16% by *Plasmodium falciparum*) (BRASIL. Ministério da Saúde, 2021). Although these numbers represent a reduction in the total number of cases of *P. vivax*, there was a 32.6% increase in *P. falciparum* cases when compared with 2019.

Early diagnosis and treatment are fundamental components of strategies designed to control and eliminate malaria. In many endemic areas, the routine diagnosis is primarily performed microscopically. Nonetheless, the rapid diagnostic tests (RDTs) provide a useful tool when microscopy facilities are unavailable, particularly in remote areas and in the absence of a well-trained professionals (BRASIL. Ministério da Saúde, 2009). RDTs can be used to detect specific *Plasmodium* antigens in the blood stream, such as histidine-rich protein 2 (HRP2) and lactate dehydrogenase (LDH) (World Health Organization, 2016). The sensitivity of RDTs is dependent on detection of the target protein; however, since the 2000s, isolates with deletion of the gene *pfhrp2* gene have been reported in Africa and South America (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010; Gamboa et al., 2010; Houzé et al., 2011). In Brazil, *pfhrp2* deletions have been reported in some endemic states, such as Acre, Rondônia, and Amazonas (Rachid Viana et al., 2017; Góes et al., 2021).

PfHRP2 comprises different types of histidine and alanine repeats (Rock et al., 1987). An extensive study conducted by the Malaria RDT Quality Assurance Program reported a high variability in the *pfhrp2* sequence of isolates from Asia and the southwest Pacific (Baker et al., 2005; Lee et al., 2006), and it was subsequently proposed that certain types of alanine/histidine repeats were associated with variations in the sensitivity of RDTs, interfering with the test efficacy (Baker et al., 2005; Lee et al., 2006). However, other studies have shown contrasting data concerning the effect of PfHRP2 variability on RDT efficacy (Baker et al., 2010; Kumar et al., 2012; Atroosh et al., 2015; Willie et al., 2018).

In recent years, reports of *pfhrp2* deletions have increased, including 16 reports from 15 endemic countries only between 2019 and 2020 (World Health Organization, 2020). The WHO is

currently tracking these publications to monitor *pfhrp2* deletions and recommends that countries conduct representative baseline surveys among suspected malaria cases with false-negative RDT results (World Health Organization, 2020). In this study, we evaluated the proportion of *pfhrp2* deletion in *P. falciparum* isolates from four malaria-endemic states of the Brazilian Amazon (Amapá, Mato Grosso, Rondônia and Roraima state) over a period of 18 years (2002 – 2020). RDT results were interpreted considering the *pfhrp2* profile, parasitemia, and complexity of infection. Additionally, a comprehensive analysis of PfHRP2 sequence variability was conducted for parasite isolates from South America.

MATERIALS AND METHODS

Study Population and Parasite Isolates

In this study, we assessed *P. falciparum* samples collected from four Brazilian states over differing periods of time: 11 samples from Macapá (Amapá state, AP) in 2004; 40 from Cuiabá (Mato Grosso state, MT) between 2002 and 2012; 33 from Porto Velho (Rondônia state, RO) between 2008 and 2018; and 48 from Boa Vista (Roraima state, RR) between 2018 and 2020 (Table 1). Among these locations, Cuiabá/MT lies within a region in which malaria is in the pre-elimination phase, and thus most individuals were infected elsewhere (mainly in Rondônia and Pará states). The patients included in this study were symptomatic and had sought treatment provided by the local public health services. *Plasmodium* spp. infection was confirmed by microscopy based on Giemsa-stained thick blood smears evaluated by well-trained microscopists in accordance with the malaria diagnosis guidelines of the Brazilian Ministry of Health. Samples collected in Rondônia and Roraima states were tested using the SD Bioline Malaria Ag P.f/Pan test (Abbott, Inc.; Korea) according to the manufacturer's instructions. Samples of dried blood from Mato Grosso were tested using SD Bioline Malaria Ag P.f (Standard Diagnostics, Inc.; Korea).

Confirmation of *P. falciparum* Infection by Quantitative PCR (qPCR)

Genomic DNA was extracted from 300 µL of whole blood samples collected in EDTA using a Gentra Puregene blood kit (Qiagen, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions and eluted in 50 µL of DNA hydration solution. Molecular diagnosis was performed for all samples to confirm the *P. falciparum* infection. Species-specific quantitative PCR assays targeting a multi-copy target (non-ribosomal Pvr47/Pfr364 sequences) were carried out as previously described (Amaral et al., 2019).

TABLE 1 | Description of 132 *Plasmodium falciparum*-infected patients enrolled in this study, *pfrp2* deletion profile and RDT result.

Site	N	Year of sample collection	N° isolates <i>pfrp2</i> -negative	N° RDT-negative ^a (Total)	Male gender ^b (%)	Age ^b , mean (SD)	Parasitemia ^c , geometric mean (95% CI)
Amapá	11	2004-2005	0	0 (3)	81.8	32 (11)	1,561 (781 – 3,119)
Mato Grosso	40	2002-2012	4	0 (23)	86.8	35 (14)	1,848 (924 – 3,694)
	28	2002-2007	4	0 (11)			
Roraima	12	2008-2012	0	0 (12)	75.0	38 (11)	1,486 (766 – 2,881)
	33	2008-2018	2	2 (25)			
	7	2008	0	NA			
Roraima	26	2017-2018	2	2 (25)	72.9	35 (11)	1,545 (961 – 2,770)
	48	2018-2020	7	2 (43)			
Total	132	2002-2020	13	4 (94)	78.3	36 (12)	1,617 (1,151 – 2,273)

NA, Not available; SD, Standard deviation.

^aPfHRP2-based RDT.

^bData calculated using all samples from the region.

^cParasites/μL.

Characterization of the *pfrp2* Gene

To assess *pfrp2* (PF3D7_0831800) deletion, we amplified exon 2 of this gene using the primers described by Baker et al. (2005). In addition, the amplification of the two *pfrp2* flanking genes, MAL7P1.230 (PF3D7_0831900) and MAL7P1.228 (PF3D7_0831700), was performed as described by Gamboa et al. (2010). *pfrp2* and the flanking genes were amplified using single-round PCR protocols. To confirm the results obtained, a nested PCR was performed on the same samples (Abdallah et al., 2015). This protocol amplifies the exon 1, the intron, and exon 2 of *pfrp2*. The amplification of MAL7P1.230 and MAL7P1.228 was also assessed by the nested PCR, as described by Abdallah et al. (2015). The primers and PCR conditions used for amplification are listed in **Supplementary Table 1**. All samples with negative reactions were re-amplified to confirm the gene deletion. The results of both protocols were compiled to characterize the deletion profiles of the analyzed samples. Thus, when one of the protocols yielded a positive reaction, the presence of the gene was reported independently of the protocol applied. Given the low amounts of DNA for many of the samples, only *pfrp2*-negative samples were subjected to PCR to assess the presence of *pfrp3* (PF3D7_1372200) and its flanking genes, MAL13P1_475 (PF3D7_1372100) and MAL12P1_485 (PF3D7_1372400). Amplification of *pfrp3* and the two flanking genes was performed using the single-round PCR protocols described by Baker et al. (2005) and Gamboa et al. (2010), respectively. The laboratory line 3D7 was used as a positive control for the PCR analyses of *pfrp2*, *pfrp3*, and their respective flanking genes.

DNA Sequencing and PfHRP2 Sequence Analysis

The primers described by Baker et al. (2005) were used for *pfrp2* sequencing (**Supplementary Table 1**). PCR products were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) and then sequenced using an ABI 3730xL DNA analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All samples were sequenced at least twice using forward and reverse primers. Nucleotide sequences were aligned and translated into amino acids using the Mega X software (Kumar et al., 2018). The amino acid repeat types were identified

using a numeric code according to Baker et al. (2005; 2010). We extended the variability analysis to samples from other South American countries, examining sequences from Peru (accession numbers AY816272; FJ871164; FJ871352, and FJ871353) (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010), Suriname (accession number FJ871350) (Baker et al., 2010), Colombia (accession numbers FJ871211 and FJ871254) (Baker et al., 2010), French Guiana (accession numbers KC558574 and KC558602) (Trouvay et al., 2013) and Brazil (accession numbers FJ871160, FJ871209, FJ871210, AY816292-AY816295, and AY816240) (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010).

Analysis of *P. falciparum* Population Diversity

To determine whether the infections were mono- or polyclonal, three microsatellites were genotyped using the ABI 3730xL DNA analyzer, namely, *Polya*, *PfPK2*, and *TA87* (Su and Wellems, 1996). The primers used in the PCR protocol are listed in **Supplementary Table 1**, and the electrophoresis products were analyzed using GeneMapper™ software version 4.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For electropherogram analysis, the minimum peak height was set to 200 arbitrary fluorescence units. Additionally, to exclude artifact peaks, we used a cut-off value for minor peak detection of one-third the height of the predominant peak. Population genetics analyses were performed based on the predominant allele at each locus (i.e., that showing the highest electrophoretic peak). The expected heterozygosity (H_E), mean number of alleles per locus, and allele frequencies were calculated using Arlequin v.3.5 software (Excoffier et al., 2007). The multiplicity of infection (MOI) was calculated by dividing the total number of alleles by the number of samples for each marker.

RESULTS

Deletion Profile of *pfrp2* and Its Flanking Genes

In this study, we analyzed *pfrp2* deletion profiles in 132 samples collected from individuals in four states within the Brazilian Amazon, who were established to have clinical malaria caused by

P. falciparum. All subjects were diagnosed with *P. falciparum* infection at enrollment based on a microscopic examination of samples, with subsequent confirmation by molecular diagnosis. Most patients were men with a mean age of 36 years (SD = 12 years) (Table 1).

We analyzed the presence of the *pfhrp2* gene using two PCR protocols, namely, conventional and nested PCRs. Only samples that were successfully amplified for molecular diagnosis were included in this analysis. The results obtained using both protocols were compiled to characterize the deletion profiles of the analyzed samples. The results revealed that none of the samples obtained from individuals in Amapá state (n = 11) had a *pfhrp2* deletion (Figure 1 and Table 1), whereas 6% (2 of 33) of the samples collected from Rondônia were found to be *pfhrp2*-negative. However, higher frequencies of *pfhrp2* deletion were observed among the samples collected in Roraima (14.6%, 7 of 48) and Mato Grosso (10%, 4 of 40). All samples from Mato Grosso with *pfhrp2* deletion were collected prior to 2007 (Table 1), whereas in contrast, in Rondônia and Roraima, gene deletion was detected in samples collected more recently. Considering all samples assayed in this study, the *pfhrp2* deletion rate reached 10% (13 of 132), and notably, approximately the same proportion of deletions (10%) was detected for samples collected in each of the two periods of survey, before and after 2008. Furthermore, we detected several types of deletion profile based on analyses of *pfhrp2* and the two flanking genes (Table 2), with the upstream gene MAL7P1.230 being the most frequently absent.

In total, 94 (71%) samples were tested using RDT, only four (4.3%) of which were negative for *P. falciparum* infection (Table 1). One of the 94 samples (1.1%) detected negative based

on RDT and had a *pfhrp2* deletion. Nonetheless, this sample also had a very low parasitemia (20 parasites/ μ L) (Figure 2).

For the 84 samples with available parasitemia counts, most RDT-negative samples had low parasitemia (range = 20–1,500 parasites/ μ L) (Figure 2). Of note, eight samples characterized as *pfhrp2*-negative were detected by RDT (Figure 2 and Supplementary Table 2). Preliminary analysis based on conventional PCR revealed that these samples were *pfhrp3*-negative. RDT data were unavailable for the remaining four *pfhrp2*-negative samples.

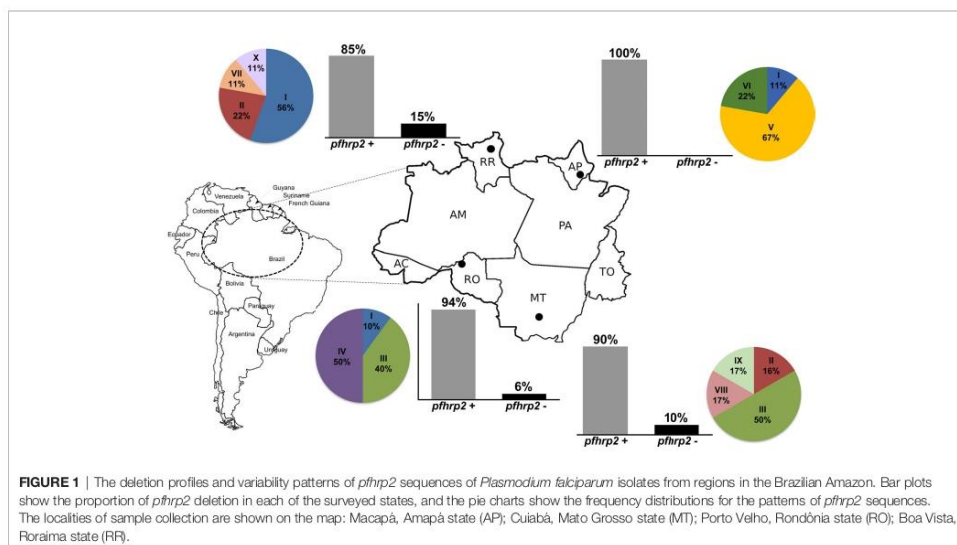
Comparison of the *pfhrp2* Deletion Profiles Determined Using Different Protocols

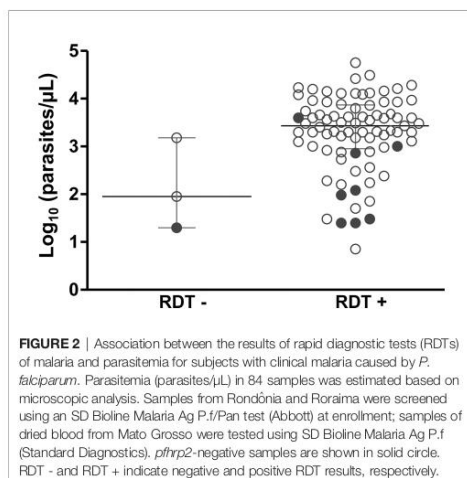
Initially, we analyzed the *pfhrp2* and flanking genes using conventional PCR (Protocol 1) with previously described primers (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010). The results revealed that a large proportion of the isolates were characterized by complete deletions (Figure 3). To confirm these findings, we reanalyzed the same samples using the nested PCR protocol (Protocol 2) described

TABLE 2 | Distinct profile of *pfhrp2* deletions found in the samples analyzed.

MAL7P1_230	<i>pfhrp2</i>	MALP1_228	N (%) ^a
Present	Present	Present	69 (51.5%)
Absent	Present	Present	45 (33.6%)
Absent	Present	Absent	3 (2.2%)
Present	Present	Absent	2 (1.5%)
Absent	Absent	Absent	6 (4.5%)
Absent	Absent	Present	5 (3.7%)
Present	Absent	Absent	2 (1.5%)

^aDeletion profiles are in bold.





by Abdallah et al. (2015). A comparison of the two protocols revealed a significant difference in the detected *pfhrp2* deletion rates (46% for Protocol 1 vs. 10% for Protocol 2). Moreover, there was essentially no reproducibility between the protocols for samples with low parasitemia (geometric mean = 1,795 parasites/µL, 95% CI = 1,131–2,847 for samples with concordant results vs. geometric mean = 1,304, 95% CI = 776–2,190 for samples with discordant results, $P = 0.166$, as determined using the Mann-Whitney test).

Genetic Diversity of *P. falciparum* Samples

The genetic diversity among geographically discrete *P. falciparum* populations was characterized by genotyping three polymorphic microsatellites (*TA87*, *Polyα*, and *PfPK2*). Owing to insufficient amounts of sample DNA to perform all molecular assays, only 99 (75%) of the total 132 samples were successfully genotyped (the allele frequencies are given in **Supplementary Table 2**). We accordingly established that most infections were polyclonal (62 of 99), with multiplicity of infection (MOI) varying from 1.06 to 1.66 (**Table 3**). Overall, the parasite population studied was found to be highly diverse, with a total heterozygosity index of 0.708 (SD = 0.093). Among the four populations, the genetic diversity was observed to be higher in the states of Roraima and Rondônia, as indicated by the mean number of alleles per locus and heterozygosity indices (**Table 3**). In contrast, *P. falciparum* populations from Mato Grosso state were characterized by low genetic diversity with a lower number of alleles per locus and heterozygosity index.

Ten of the 13 samples with a *pfhrp2* gene deletion were successfully genotyped, and all but one sample was characterized by a polyclonal infection (**Supplementary Table 3**). Among these 10 samples, nine were tested using RDT, and only a single sample with very low parasitemia (20 parasites/µL) was found to be negative. Notably, the mono-clonal infection was positive for RDT.

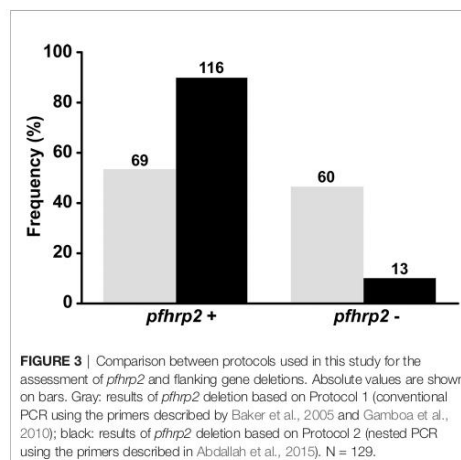


TABLE 3 | Proportion of multiplicity of infection and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* populations from 4 endemic areas of the Brazilian Amazon.

Population	No. of isolates	MOI	No. of alleles per locus, mean \pm SD	Within-population Diversity (H_d), mean \pm SD
Amapá	11	1.06	2.6 \pm 1.1	0.527 \pm 0.191
Mato Grosso	9	1.66	2.0 \pm 1.7	0.250 \pm 0.433
Rondônia	33	1.20	6.0 \pm 2.0	0.636 \pm 0.192
Roraima	46	1.27	5.3 \pm 2.5	0.595 \pm 0.111

HRP2 Sequence Variability

Overall, the *pfhrp2* gene was successfully amplified from 34 samples and thereafter subjected to amino acid repeat type analysis as described by Baker et al. (2005; 2010). Notably, amino acid repeat compositions were found to be similar for all regions analyzed (**Table 4**), with the sequences of all samples starting with a type 1 repeat (AHHAAHVAD) and ending with a type 12 repeat (AHHAAHHEAATH). Repeat types 2 (AHHAAHHAAD) and 7 (AHHAAAD) were shown to have the highest number of repeat units per sample, whereas other repeat types were rarely present, such as type 4 (AHH), which was observed only in Mato Grosso samples. Repeat types 9 (AAY), 11 (AHN), 13 (AHHASD), and 14 (AHHAAHATD) were absent from all regions.

On the basis of the types and numbers of repeat units present in PfHRP2, we defined 10 distinct sequence patterns (patterns I to X in **Figure 4**) in the *P. falciparum* isolates sequenced in this study (**Figure 1**). The predominant pattern tended to differ among regions (**Figure 1**), with only Rondônia and Mato Grosso states having a common sequence (pattern III) at high frequency, which was present in samples collected during the same period from 2006 to 2008.

By analyzing the PfHRP2 sequences of isolates from other South America countries, we found pattern I to be the most

TABLE 4 | Repeat types and number of repeat units in *pfhrp2* gene for 34 *Plasmodium falciparum* isolates from the Brazilian Amazon region.

Region	Minimum and maximum number of repeat units ^a													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Amapá (N = 9)	4-6	9	1-2	0	2	3-4	6-10	1	0	2-3	0	1	0	0
Mato Grosso (N = 6)	2-4	9-12	2	0-1	0-2	3-6	8-11	0-1	0	0-3	0	1	0	0
Rondônia (N = 10)	2-4	9-12	1-2	0	1-2	2-4	8-9	1	0	0-2	0	1	0	0
Roraima (N = 9)	2-4	9-12	2	0	0-2	3-5	8-11	0-1	0	0-3	0	1	0	0

^aAmino acid repeat types were identified as previous described (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010).

prevalent pattern in Brazil and French Guiana (Table 5). However, the lack of available data precludes us from drawing conclusions regarding the diversity of PfHRP2 sequences in other countries.

DISCUSSION

Deletion of *pfhrp2/3* in the *P. falciparum* genome raises concerns regarding the efficacy of RDTs, given that parasites characterized by such deletions may not be identified by RDTs that are based on the detection of histidine-rich protein 2 (HRP2). According to WHO guidelines, the threshold for RDT change is a *pfhrp2* deletion rate greater than 5% causing false-negative RDT results (World Health Organization, 2020). In the present study, we assessed the *pfhrp2* deletion profile of 132 samples from four different states of the Brazilian Amazon. Our findings revealed that although the deletion of this gene is present in these regions, the proportion of false-negative RDT results attributable to *pfhrp2* deletion appears to be very low (1%). These findings can be attributed to polyclonal infections, owing to the presence of genetically distinct parasites differing in PfHRP2 expression that infect the same host. However, at this time we cannot exclude the possibility of cross-reactivity with PfHRP3.

Overall, 10% of the *P. falciparum* isolates analyzed were found to have a *pfhrp2* deletion, which was confirmed by the finding that most isolates were also frequently characterized by deletions of the genes flanking *pfhrp2*. Isolates in samples collected from Roraima

TABLE 5 | Frequencies of PfHRP2 sequence patterns of *Plasmodium falciparum* isolates from South America.

Patterns	Frequency (%)				
	Brazil	French Guiana	Colombia	Peru	Suriname
I	11 (26.2)	16 (55.2)	0	0	0
II	3 (7.1)	0	0	0	0
III	8 (19.0)	0	0	1 (25.0)	0
IV	6 (14.3)	0	0	0	0
V	6 (14.3)	4 (13.8)	0	0	0
VI	2 (4.8)	3 (10.3)	0	0	0
VII	1 (2.4)	0	0	0	0
VIII	1 (2.4)	1 (3.5)	0	0	0
IX	1 (2.4)	0	0	0	0
X	1 (2.4)	0	0	0	0
XI	1 (2.4)	1 (3.5)	0	0	0
XII	1 (2.4)	0	0	0	1 (100.0)
XIII	0	0	0	2 (50.0)	0
XIV	0	0	0	1 (25.0)	0
XV	0	0	1 (50.0)	0	0
XVI	0	0	1 (50.0)	0	0
XVII	0	3 (10.3)	0	0	0
XVIII	0	1 (3.5)	0	0	0
Total	42	29	2	4	1

were found to have the highest proportion (15%) of *pfhrp2* gene deletion, followed by the Mato Grosso (10%), and Rondônia (6%) isolates. These findings contrast with previous observations in other areas of the Brazilian Amazon, with rates of 32% to 72% and 54% to 100% being reported in the states of Acre and Amazonas, respectively (Rachid Viana et al., 2017; Góes et al., 2021).

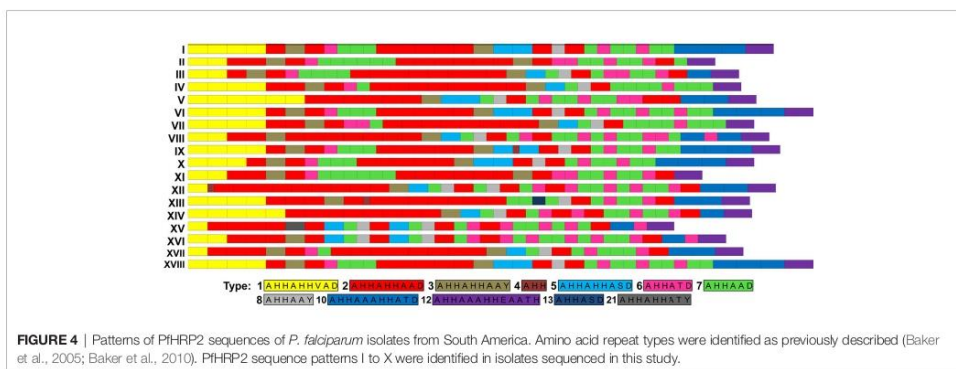


FIGURE 4 | Patterns of PfHRP2 sequences of *P. falciparum* isolates from South America. Amino acid repeat types were identified as previously described (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010). PfHRP2 sequence patterns I to X were identified in isolates sequenced in this study.

More consistent with our present findings, Rachid Viana et al. (2017) reported a low proportion (3%) of *pfhrp2* deletions in Rondônia state for isolates sampled in the Monte Negro municipality. We and others have also found that the MAL7P1_230 gene flanking *pfhrp2*, which encodes a *Plasmodium* exported protein (PHIST) of unknown function (<https://plasmodb.org/>), is frequently deleted in Brazilian samples (range = 21%–45%) (Rachid Viana et al., 2017), whereas the other flanking gene, MAL7P1_228, encoding for a putative heat shock 70 protein, was less frequently deleted (range = 0.5%–11%) in the same samples.

The present study is the first to assess the deletion profile of *pfhrp2* in isolates from Amapá state, and although we were only able to analyze a relatively few samples, none of these showed deletions of this gene. Consistently, previous studies in the neighboring Brazilian state of Pará and French Guiana have reported the absence of *pfhrp2* deletions in isolates obtained from both areas (Trouvay et al., 2013; Rachid Viana et al., 2017). In contrast, as previously mentioned, we detected a high proportion of *pfhrp2*-negative isolates (15%) from Roraima state, which borders Guyana and Venezuela, and notably, *P. falciparum* samples collected in Roraima were mainly obtained from travelers or workers originating from Venezuela, a country that has contributed significantly to an increase in imported cases of malaria in this region (BRASIL. Ministério da Saúde, 2020; Arisco et al., 2021). Our findings accordingly underscore the need for constant surveillance, particularly in this area, which has been established to have the highest number of cross-border malaria cases in Brazil.

Despite the importance of monitoring for the presence of parasites with a *pfhrp2* deletion, we showed that the data obtained requires careful analysis. By applying two well-established PCR-based protocols, we found discrepancies in the results obtained regarding the proportions of *pfhrp2* deletion in the same samples. Specifically, whereas the protocol based on conventional PCR indicated a 46% deletion, that based on nested PCR indicated a rate of only 10%. In this context, Parr et al. (2018) recently addressed issues concerning the sensitivity and specificity of PCR assays for *pfhrp2*. The authors demonstrated a tenfold improvement in the limit of detection when the extension temperature of the PCR protocol was lowered from 72°C to 60°C (Parr et al., 2018). In the present study, based on an analysis of three polymorphic microsatellite locus, we showed that most infections were characterized by multiple clones of genetically distinct variants of the parasite. We accordingly speculate that such polyclonal infections may complicate analyses using PCR-based testing methods, given that different parasite populations with and without *pfhrp2* may be present in the same infected individual. For example, polyclonal infections can confound reporting of the true proportion of gene deletions, whereas RDT results may be influenced by the presence of genetically distinct parasites with varying degrees of PfHRP2 expression in the same infection. We detected eight samples with *pfhrp2* deletions and positive results in the RDT; among these, all but one sample harbored polyclonal infections. Preliminary data based on conventional PCR indicated that these samples were *pfhrp3*-negative. However, a method of greater sensitivity needs to be employed to enable a more definitive conclusion regarding *pfhrp3* deletion. Thus, even though this result

could be explained in terms of the presence of *pfhrp3*, the diversity of *P. falciparum* populations within the infections could also result in parasite detection by RDTs.

The samples analyzed in this study were collected over a period of 18 years (2002–2020), and thus the results obtained provide an indication of how the *pfhrp2* deletion profile has evolved over the years in the Brazilian Amazon. During the assessed period, we detected a moderate and relatively consistent proportion (10%) of *pfhrp2* deletions. In contrast, differing rates of *pfhrp2* deletion have previously been reported in Peru and Colombia. For example, Dorado et al. (2016) recorded a deletion rate of 6% in samples from Colombia collected from different sites between 2003 and 2010, whereas rates reaching up to 18% were detected in samples collected from 1999 to 2009 in a study conducted by Murillo Solano et al. (2015) (Dorado et al., 2012; Murillo Solano et al., 2015; Dorado et al., 2016). Similarly, in Peru, two studies reported distinct deletion rates for samples collected at different sites approximately 5-years apart, with Gamboa et al. (2010) reporting a 41% of deletion (samples collected between 2003 and 2007), whereas Maltha et al. (2012) detected 26% *pfhrp2*-negative isolates (2010 and 2011). Continuous surveillance will provide a clearer picture of how the proportions of gene deletions change over time and across regions.

Although the sequences of *pfhrp2* tend to show considerable diversity worldwide, this variability does not appear to have a substantial influence on the performance of RDTs (Baker et al., 2010; Kumar et al., 2012; Atroosh et al., 2015; Willie et al., 2018). There is, however, evidence to indicate that polymorphisms in the amino acid sequence of PfHRP2 may affect RDT sensitivity at very low parasite densities (<200 parasites/μL) (Baker et al., 2010). To better characterize the variability of PfHRP2, we sequenced the genes of *P. falciparum* isolates representative of the four regions assessed in the present study. As has previously been reported for isolates from other countries (Baker et al., 2005; Baker et al., 2010), we found that all sequences started with a type 1 repeat, ended with a type 12 repeat, and comprised mainly type 2, 6, and 7 repeats. Interestingly, in this regard, a significant relationship has been described between the number of type 2 and 7 repeats and RDT sensitivity at low parasitemia (Baker et al., 2005; Kumar et al., 2012). Nonetheless, there is a yet no consensus regarding this association, and it remains to be established how PfHRP2 variability affects RDT performance (Baker et al., 2010; Kumar Bharti et al., 2017).

We identified 10 distinct patterns of the PfHRP2 sequence based on the type and number of histidine/alanine repeat units present in each sequence, which were mostly exclusive of each region. The only exception in this regard was the pattern III, which was observed at a high frequency in isolates from Rondônia and Mato Grosso collected during the same period. Notably, however, many samples collected in Mato Grosso were from individuals who were probably infected in Rondônia. The high genetic diversity of the parasite population from Roraima was associated to a high variability of PfHRP2. In contrast, for samples collected in the other states, there was not a straightforward association between levels of diversity of parasite and PfHRP2. A comparison of the Brazilian PfHRP2

sequences obtained in the present study with those identified in other South American countries revealed that sequences with similar profiles have been detected in Brazil and French Guiana, particularly the three patterns (I, V, and VI) found predominantly in Roraima and Amapá states. The northeast borders of Brazil that include these two states comprise the “Guiana shield”, along with Suriname, Guyana, French Guiana, and parts of Colombia and Venezuela. This region is characterized by large-scale movements of illegal gold miners and a large number of cross-border malaria cases (Ferreira and Castro, 2019; Arisco et al., 2021). Hence, we might expect to detect extensive gene flow and common patterns of PfHRP2 sequences.

In conclusion, we detected low to moderate levels of *pfhrp2* deletion in different regions of the Brazilian Amazon. Importantly, the presence of *pfhrp2*-negative isolates has not been translated into a reduction in the efficacy of RDTs. We believe that these observations can be attributed, at least in part, to the multiplicity of infection in individuals; although at present, we cannot exclude the possibility of cross-reaction with PfHRP3. We have focused on describing the variability of *pfhrp2* in the Brazilian Amazon, given that PfHRP2 is the main antigen targeted by most RDTs. However, there is evidence to indicate that some monoclonal antibodies used in PfHRP2-based RDTs show cross-reactivity to PfHRP2 and PfHRP3 (Lee et al., 2006). In Brazil, similar to the findings reported from other South American countries (40%–70% of *pfhrp3* deletion), the proportion of *pfhrp3* deletions is typically very high (35%–98%) (Gamboia et al., 2010; Murillo Solano et al., 2015; Dorado et al., 2016; Rachid Viana et al., 2017; Góes et al., 2021). One of the limitations of the present study is that we were unable to assess PfHRP2 levels or the performance of a second brand of RDT to confirm initial results indicating a lack of the protein. Nevertheless, an important finding in this respect was the discrepancy we identified in the proportions of *pfhrp2* deletion detected using two different PCR protocols, which reinforces the need to pay particular attention to laboratory workflows when seeking to assess gene deletions. Taken together, our findings highlight the importance of continuously monitoring the presence and spread of parasites with a *pfhrp2* deletion in the Amazon region to ensure optimal RDT performance.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: GenBank MZ773486, MZ773487, MZ773488, MZ773489, MZ773490, MZ773491, MZ773492, MZ773493, MZ824674, MZ824675, MZ824676, MZ824677, MZ824678, MZ824679, MZ824680, MZ824681, MZ824682, MZ824683, MZ824684, MZ824685, MZ824686, MZ824687, MZ824688, MZ824689, MZ824690, MZ824691, MZ824692, MZ824693, MZ824694, MZ824695, MZ824696, MZ824697, MZ824698, MZ824699.

ETHICS STATEMENT

The ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings of the René Rachou Institute (N° 2.243.058), according to the Brazilian National Council of Health (Resolutions 196/96 and 466/12). All adult participants signed a written informed consent, whereas next of kin, caretakers, or guardians signed on the behalf of the minors/children enrolled in the study. All the methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TS and CJF were the principal investigators. MM, TM, and LF performed the PCR analysis. GC and MM performed sequencing and genotyping analysis. TS, CJF, GC, JL, DP, and AA helped carry out the field work. TS, CJF, CFA, LC, DP, AA, JL, and GC participated in interpretation of the data and critical revisions of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (RSTMH Small Grants 2016), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa para Inserção de Recém-Doutores nos Programas de Pós-Graduação da Fiocruz and the Programa PrInt-Fiocruz-CAPEs. TS, CJF, CFA, and LC are CNPq Research Productivity fellows. GLC thanks the FAPEMIG for scholarship support. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication. This study was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) - Finance Code 001.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all the patients who participated in this study, and Hospital Universitário Júlio Müller (MT), CEPEM (RO), and Policlínica Cosme e Silva (RR) teams. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities at René Rachou Institute: Real-Time PCR Facility (RPT09D) and Sanger Sequencing Facility (RPT01E).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.742681/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abdallah, J. F., Okoth, S. A., Fontecha, G. A., Torres, R. E. M., Banegas, E. I., Matute, M. L., et al. (2015). Prevalence of Pfhpr2 and Pfhpr3 Gene Deletions in Puerto Lempira, Honduras. *Malar. J.* 14, 19. doi: 10.1186/s12936-014-0537-7
- Amaral, L. C., Robortella, D. R., Guimarães, L. F. F., Limongi, J. E., Fontes, C. J. F., Pereira, D. B., et al. (2019). Ribosomal and non-Ribosomal PCR Targets for the Detection of Low-Density and Mixed Malaria Infections. *Malar. J.* 18, 154. doi: 10.1186/s12936-019-2781-3
- Arisco, N. J., Peterka, C., and Castro, M. C. (2021). Cross-Border Malaria in Northern Brazil. *Malar. J.* 20, 135. doi: 10.1186/s12936-021-03668-4
- Atrooshi, W. M., Al-Mekhlafi, H. M., Al-Jasari, A., Sady, H., Al-Delaimy, A. K., Nasr, N. A., et al. (2015). Genetic Variation of Pfhpr2 in Plasmodium Falciparum Isolates From Yemen and the Performance of HRP2-Based Malaria Rapid Diagnostic Test. *Parasitol. Vectors* 8, 388. doi: 10.1186/s13071-015-1008-x
- Baker, J., Ho, M.-F., Pelecanos, A., Gatton, M., Chen, N., Abdullah, S., et al. (2010). Global Sequence Variation in the Histidine-Rich Proteins 2 and 3 of Plasmodium Falciparum: Implications for the Performance of Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Malar. J.* 9, 129. doi: 10.1186/1475-2875-9-129
- Baker, J., McCarthy, J., Gatton, M., Kyle, D. E., Belizario, V., Luchavez, J., et al. (2005). Genetic Diversity of Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Protein 2 (Pfhpr2) and its Effect on the Performance of PfHRP2-Based Rapid Diagnostic Tests. *J. Infect. Dis.* 192, 870–877. doi: 10.1086/432010
- BRASIL. Ministério da Saúde (2009). *Manual De Diagnóstico Laboratorial Da Malária*. Brasília: Ministério da Saúde 112p.
- BRASIL. Ministério da Saúde (2020). *Boletim Epidemiológico 2020*. Brasília: Ministério da Saúde.
- BRASIL. Ministério da Saúde (2021). Dia Mundial De Luta Contra a Malária. *Bol. Epidemiol.* 52, 1–27.
- Dorado, E., Murillo, C., and Montenegro, M. (2012). Plasmodium Falciparum Lacking Histidine Rich Protein 2 and 3 Genes in Colombia. *Malar. J.* 11, P27. doi: 10.1186/1475-2875-11-S1-P27
- Dorado, E. J., Okoth, S. A., Montenegro, L. M., Diaz, G., Barnwell, J. W., Udhayakumar, V., et al. (2016). Genetic Characterisation of Plasmodium Falciparum Isolates With Deletion of the Pfhpr2 and/or Pfhpr3 Genes in Colombia: The Amazon Region, A Challenge for Malaria Diagnosis and Control. *PLoS One* 11, e0163137. doi: 10.1371/journal.pone.0163137
- Excoffier, L., and Lischer, H.E. L. (2010). Arlequin Suite ver 3.5: A New Series of Programs to Perform Population Genetics Analyses Under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564–567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Ferreira, M. U., and Castro, M. C. (2019). Malaria Situation in Latin America and the Caribbean: Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. *Methods Mol. Biol.* 2013, 57–70. doi: 10.1007/978-1-4939-9550-9_4
- Gamboia, D., Ho, M.-F., Bendezu, J., Torres, K., Chiodini, P. L., Barnwell, J. W., et al. (2010). A Large Proportion of P. Falciparum Isolates in the Amazon Region of Peru Lack Pfhpr2 and Pfhpr3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. *PLoS One* 5, e8091. doi: 10.1371/journal.pone.008091
- Góes, L., Chamma-Siqueira, N., Peres, J. M., Nascimento, J. M., Valle, S., Arcanjo, A. R., et al. (2021). Evaluation of Histidine-Rich Proteins 2 and 3 Gene Deletions in Plasmodium Falciparum in Endemic Areas of the Brazilian Amazon. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 1–9. doi: 10.3390/ijerph18010123
- Houzé, S., Hubert, V., Le Pessec, G., Le Bras, J., and Clain, J. (2011). Combined Deletions of Pfhpr2 and Pfhpr3 Genes Result in Plasmodium Falciparum Malaria False-Negative Rapid Diagnostic Test. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2694–2696. doi: 10.1128/JCM.00281-11
- Kumar Bharti, P., Singh Chandel, H., Krishna, S., Nema, S., Ahmad, A., Udhayakumar, V., et al. (2017). Sequence Variation in Plasmodium Falciparum Histidine Rich Proteins 2 and 3 in Indian Isolates: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. *Sci. Rep.* 7, 1308. doi: 10.1038/s41598-017-01506-9
- Kumar, N., Singh, J. P., Pande, V., Mishra, N., Srivastava, B., Kapoor, R., et al. (2012). Genetic Variation in Histidine Rich Proteins Among Indian Plasmodium Falciparum Population: Possible Cause of Variable Sensitivity of Malaria Rapid Diagnostic Tests. *Malar. J.* 11, 298. doi: 10.1186/1475-2875-11-298
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lee, N., Baker, J., Andrews, K. T., Gatton, M. L., Bell, D., Cheng, Q., et al. (2006). Effect of Sequence Variation in Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Protein 2 on Binding of Specific Monoclonal Antibodies: Implications for Rapid Diagnostic Tests for Malaria. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2773–2778. doi: 10.1128/JCM.02557-05
- Maltha, J., Gamboa, D., Bendezu, J., Sanchez, L., Cnops, L., Gillet, P., et al. (2012). Rapid Diagnostic Tests for Malaria Diagnosis in the Peruvian Amazon: Impact of Pfhpr2 Gene Deletions and Cross-Reactions. *PLoS One* 7, 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0043094
- Murillo Solano, C., Akinyi Okoth, S., Abdallah, J. F., Pava, Z., Dorado, E., Incardona, S., et al. (2015). Deletion of Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Protein 2 (Pfhpr2) and Histidine-Rich Protein 3 (Pfhpr3) Genes in Colombian Parasites. *PLoS One* 10, e0131576. doi: 10.1371/journal.pone.0131576
- Parr, J. B., Anderson, O., Juliano, J. J., and Meshnick, S. R. (2018). Streamlined, PCR-Based Testing for Pfhpr2- and Pfhpr3-Negative Plasmodium Falciparum. *Malar. J.* 17, 137. doi: 10.1186/s12936-018-2287-4
- Rachid Viana, G. M., Akinyi Okoth, S., Silva-Flannery, L., Lima Barbosa, D. R., Macedo de Oliveira, A., Goldman, I. F., et al. (2017). Histidine-Rich Protein 2 (Pfhpr2) and Pfhpr3 Gene Deletions in Plasmodium Falciparum Isolates From Select Sites in Brazil and Bolivia. *PLoS One* 12, e0171150. doi: 10.1371/journal.pone.0171150
- Rock, E. P., Marsh, K., Saul, A. J., Welles, T. E., Taylor, D. W., Maloy, W. L., et al. (1987). Comparative Analysis of the Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in Malaria Parasites of Diverse Origin. *Parasitology* 95 (Pt 2), 209–227. doi: 10.1017/S003118200057681
- Su, X. Z., and Welles, T. E. (1996). Toward a High-Resolution Plasmodium Falciparum Linkage Map: Polymorphic Markers From Hundreds of Simple Sequence Repeats. *Genomics* 33, 430–444. doi: 10.1006/geno.1996.0218
- Trouvay, M., Palazon, G., Berger, F., Volney, B., Blanchet, D., Faway, E., et al. (2013). High Performance of Histidine-Rich Protein 2 Based Rapid Diagnostic Tests in French Guiana are Explained by the Absence of Pfhpr2 Gene Deletion in P. Falciparum. *PLoS One* 8, 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0074269
- Willie, N., Mehlotra, R. K., Howes, R. E., Rakotomanga, T. A., Ramboarina, S., Ratsimbaoa, A. C., et al. (2018). Insights Into the Performance of sD Bioline Malaria Ag P.F/Pan Rapid Diagnostic Test and Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Protein 2 Gene Variation in Madagascar. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 98, 1683–1691. doi: 10.4269/ajtmh.17-0845
- World Health Organization (2015). *Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030*. (Geneva: World Health Organization.), 1–35. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991_eng.pdf?ua=1.
- World Health Organization (2016). *Malaria Microscopy Quality Assurance Manual*, version 2. (Geneva: World Health Organization) Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204266>.
- World Health Organization (2020). *World Malaria Report 2020: 20 Years of Global Progress and Challenges*. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Costa, Mascarenhas, Martin, Fortini, Louzada, Pereira, Aguiar, Carvalho, de Brito, Fontes and de Sousa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Apêndice 3. Artigo redigido a partir dos resultados da padronização dos alvos mitocondriais e submetido na revista *Malaria Journal*.

Malaria diagnosis based on mitochondrial targets: Challenges and Pitfalls

Gabriel Luíz Costa^f, Denise Anete Madureira de Alvarenga^{1}, Gabriela Assis¹, Anielle de Pina-Costa^{2,3,4,5}, Cesare Bianco Júnior^{3,4}, Anna Caroline Campos Aguiar⁶, Jaime Louzada⁷, Dhélio Batista Pereira⁸, Ana Júlia Dutra Nunes⁹, Julio Cesar de Souza Junior¹⁰, Zelinda Maria Braga Hirano^{9,10}, Sílvia Bahadian Moreira¹¹, Alcides Pissinatt¹¹, Patricia Brasil^β, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro^{3,4}, Taís Nóbrega de Sousa¹, Cristiana Ferreira Alves de Brito^{1*}*

¹Grupo de Pesquisa em Biologia Molecular e Imunologia da Malária, Instituto René Rachou (IRR), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte/MG, 30190-009, Brazil;

²Laboratório de Pesquisa Clínica em Doenças Febris Agudas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, 21040-360, Brazil;

³Centro de Pesquisa, Diagnóstico e Treinamento em Malária (CPD-Mal), Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, 21040-360, Brazil;

⁴Laboratório de Pesquisa em Malária, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, 21040-360, Brazil;

⁵Faculdade de Medicina de Teresópolis (FMT), Centro Universitário Serra dos Órgãos (Unifeso), Teresópolis/RJ, 25964-004, Brazil;

⁶Departamento de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), Santos/SP, Brazil;

⁷Universidade Federal de Roraima (UFRR), Boa Vista/RR, Brazil;

⁸Centro de Pesquisas em Medicina Tropical, Porto Velho/RO, Brazil;

⁹Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial, Indaial/SC, 89130-000, Brazil;

¹⁰ Universidade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau/SC, 89012-900, Brazil;

¹¹ Centro de Primatologia do Rio de Janeiro (CPRJ/INEA), Guapimirim/RJ, 25940-000, Brazil;

*GLC and DAMA contributed equally to this work.

** Corresponding author Dr. Cristiana Ferreira Alves de Brito¹, Laboratório de Malária, Instituto René Rachou, Fiocruz Minas. Av. Augusto de Lima 1715, CEP 30.190-009, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, E-mail – cristiana.brito@fiocruz.br.

Abstract

High-copy genomic sequences could be used as PCR targets for the detection of malaria infections, providing increased sensitivity over single- or low-copy genes. Mitochondrial genome of malaria parasites has multiple copies in a single mitochondrion, and many mitochondria per cell. Here, we describe the development of eight specie-specific qPCR assays for diagnosis of *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, and the zoonotic specie *Plasmodium simium*, targeting coding and noncoding mitochondrial genome regions. The optimization of the qPCR protocols involved a gradient of annealing temperatures, optimum concentrations of the primers and probes, as well as the application of PCR additives/enhancers (DMSO, glycerol, BSA), to improve the specificity of qPCR amplification. Nonspecific amplification of other *Plasmodium* species and of human targets was observed in different levels for all assays. Regardless of late Cq values for most nonspecific amplifications, applying a cutoff did not exclude many false-positive results and has compromised the detection of low parasitemia. Therefore, although mitochondrial targets have higher sensitivity, they frequently lose specificity due to its high sequence conservation. A wide screening to evaluate cross-reaction between the *Plasmodium* species or nonspecific amplification of human malaria-free samples should be performed for all *Plasmodium* mitochondrial assays.

Introduction

Despite the efforts that are currently being undertaken towards control of malaria around the world, the disease remains an important public health problem in many tropical and sub-tropical countries. In 2019, 229 million human malaria cases and 409 000 deaths were reported in the world (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). An early and accurate malaria diagnosis is crucial for the effectiveness of the disease control. Microscopy of Giemsa-stained blood smears are the most widely used approach for malaria diagnosis due to its low cost and relatively simple procedure, despite of its poor sensitivity (CHENG; CUNNINGHAM; GATTON, 2015). Molecular approaches such as polymerase chain reaction (PCR) are more specific, sensitive, and reliable for malaria diagnosis. The Nested PCR based on 18S rRNA gene has been largely used for molecular-based malaria diagnosis (SNOUNOU et al., 1993). Real time PCR (qPCR) has been increasingly implemented since it provides fast results in high-throughput screening. It is highly sensitive, specific, and allows parasite quantification (ALEMAYEHU et al., 2013; DIVIS et al., 2010; KAMAU et al., 2013).

PCR sensitivity is greatly influenced by the copy number of target molecule, because of that, a target with low copy number limits the detection capability of these assays, particularly for low parasitemias. Thus, *Plasmodium* mitochondrial (mt) genome is an ideal target for PCR, as it has higher copy number per parasite (20–150 copies) compared to the 18S rRNA gene (4–8 copies), allowing a greater sensitivity (ISOZUMI et al., 2015). The genus *Plasmodium* has the smallest mt genome as a tandemly repeated linear element of 6 kb (HIKOSAKA et al., 2011). This genome encodes only three genes, *cox1*, *cox3* and *cytb*.

Despite the high sensitivity of mtDNA-based assays, here we describe the pitfalls related to the development of malaria diagnosis assays by qPCR targeting the mt genome for *P. vivax*, *P. falciparum* and the zoonotic species *P. simium*. Eight species-specific assays were designed to amplify *Plasmodium* mt genome (coding and noncoding regions) by qPCR. Because all our assays showed some level of nonspecificity, we strongly recommend that the mitochondrial assays for *Plasmodium* species diagnosis undergo a wide screening of different *Plasmodium* species samples to access this potential issue.

Materials and Methods

Human clinical samples

DNA of three *Plasmodium* species (*P. falciparum*, *P. vivax* and *P. simium*) isolated from blood samples of patients previously diagnosed by well-trained microscopists and Nested PCR (SNOUNOU et al., 1993) as single infections were used to test the specificity of assays. One hundred and eleven blood positive samples of patients from different parts of Brazilian Amazon infected with *P. vivax* and *P. falciparum* and stored at the biorepository of Laboratory of Malaria at René Rachou Institute were used. These samples were also previously assayed with ribosomal and non-ribosomal (NR-qPCR) targets (AMARAL et al., 2019). The geometric mean of parasitemia was 2,528 parasites/ μ L (CI₉₅ 1,914-3,338) for *P. vivax* samples and 1697 parasites/ μ L (CI₉₅ 1,009-2,854) for *P. falciparum* samples used in the assays. Seventeen blood samples of patients from Atlantic Forest area diagnosed as positive for *P. simium* by PCR were also included (BRASIL et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2018). Samples from 26 healthy volunteers (human negative controls tested with distinct malaria PCR protocols) from a malaria-free area (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) were included as negative controls in the assays.

The human blood collection was performed according to relevant guidelines and regulations. All participants and/or their legal guardians provided written informed consent. Ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the IRR (N^o 2.243.058), according to the Brazilian National Council of Health (Resolutions 196/96 and 466/12). The INI-Fiocruz Ethical Board approved the study concerning the patients from Atlantic Forest (number 0062.0.009.000-11).

DNA extraction from blood samples was performed using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or Gentra Puregene Blood Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), using 300 μ L of blood and final volume of 50 μ L. Both blood and extracted DNA samples were stored at -20 °C.

Non-human primate samples

Twenty *P. simium* and 5 *P. brasilianum* DNA samples obtained from non-human primates (NHPs) from the Brazilian Atlantic Forest, stored at the biorepository of Laboratory of Malaria, were included (ALVARENGA et al., 2017; DE ALVARENGA et al., 2015, 2018). Samples from 12 NHPs from areas without malaria transmission, also tested with distinct PCR protocols (Snounou et al., 1993; Alvarenga et al., 2018), were included as NHP negative controls in the assays. The Brazilian government (Ministry of Environment) authorized capture, handling, and collection and transport of biological samples from non-human primates (SISBIO numbers. 43375-4/2015, 54707-137362-2 and 52472-1, and INEA license 012/2016012/2016). This study was approved by Institutional Ethics Committee of animal use (CEUA license L037/2016).

Primer design and qPCR assay optimization

Eight qPCR assays for diagnosis of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum*, and *P. simium*, targeting coding and noncoding mt genome regions were designed. Whole mt sequences of *P. falciparum* (GenBank accession numbers AY282930.1); *P. malariae* (AB354570.1); *P. simium* (NC_007233.1) and *P. vivax* (PvP01, GCA_900093555.1) were aligned using Clustal W software in Bioedit package. For primer design, regions of mt genome that contained polymorphisms, preferentially in the 3' ends, between *Plasmodium* species were used to assure assay specificity. Primers/probes with the highest stringency in the parameters of Primer Express software (Applied Biosystems™) and Oligo (Molecular Biology Insights, Inc) were chosen. Probes for *cox1* gene assays contained minor groove binder (MGB) and for the *cox3*, *cytb* genes and noncoding regions assays, two different quenchers were used: an internal quencher, ZEN, and Black Hole quencher at the 5' end.

For qPCR assays, the optimum concentrations of the primers and probes were defined using a concentration gradient (0.3 – 0.9 µM of each primer, 0.15 – 0.25 µM of probe). A gradient of annealing temperatures (52°C – 63°C) was also tested. For *cox1* gene assays, the optimum concentrations were 0.9 µM of each primer and 0.15 µM of probe in a reaction with a final volume of 10 µL. The QuantStudio device (Applied Biosystems™) was used with the following cycling parameters: a step of 60°C for 30 seconds and an initial denaturation of 95°C for

10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 52°C for 30 sec and extension at 60°C for 45 sec followed by a final extension incubation at 60°C for 30 sec. For PV_NC_1 assay, the best concentrations of primers were 0.9 µM and 0.25 µM of the probe at 55° C, with different number of cycles: 38 and 40. For the PV_COX3 assay, the best results were obtained using 0.6 and 0.9 µM of the primers and 0.25 µM of the probe at 60 to 64 ° C with 40 cycles. For the PF_CYTB assay, the best results were using primers at 0.9 µM and 0.25 µM of the probe at 58 ° C and 60° C, with 38 and 40 cycles. The PF_NC_1 assay was optimum results with 0.9 µM of primer and 0.15 µM of the probe and 40 cycles, at 60° C and 62° C. For the PF_NC_2 assay, the best protocol was using 0.5 to 0.9 of the primers µM and 0.15 to 0.25 µM of the probe with 40 cycles, at 60° C and 62° C. All reactions had final volume of 10 µL and followed the standard cycling protocol of Viia7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

To improve the specificity of qPCR amplification, PCR additives/enhancers (DMSO, glycerol, BSA) were also used in different concentrations (1% to 5%) (SIMONOVIC et al., 2012). All assays used TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), and the reactions were standardized on 384-well plates using QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems) for *cox1* gene assays or ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) for *cox3*, *cytb* and noncoding regions assays (Applied Biosystems). All results were analyzed using QuantStudio or QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR Software (Applied Biosystems).

Positive and negative (no DNA) controls were used in each round of amplification. The positive controls in qPCR assays were DNA *Plasmodium* species previously diagnosed by well-trained microscopy and/or other molecular tests (Nested-PCR and NR-qPCR) (AMARAL et al., 2019; SNOUNOU et al., 1993): (i) *P. falciparum* DNA strain 3D7 maintained in Laboratory of Malaria at IRR; (ii) DNA extracted from the blood of patients with high parasitemia for *P. vivax*; (iii) DNA of *P. simium* from a non-human primate; and (iv) DNA of *P. brasilianum* from the MR4 (ATCC, USA). In addition, the specificity of the COX1 assays was also tested on non-*Plasmodium* organisms, i.e., *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* and *Leptomonas sp.*

To prevent cross-contamination, the DNA extraction and mix preparation were performed in “parasite DNA-free rooms” distinct from each other. DNA extraction was performed twice on different days. Analysis of amplified DNA was performed in a distinct area. Furthermore, each of these separate areas has different sets of pipettes and all procedures were performed using plugged pipette tips.

Statistical analysis

The cutoff for each assay was established based on receiver operating characteristic (ROC) curve by combining both sensibility and specificity. The Cq values from positive samples were considered as “true positives”, while for the negative samples confirmed by molecular tests (negative for the species to be tested) were determined as “true negatives”. The ROC curve was calculated using GrahPad Prism version 8.0 (GraphPad software).

The overlap in the Cq values between specific and nonspecific amplifications was established dividing the overlapping data points ($Cq_{\text{min. nonspecific}} < x < Cq_{\text{max. specific}}$) by all the data points to calculate the percentage of overlapping data points.

Results

Design and analysis of *Plasmodium* mitochondrial qPCR assays

Eight TaqMan-based qPCR assays were designed for detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. simium*. All coding genes and also noncoding regions of *Plasmodium* mt genome were targeted in the assays: *cox1* gene (PS_COX1; PV_COX1_1; PV_COX1_2), *cox3* gene (PV_COX3), *cytb* gene (PF_CYTB), and noncoding regions (PF_NC_1; PF_NC_2; PV_NC_1) (Figure 1).

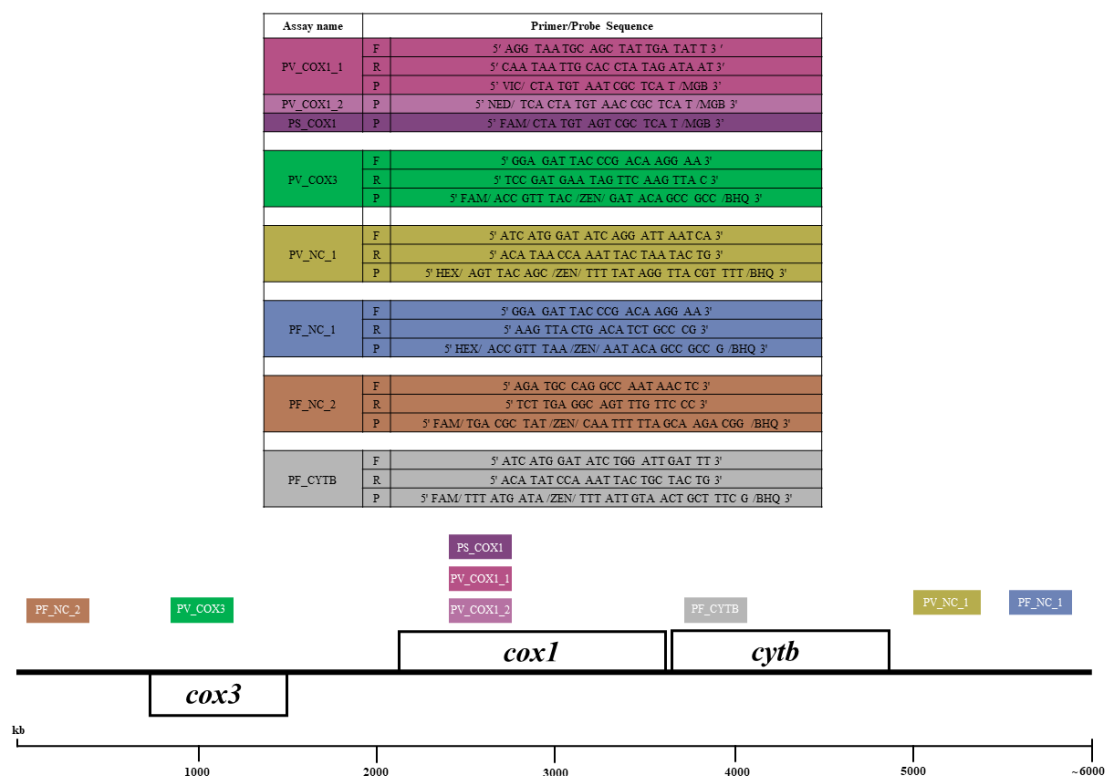


Figure 1: Primers/probes sequences and schematic position of amplicons in *Plasmodium* mitochondrial genome. Eight assays were developed targeting: *cox1* gene (PS_COX1; PV_COX1_1; PV_COX1_2), *cox3* gene (PV_COX3), *cytb* gene (PF_CYTB), and the noncoding regions (PF_NC_1; PF_NC_2; PV_NC_1). Each assay is represented by colored boxes, and the positions are based on the *Plasmodium* mitochondrial genome sequence (≈ 6000 pb). Primers (F: forward; R: reverse) and probes (P) sequences of each assay are shown in the boxes with the same shade of color. PF, PV, and PS correspond to *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. simium*, respectively.

Although mt genome is very conserved among *Plasmodium* species, the sequence alignments of the amplicon, primers and probes of each assay show the presence of some single nucleotide polymorphisms (SNP) used to distinguish the different *Plasmodium* species (particularly at 3' ends of the primers) (Figure 2 and Supplementary figure 1).

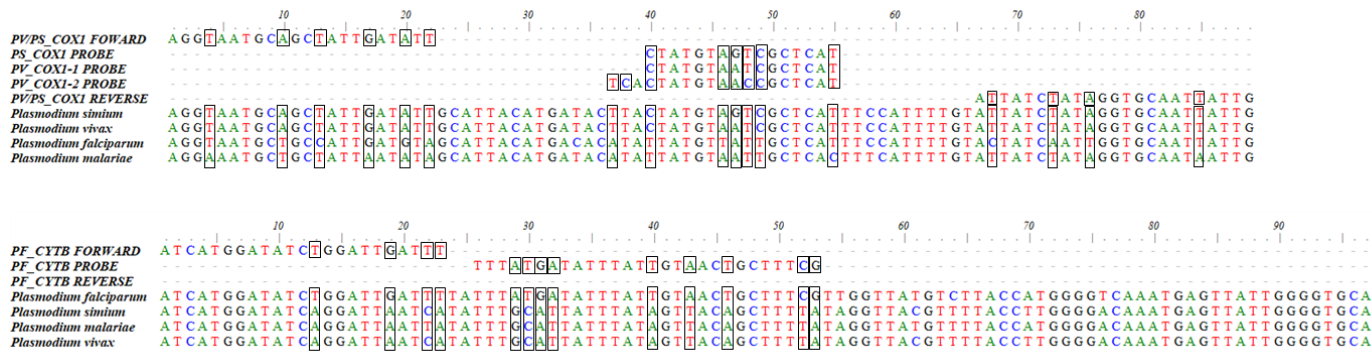


Figure 2: Alignment of mitochondrial amplicon sequences of *Plasmodium* from PV/PS_COX1 and PF_CYTB assays. The assays exemplified here are targeting *Cox1* gene (PS_COX1; PV_COX1_1; PV_COX1_2) and *CYTB* gene (PF_CYTB). Primers and probes of each assay are shown. Genbank sequences accession number: *P. falciparum* (AY282930.1); *P. malariae* (AB354570.1); *P. simium* (NC_007233.1) and *P. vivax* (PvP01). PF, PV, and PS correspond to *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. simium*, respectively. The boxes highlight polymorphic regions in primers/probes.

Nonspecific amplification for mt *Plasmodium* assays

A wide screening to verify the cross-reaction between the *Plasmodium* species or amplification using human malaria-free samples was performed in all *Plasmodium* mitochondrial assays. A panel of 154 *Plasmodium* clinical samples diagnosed by well-trained microscopists and previously assayed with ribosomal and non-ribosomal targets, and samples from healthy volunteers were used. Data about parasitemia by LM of all samples used in each assay is shown in table 1. Nonspecific amplification was observed in all assays for other *Plasmodium* species and/or human negative control samples, as described below.

In the cytochrome oxidase 1 assays, there was no nonspecific amplification with human malaria-free samples (0/15). DNA from other parasites (*Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* and *Leptomonas sp*) underwent cytochrome oxidase 1 assays to ascertain specificity (data not shown). The *Plasmodium vivax* PV_COX1_1 assay was tested with 40 *P. vivax* samples, all of them amplified (Cq mean = 29.0; range = 20.6 - 38.2) and did not cross react with any of 42 *P. simium* samples. However, nonspecific amplification was identified in 12 out of 20 (60.0%) reactions using well characterized *P. falciparum* samples (with known parasitemia and confirmed by other PCR protocols to exclude co-infection), with Cq mean value of 39.2 (35.0 – 40.8), resulting in 10.2% (12 of 117) of all reactions assayed (Table 1). To reduce nonspecific amplification, in PV_COX1_2 assay a new probe was designed by adding nucleotides spanning a more polymorphic region. Using this probe, 49/50 (98%) *P. vivax* samples amplified correctly and did not cross react with any of 20 *P. simium* samples and 15 *P. malariae*/*P. brasilianum* samples. Nevertheless, nonspecific amplification was observed in 11.4% (16 of 140) reactions, 16 out of 55 (29.0%) reactions using *P. falciparum* samples had nonspecific amplification. Cq mean value was 42.3 (34.0 – 44.6) and 32.4 (24.2 – 42.0), for nonspecific and specific amplifications, respectively (Table 1). Although in general nonspecific amplification had late Cq values, there was an overlap in the Cq values with specific amplifications of 6.1% and 18.7% of tested samples for PV_COX_1 and PV_COX_2 assays, respectively.

The assay targeting the cytochrome oxidase 3 gene, PV_COX3, had 23.4% of nonspecific amplification with other *Plasmodium* species (Table 1) with a Cq value ranged from 35.1 to 39.9 and an overlap in the Cq values with specific amplifications of 3.8%. Nonspecific amplification was observed for one of 67 (1.5%) reactions with human malaria-free samples tested for this assay.

For PV_NC_1 assay, three of six *Plasmodium* samples (50%) showed nonspecific amplification with Cq mean value of 34.8 (32.7 – 38.8), and 11.8% (8 of 68) of reactions using human malaria-free samples were amplified by this assay (Cq mean = 36.5; range = 31.3 – 38.6) (Table 1). For *P. vivax* specific amplification, this assay amplified 95.7% of positive samples, with the Cq mean value of 30.6 (27.0 – 37.4). All nonspecific amplifications had Cq values above the mean value for the specific ones. An overlap between the Cq of nonspecific and specific amplifications was observed for 31.8% of analyzed samples.

For *P. falciparum*, two assays targeted noncoding regions. The Cq mean for specific amplifications using *P. falciparum* positive samples in PF_NC_1 assay was equal to 22.0 (12.7 – 34.6) and for PF_NC_2 the Cq mean was 25.9 (19.3 – 29.8). In PF_NC_1 assay, four out 15 *P. falciparum* samples did not amplify (Table 1) and this result was not associated to low parasitemia (geometric mean = 1,224 parasites/ μ L). The assay showed nonspecific amplification in 14.6% (11 of 75) of all reactions assayed, including 11.8% (2 of 17) of *P. vivax* samples. PF_NC_2 had nonspecific amplification in 27.8% (27 of 97) of all reactions, being 38.9% (7 of 18) of *P. vivax* samples (Table 1). For human negative control (malaria-free samples), the PF_NC_1 and PF_NC_2 had an amplification rate of 20.9% (9 of 43) and 33.3% (20 of 60), respectively. Cq value for nonspecific amplifications ranged from 33.0 to 39.7 for PF_NC_1 and from 32.7 to 38.8 for PF_NC_2 assay. There was an overlap of 18.1% and 8.9% between Cq values of specific and nonspecific amplifications for PF_NC_1 and PF_NC_2, respectively.

Nonspecific amplification for the assay targeting the *P. falciparum* cytochrome b (PF_CYTB) was identified in 15.5% (38 of 245) of reactions, including 62.5% (5 of 8) of *P. vivax* samples and 19.3% (33 of 171) of reactions using human negative control samples from malaria-free areas (Table 1). In this assay,

different concentrations of DMSO (1% to 5%) were used to reduce the nonspecific amplification, as well to *Plasmodium* specific samples to assess its effect. Of 52 samples tested with DMSO (human negative control from malaria-free areas and *P. vivax* samples), four had nonspecific amplification (7.7%), besides, at the same time, 21 out 66 (31.8%) *Plasmodium* specific samples did not amplify due to DMSO inhibition, decreasing the sensibility of PF_CYTB assay (Table 1). Six out the 66 specific samples tested without any additives/modifications did not amplify and this result was not associated to low parasitemia (geometric mean = 1,240 parasites/ μ L). The highest Cq value for the specific amplifications was 33.3, nearly one cycle lower than the Cq minimum of the nonspecific amplifications (range = 34.8 – 39.8). There was not overlap between nonspecific and specific amplification for this assay.

In *P. simium* assay targeting the *cox1* gene, the unique gene in mt genome able to differentiate this species from *P. vivax*, all 37 *P. simium* samples amplified (Cq mean = 30.7, range = 22.0 – 38.5) (Table 1). For assessment of cross-reactivity with other *Plasmodium* species, a panel of *Plasmodium* samples was submitted to the *P. simium* qPCR assay. Likewise, samples from human patients infected with *P. vivax* from the Amazon region were tested. No amplification was observed by using both samples from *P. vivax* from the Amazon region (n=14) and *P. malariae*/*P. brasilianum* (n=13). DNA from other parasites (*Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi* and *Leptomonas sp*) underwent *P. simium* qPCR to ascertain specificity (data not shown). The assay did not cross react with any of 15 non-infected volunteers neither with 12 NHPs from non-malaria transmission areas tested. However, nonspecific amplification was identified in 13 out of 36 (36.1%) *P. falciparum* samples (Cq mean = 40.0, range = 36.2 – 44.7). These late nonspecific amplifications were visualized in 20.6% of all reactions using *Plasmodium* samples (13 of 63) (Table 1). An overlapping was observed between Cq values between *P. simium* specific and nonspecific amplifications in 11.9% of samples.

Table 1: Summary of data including all reaction for each assay.

Assay	Parasitemia by LM	<i>Plasmodium</i> specific amplification*		Nonspecific amplification*				Total*	Cutoff
	Geometric mean (parasites/ μ l)			Other <i>Plasmodium</i> species**		Malaria-free samples***		Nonspecific amplification reactions (%)	
		Reaction Positivity (%)	Cq mean (range)	Reaction Positivity (%)	Cq mean (range)	Reaction Positivity (%)	Cq mean (range)		
PV_COX1_1	2872 (CI ₉₅ 1875-4400)	40/40 (100)	29.0 (20.6 - 38.2)	12/62 (19.3)	39.2 (35.0 - 40.8)	0/15	NA	12/117 (10.2)	34.7
PV_COX1_2	2057 (CI ₉₅ 1473-2872)	49/50 (98)	32.4 (24.2 - 42.0)	16/90 (17.7)	42.3 (34.0 - 44.6)	ND	NA	16/140 (11.4)	40.5
PV_COX3	3802 (CI ₉₅ 2745-5265)	41/43 (95.3)	26.5 (18.0 - 35.4)	11/47 (23.4)	37.7 (35.1 - 39.9)	1/67 (1.5)	-	12/157 (7.6)	34.1
PV_NC_1	1159 (CI ₉₅ 343.7-3911)	22/23 (95.7)	30.6 (27.0 - 37.4)	3/6 (50)	34.8 (32.7 - 38.8)	8/68 (11.8)	36.5 (31.3 - 38.6)	11/97 (11.3)	34.3
PF_NC_1	1587 (CI ₉₅ 380.9-6614)	11/15 (73.3)	22.0 (12.7 - 34.6)	2/17 (11.8)	34.7 (33.4 - 36.0)	9/43 (20.9)	36.3 (33.0 - 39.7)	11/75 (14.6)	32.9
PF_NC_2	1255 (CI ₉₅ 415-3795)	18/19 (94.7)	25.9 (19.3 - 29.8)	7/18 (38.9)	34.6 (29.2 - 37.4)	20/60 (33.3)	36.6 (32.7 - 38.8)	27/97 (27.8)	31.2
PF_CYTB	1337 (CI ₉₅ 325.6-5489)	36/66 (54.5) [#]	23.2 (13.0 - 33.3)	5/8 (62.5)	38.3 (38.0 - 38.4)	33/171 (19.3)	37.1 (34.8 - 39.8)	38/245 (15.5)	34.9
PS_COX1	1327 (CI ₉₅ 765.5-2302)	37/37 (100)	30.7 (22.0 - 38.5)	13/63(20.6)	40.0 (36.2 - 44.7)	0/27	NA	13/139 (9.3)	36.6

NA: not applicable. ND: Not determined. * In this table were included the sum of all the reactions assayed. ** Other *Plasmodium* species tested: In PV_COX1_1 assay were tested 51 *Plasmodium* samples: *P. simium* (n=42) and *P. falciparum* (n=9); In PV_COX1_2 assay were tested 65 *Plasmodium* samples: *P. simium* (n=20), *P. malariae/P. brasilianum* (n=15) and *P. falciparum* (n=30); In PV_COX3 assay were tested 47 *Plasmodium falciparum* samples; In PV_NC_1 assay were tested 6 *Plasmodium* samples: *Plasmodium simium* (n=2), *P. malariae/P. brasilianum* (n=2) and *P. falciparum* (n=2); In PF_NC_1 assay were tested 17

Plasmodium vivax samples; In PF_NC_2 assay were tested 18 *Plasmodium vivax* samples; In PF_CYTB assay, were tested 8 *Plasmodium* samples: *P. simium* (n=2), *P. malariae*/*P. brasilianum* (n=2), and *P. vivax* (n=4); In PS_COX1_1 assay were tested 57 *Plasmodium* samples: *P. vivax* (n=14), *P. malariae*/*P. brasilianum* (n=13) and *P. falciparum* (n=30). ***For PS_COX1, negative controls included human negative controls (n=15) and NHP malaria-free samples (n=12). #PF_CYTB: 21 samples did not amplify due to the use of DMSO.

A cutoff for each assay was established using the Cq values of specific and nonspecific amplifications, based on the sensibility and specificity values given by ROC curve. The optimal value for the cutoff was determined as specificity >90% (Table 1). The cutoff determination was not able to separate specific from the nonspecific amplifications for most assays (Figure 3).

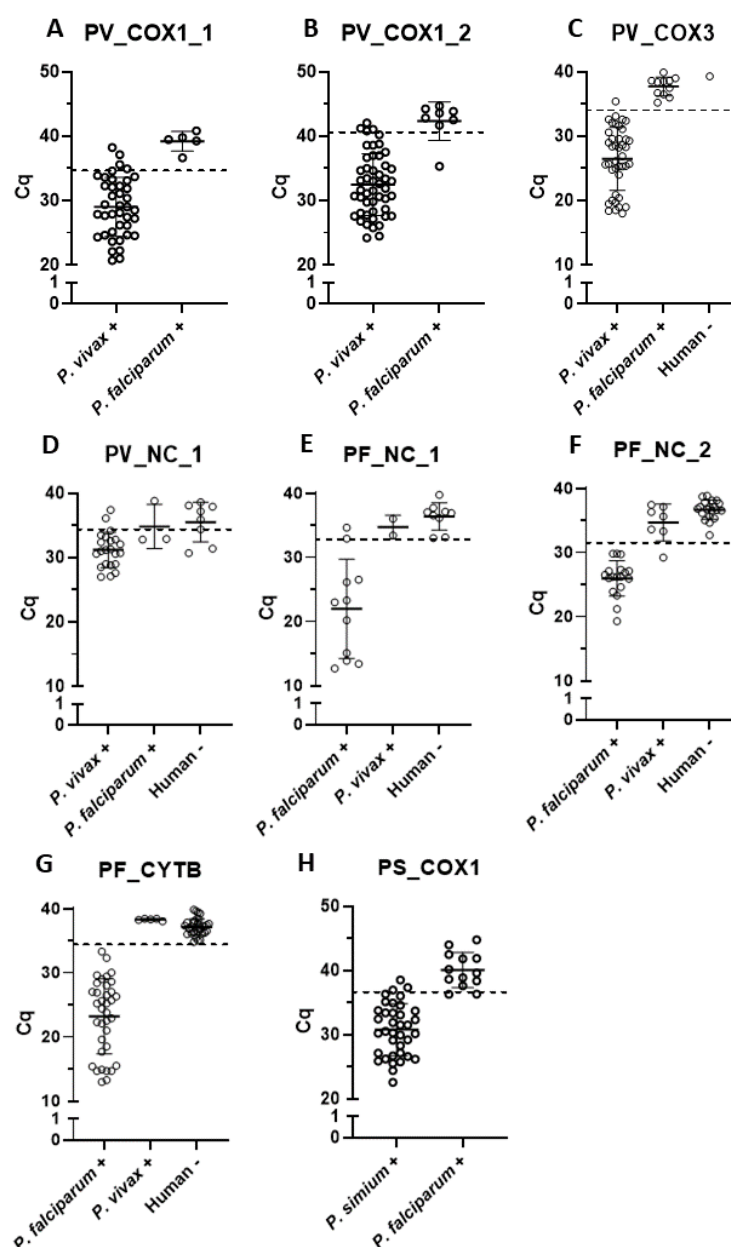


Figure 3: Distribution of Cq values for specific and nonspecific amplifications by assay. (A) *P. vivax* cytochrome oxidase 1 assay 1. (B) *P. vivax* cytochrome oxidase 1 assay 2. (C) *P. vivax* cytochrome oxidase 3 assay 2. (D) *Plasmodium vivax* noncoding region 1. (E) *P. falciparum* noncoding region 1. (F) *P. falciparum* noncoding region 2. (G) *P. falciparum* cytochrome B. (H) *P. simium* cytochrome oxidase 1. *P. vivax* + and *P. falciparum* +, samples positive for *P. vivax* and

P. falciparum, respectively, previously diagnosed using different molecular protocols; Human negative control, samples from healthy volunteers from a malaria-free area (samples tested with distinct malaria PCR protocols). Error bars represents Cq mean and standard deviation. For the assays A, B and I the number of cycles was 45 and for the assays C-H, the number was 40. The dashed line represents the cutoff estimated for each assay by ROC curve.

Optimization of protocols to increase assay specificity

Initially, to minimize the nonspecific amplification, a set of parameters was modified, such as the concentration of primers/probes in each assay, the denaturing and annealing conditions, and the number of cycles. The primers concentrations varied from 0.3 μ M to 0.9 μ M and from 0.15 μ M to 0.25 μ M for probes. The annealing temperature tested varied from 52°C to 63°C. These modifications decreased the number of nonspecific amplifications in some cases, however, did not eliminate all of them. The Cq values for the specific amplifications increased, showing that changes in annealing temperature and primers/probe concentrations interfered with assay sensitivity. A variety of PCR additives/enhancers (DMSO, glycerol and BSA) has also been used to increase the specificity, yield or consistency of reactions. The reduction of nonspecific amplification was notable in most of the samples; however, the use of these additives hampered the efficiency of specific amplifications. For PV_COX1_2 assay, 5% of DMSO, glycerol or BSA was tested individually, and only DMSO was able to reduce nonspecific amplification. However, the use of additives also had an impact on the specific amplification, increasing the Cq values (Cq mean of 18 to 27). To reduce this impact on specific amplification, different concentrations of DMSO and DNA were simultaneously tested. The best combination to avoid nonspecific amplification without interference with the specific ones was using 3.5% DMSO with the double amount of DNA (Data not shown). However, when a large panel (n=30) of well characterized *Plasmodium falciparum* samples was screened using parameters, 8 samples amplified with mean Ct of 42.3 (35.3 - 44.6). None of the implemented strategies was able to eliminate all nonspecific amplification. For the PF_CYTB, all concentrations of DMSO tested (1 to 5%) were able to eliminate the nonspecific amplification (0 out of 22). However, only one out of 16 specific samples was successfully amplified for *P. falciparum*. Once again, the use of DMSO hampered the efficiency of

specific amplifications, decreasing the sensibility of PF_CYTB assay (only 54.5% of specific samples was amplified) (Table 1). In a single experiment using 1% DMSO, 3 out of 29 human negative control samples amplified nonspecifically for *P. falciparum*, with Cq mean of 37.4 (37.2 – 37.8), whereas 13 out of 19 *P. falciparum* samples amplified specifically (Cq mean = 24.5, range = 14.7 – 32.3).

Discussion

In the past decade, nucleic acid amplification techniques have established increasingly high standards in diagnosis sensitivity by the use of multi-copy target genes (Gruenberg et al. 2018; 2020; Amaral et al., 2019). Mitochondrial (mt) genomic sequences can provide alternative PCR targets for the detection of malaria infections, offering increased sensitivity over single- or low-copy target as the 18S rRNA genes (Gruenberg et al., 2018). We evaluated the specificity of eight different assays targeting the mt genome of *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. simium*. The adjustment of PCR parameters was performed to reduce false-positives results. The experiments were in accordance with the standards of excellence stipulated by the guidelines for the Minimal Information for Publications on Quantitative Real Time PCR Experiments (MIQE), that give a checklist of essential and desirable information that should be reported to enable the reviewer to judge the validity of the paper and the reader to repeat the experiment and reproduce the results (Bustin et al., 2009).

A wide screening with *Plasmodium* clinical samples was performed to test assays specificities. Once mitochondrial PCR-targets seems to be more sensitive and show potential for detecting submicroscopic malaria infections, is expected to be able to detect previously unseen co-infections. Here, the exclusion of co-infection was essential to truly access specificity of the assays. For this reason, well characterized samples with known parasitemia and confirmed by other PCR protocols were used. Despite of exhaustive evaluation of different parameters, all qPCR assays targeting the mt genome showed a degree of nonspecific amplification of other *Plasmodium* species or human DNA.

Interestingly, despite the only difference between *P. simium* from *P. vivax* sequences is one unique single nucleotide polymorphisms (SNPs 3535 T>C) in COX1 assays, the protocols did not cross react. However, were observed

nonspecific amplification with *P. falciparum* samples. The amplification of *P. falciparum* samples from Amazon region in Ps COX1 assay confirm the low specificity of the target, once is improbable to have co-infections with *P. simium* in humans from Amazon region (once *P. simium* is a parasite endemic from Atlantic Forest region).

Different studies have demonstrated the use of *Plasmodium* mt genome as a useful target for malaria genus diagnosis using conventional PCR (Isozumi et al. 2015), nested PCR (Steenkeste et al. 2009), and qPCR (Haanshuus et al. 2019). However, only few studies demonstrated a specie-specific malaria diagnosis, based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (Britton et al. 2016), PCR (Cunha et al. 2009) and qPCR (Souza et al. 2012; Gruenberg et al. 2018; 2020; dos Santos et al. 2020). In these reports, it is not clear whether cross-reactivity between *Plasmodium* species or with human malaria-free samples were evaluated. Even though most studies have screened a large number of samples it lacks information about assay specificity such as cross-reactivity test and melting curve analysis for qPCR tests using DNA intercalating dye.

To differentiate between specific and nonspecific amplifications based on Cq values, a cutoff was defined for each assay by applying the ROC curve analysis. The Cq values was related to $\geq 90\%$ of specificity to properly identify the individuals who did not have malaria and, in the meantime, assuring a reliable sensibility value. However, the cutoff determination was not able to completely exclude false-positive results for most assays. The dilemma consists in a trade-off between sensitivity and specificity. The correct identification of *Plasmodium* species is of paramount importance and is one of the major challenges in malaria diagnosis. Misdiagnosis of the *Plasmodium* species may have a significant negative impact on the effectiveness of treatment and prognosis of the disease.

Even though assays were designed to target polymorphic regions of *Plasmodium* mtDNA, nonspecific amplification with other *Plasmodium* species and with human targets was observed. In this study, despite of a series of modifications implemented in each assay to decrease the nonspecific amplifications, none had eliminated all of them. For some assays, these modifications caused an increase in the Cq values for the specific amplifications, decreasing the assay sensitivity.

This reduction may have significant impact particularly in detection of *P. vivax* infections which is frequently characterized by low parasitemias. A variety of PCR additives/enhancers was used to increase the specificity of PCR reactions such as DMSO, glycerol and BSA. DMSO has been proven to considerably enhance both the specificity and efficiency of DNA polymerization (SIMONOVIĆ et al. 2012). Several polyhydroxyl alcohols are also potent PCR enhancers, such as glycerol, that improves PCR specificity (SIMONOVIĆ et al. 2012). The addition of bovine serum albumin (BSA) to PCR reactions is often beneficial for its ability to scavenge and neutralize several contaminants that inhibit *Taq*, including hemin and iron chloride (SIMONOVIĆ et al. 2012). They interfere with hydrogen bonding, thus facilitating strand separation, lowering DNA melting temperature (T_m) and consequently improving the specificity of primer binding (SIMONOVIĆ et al. 2012). The beneficial effects of additives are often template and primer-specific and must be determined empirically. Herein, the PCR additives/enhancers reduced but did not eliminate nonspecific amplifications; besides, the use of these additives hampered the efficiency of specific amplifications.

Conclusion

The *Plasmodium* mitochondrial genome is an attractive target for PCR-based detection of malaria parasites. However, as *P. vivax* and *P. falciparum* have at least 90% of conservation of mtDNA, the design of species-specific primers and probes is a challenge (McIntosh et al., 1998). The high degree of conservation of the *Plasmodium* mt genome may be due to structural constraints on the genome. Thus, a rigorous testing including the screening of a panel of samples well characterized should be performed to verify the existence of non-specific amplifications in all *Plasmodium* mt assays.

Funding

This study was funded by the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (RSTMH Small Grants 2016), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Programa PrInt-Fiocruz-CAPES. TNS and CAB are

CNPq Research Productivity fellows. GLC thanks the FAPEMIG for scholarship support.

Acknowledgments

The authors thank CEPEM (RO) and Policlínica Cosme e Silva (RR) teams. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities at René Rachou Institute: Real-Time PCR Facility (RPT09D).

References

ABDALLAH, J. F. et al. Prevalence of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 19, 2015.

AKBULUT, E.; CELIK, V.; TURGUT BALIK, D. **[Comparative analysis at the nucleotide level of the genes encoding the lactate dehydrogenase enzyme of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum.]** [s.l: s.n.]. v. 29

ALEMAYEHU, S. et al. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 277, 2013.

ALVAR, J. et al. Implications of asymptomatic infection for the natural history of selected parasitic tropical diseases. **Seminars in immunopathology**, v. 42, n. 3, p. 231–246, jun. 2020.

ALVARENGA, D. A. M. et al. New potential Plasmodium brasilianum hosts: tamarin and marmoset monkeys (family Callitrichidae). **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 71, 2017.

ALVES, F. P. et al. Asymptomatic Carriers of Plasmodium spp. as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. **Journal of Medical Entomology**, 2006.

ALVES, F. P. P. et al. High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2002.

AMARAL, L. C. et al. Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. **Malaria Journal**, 2019.

ARISCO, N. J.; PETERKA, C.; CASTRO, M. C. Cross-border malaria in Northern Brazil. **Malaria Journal**, v. 20, n. 1, p. 135, 2021.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Clinical biochemist. Reviews**, 2008.

ATROOSH, W. M. et al. Genetic variation of pfhrp2 in Plasmodium falciparum isolates from Yemen and the performance of HRP2-based malaria rapid diagnostic test. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 388, 2015.

BAKER, J. et al. Genetic diversity of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 870–7, 2005.

BAKER, J. et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of Plasmodium falciparum: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. **Malaria journal**, v. 9, p. 129, 2010.

BAKER, M. Digital PCR hits its stride. **Nature Methods**, v. 9, n. 6, p. 541–544, 2012.

BANNISTER, L.; MITCHELL, G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 209–213, 2003.

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

BATTLE, K. E. et al. Mapping the global endemicity and clinical burden of Plasmodium vivax, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10195, p. 332–343, 27 jul. 2019.

BERECZKY, S. et al. Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. **International Journal for Parasitology**, 2004.

BIENVENU, O. J.; EATON, W. W. The epidemiology of blood-injection-injury phobia. **Psychological Medicine**, 1998.

BOUSEMA, T. et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected Plasmodium falciparum gametocyte carriers. **PLoS ONE**, 2012.

BOUSEMA, T. et al. **Asymptomatic malaria infections: Detectability, transmissibility and public health relevance** *Nature Reviews Microbiology*, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. p. 112p, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 2015. v. 46, p. 43–2015, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação Epidemiológica da malária. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de tratamento da malária no Brasil**. [s.l: s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 2020. 2020b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dia mundial de luta contra a malária. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 15, p. 1–27, 2021.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet. Global health**, v. 5, n. 10, p. e1038–e1046, out. 2017.

BRITTON, S. et al. Sensitive Detection of Plasmodium vivax Using a High-Throughput, Colourimetric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004443, 12 fev. 2016.

BUPPAN, P. et al. Comparative detection of plasmodium vivax and plasmodium falciparum DNA in saliva and urine samples from symptomatic malaria patients in a low endemic area. **Malaria Journal**, 2010.

CHEHUAN, Y. F. et al. In vitro chloroquine resistance for Plasmodium vivax isolates from the Western Brazilian Amazon. **Malaria journal**, v. 12, p. 226, 2013.

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

CLSI/NCCLS. **EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline Global Consensus Standardization for Health Technologies**. [s.l: s.n.]. v. 24

CORDRAY, M. S.; RICHARDS-KORTUM, R. R. Review: Emerging nucleic acid-based tests for point-of-care detection of malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 2, p. 223–230, 2012.

CUNHA, M. G. et al. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 35–38, jul. 2009.

CUNNINGHAM, J. Update on Plasmodium falciparum hrp2 / 3 gene deletions. n. March, p. 1–32, 2017.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: First description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by Plasmodium simium. **Malaria Journal**, 2015.

DE ALVARENGA, D. A. M. et al. An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. **Scientific Reports**, 2018.

DE SANTANA FILHO, F. S. et al. Chloroquine-resistant Plasmodium vivax, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 1125–1126, 2007.

DE SOUZA, A. M. et al. Multiple-clone infections of Plasmodium vivax: definition of a panel of markers for molecular epidemiology. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 330, 2015.

DEMAS, A. et al. Applied Genomics: Data Mining Reveals Species-Specific Malaria Diagnostic Targets More Sensitive than 18S rRNA. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 49, n. 7, p. 2411–2418, 1 jul. 2011.

DINGLE, T. C. et al. Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. **Clinical chemistry**, v. 59, n. 11, p. 1670–1672, nov. 2013.

DIVIS, P. C. S. et al. A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p. 344, 2010.

DOMOTO, P. K. et al. Results of a dental fear survey in Japan: implications for dental public health in Asia. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, 1988.

DONDORP, A. M. et al. **How to Contain Artemisinin- and Multidrug-Resistant Falciparum Malaria** *Trends in Parasitology*, 2017.

DORADO, E. J. et al. Genetic Characterisation of Plasmodium falciparum Isolates with Deletion of the pfhrp2 and/or pfhrp3 Genes in Colombia: The Amazon Region, a Challenge for Malaria Diagnosis and Control. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163137, 16 set. 2016.

DORADO, E.; MURILLO, C.; MONTENEGRO, M. Plasmodium falciparum lacking histidine rich protein 2 and 3 genes in Colombia. **Malaria Journal**, v. 11, n. Suppl 1, p. P27, 2012.

DOS SANTOS, E. H. et al. A new Real Time PCR with species-specific primers from Plasmodium malariae/P. brasilianum mitochondrial cytochrome b gene. **Parasitology international**, v. 76, p. 102069, jun. 2020.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175–185, mar. 1998.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, v. 1, p. 47–50, 23 fev. 2007.

F. DOMINGOS, M.; TUBAKI, R.; DI SANTI, S. **Malária no Estado de São Paulo 1975 - 2006**. [s.l: s.n.]. v. 3

FERREIRA, M. U.; CASTRO, M. C. Malaria Situation in Latin America and the Caribbean: Residual and Resurgent Transmission and Challenges for Control and Elimination. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 2013, p. 57–70, 2019.

FRADEJAS, I. et al. Prevalence of submicroscopic malaria infection in immigrants living in Spain. **Malaria Journal**, 2019.

GALINSKI, M. R. et al. A reticulocyte-binding protein complex of plasmodium vivax merozoites. **Cell**, v. 69, n. 7, p. 1213–1226, jun. 1992.

GAMA, B. E. et al. **Chemoresistance of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax parasites in Brazil: Consequences on disease morbidity and control** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011.

GAMBOA, D. et al. A Large Proportion of P. falciparum Isolates in the Amazon Region of Peru Lack pfhrp2 and pfhrp3: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8091, 2010.

GARBIERI, T. F. et al. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. **Journal of applied oral science : revista FOB**, v. 25, n. 2, p. 147–158, 2017.

GBOTOSHO, G. O. et al. Rapid detection of lactate dehydrogenase and genotyping of Plasmodium falciparum in saliva of children with acute uncomplicated malaria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2010.

GETHING, P. W. et al. A Long Neglected World Malaria Map: Plasmodium vivax Endemicity in 2010. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2012.

GHAYOUR NAJAFABADI, Z. et al. Detection of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum DNA in human saliva and urine: Loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis. **Acta Tropica**, 2014.

GÓES, L. et al. Evaluation of histidine-rich proteins 2 and 3 gene deletions in plasmodium falciparum in endemic areas of the Brazilian Amazon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2021.

GREENWOOD, B. M.; ARMSTRONG, J. R. M. Comparison of two simple methods for determining malaria parasite density. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 2, p. 186–188, 1 mar. 1991.

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

GUEIRARD, P. et al. Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18640–5, 2010.

GUIMARÃES, A. É. et al. **Ecologia de mosquitos (Diptera, Culicidae) em áreas do Parque Nacional do Iguaçu, Brasil: 1 Distribuição por hábitat** *Cadernos de Saúde Pública* scielo , , 2003.

HAANSHUUS, C. G. et al. Assessment of malaria real-time PCR methods and application with focus on low-level parasitaemia. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0218982, 2019.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/N. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMILTON, J. G. **Needle phobia: A neglected diagnosis** *Journal of Family Practice*, 1995.

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. **Malaria Journal**, 2010.

HAYDEN, R. T. et al. Comparison of Droplet Digital PCR to Real-Time PCR for Quantitative Detection of Cytomegalovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 540 LP – 546, 1 fev. 2013.

HEDE, M. S. et al. Detection of the Malaria causing Plasmodium Parasite in Saliva from Infected Patients using Topoisomerase I Activity as a Biomarker. **Scientific Reports**, 2018.

HERMSEN, C. C. et al. Detection of Plasmodium falciparum malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 247–251, 1 dez. 2001.

HIKOSAKA, K. et al. Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 Plasmodium species. **Parasitology international**, v. 60, n. 2, p. 175–180, jun. 2011.

HINDSON, B. J. et al. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8604–8610, 15 nov. 2011.

HINDSON, C. M. et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. **Nature Methods**, v. 10, p. 1003, 1 set. 2013.

HOFMANN, N. et al. Ultra-Sensitive Detection of Plasmodium falciparum by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets. **PLoS Medicine**, 2015.

HOFMANN, N. E. et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 18, n. 10, p. 1108–1116, out. 2018.

HOUZÉ, S. et al. Combined deletions of pfhrp2 and pfhrp3 genes result in plasmodium falciparum malaria false-negative rapid diagnostic test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 7, p. 2694–2696, 2011.

HOWARD, R. J. et al. Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 4, p. 1269–1277, 1 out. 1986.

HOWES, R. E. et al. **Global epidemiology of Plasmodium vivax** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2016.

HOYER, S. et al. Focused Screening and Treatment (FSAT): A PCR-Based Strategy to Detect Malaria Parasite Carriers and Contain Drug Resistant *P. falciparum*, Pailin, Cambodia. **PLoS ONE**, 2012.

HUANG, X. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. **Genomics**, v. 14, n. 1, p. 18–25, set. 1992.

HUGGETT, J. F. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 2013.

HUGGETT, J. F.; COWEN, S.; FOY, C. A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 79–88, 2015.

IMWONG, M. et al. Numerical Distributions of Parasite Densities During Asymptomatic Malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 8, p. 1322–1329, 15 abr. 2016.

ISOZUMI, R. et al. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the Plasmodium mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. **Parasitology international**, v. 64, n. 3, p. 304–308, jun. 2015.

JAUREGUIBERRY, G. et al. PCR detection of Plasmodium falciparum by oligonucleotide probes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 4, n. 5, p. 409–414, 1 out. 1990.

KAIN, K. C. et al. ParaSight®F Test Compared with the Polymerase Chain Reaction and Microscopy for the Diagnosis of Plasmodium falciparum Malaria in Travelers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 1, p. 44–48, 1 jan. 1997.

KAMAU, E. et al. Multiplex qPCR for Detection and Absolute Quantification of Malaria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71539, 29 ago. 2013.

KAVANAUGH, M. J.; AZZAM, S. E.; ROCKABRAND, D. M. Malaria rapid diagnostic tests: Literary review and recommendation for a quality assurance, quality control algorithm. **Diagnostics**, v. 11, n. 5, 2021.

KILIAN, A. H. D. et al. Reliability of malaria microscopy in epidemiological studies: results of quality control. **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, n. 1, p. 3–8, 1 jan. 2000.

KOEPFLI, C. et al. Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). v. 6, p. 39183, 16 dez. 2016.

KÖHNEMANN, S.; PFEIFFER, H. Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. **Forensic Science International: Genetics**, 2011.

KUMAR, N. et al. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian Plasmodium falciparum population: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. **Malaria Journal**, v. 11, n. 1, p. 298, 2012.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, jun. 2018.

LADEIA-ANDRADE, S. et al. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the amazon basin of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2009.

LAFERI, H.; KANDEL, K.; PICHLER, H. False Positive Dipstick Test for Malaria. **The New England journal of medicine**, v. 337, n. 3, p. 148–53, 1997.

LEE, M.-A. et al. Real-time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4343–4345, nov. 2002.

LEE, N. et al. Effect of sequence variation in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2773–2778, 2006a.

LEE, N. et al. Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4547–4549, dez. 2006b.

LINDBLADE, K. A. et al. The silent threat: asymptomatic parasitemia and malaria transmission. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 6, p. 623–639, 1 jun. 2013.

LLOYD, Y. M. et al. PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial *cox3* and *varATS* primers. **Tropical Medicine and Health**, 2018.

LUCCHI, N. W. et al. Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era. **Public Health Genomics**, 2013.

MAGESA, S. M. et al. Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania. **Acta Tropica**, 2002.

MAHENDRAN, P. et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the detection of *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax*. **Malaria Journal**, v. 19, n. 1, p. 241, 2020.

MALAMUD, D. **Saliva as a Diagnostic Fluid** *Dental Clinics of North America*, 2011.

MALTHA, J. et al. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Diagnosis in the Peruvian Amazon: Impact of *pfhrp2* Gene Deletions and Cross-Reactions. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–7, 2012.

MANGOLD, K. A. et al. Real-Time PCR for Detection and Identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 16 maio 2005.

MARQUES, M. M. et al. *Plasmodium vivax* Chloroquine Resistance and Anemia in the Western Brazilian Amazon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 342–347, 2014.

MAZAIKA, E.; HOMSY, J. Digital Droplet PCR: CNV Analysis and Other Applications. **Current protocols in human genetics**, v. 82, n. July, p. 7.24.1-7.24.13, 2014.

MCINTOSH, M. T.; SRIVASTAVA, R.; VAIDYA, A. B. Divergent evolutionary constraints on mitochondrial and nuclear genomes of malaria parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 1998.

MENARD, D.; DONDORP, A. Antimalarial drug resistance: a threat to malaria elimination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2017.

MENARD, R. et al. Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 701–712, 2013.

MERCEREAU-PUIJALON, O.; BARALE, J. C.; BISCHOFF, E. **Three multigene families in Plasmodium parasites: Facts and questions** *International Journal for Parasitology*, 2002.

MFUH, K. O. et al. Detection of Plasmodium falciparum DNA in saliva samples stored at room temperature: Potential for a non-invasive saliva-based diagnostic test for malaria. **Malaria Journal**, 2017.

MILLER, R. L. et al. Diagnosis of Plasmodium falciparum infections in mummies using the rapid manual ParaSight™-F test. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 1, p. 31–32, 1 jan. 1994.

MORRISON, T. et al. Nanoliter high throughput quantitative PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 18, p. e123–e123, 25 set. 2006.

MOTA, M. M. et al. Migration of Plasmodium Sporozoites Through Cells Before Infection. **Science**, v. 291, n. 5501, p. 141–4, 2001.

MU, D. et al. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system. **Biotechnology Letters**, 2015.

MUELLER, I. et al. Key gaps in the knowledge of Plasmodium vivax, a neglected human malaria parasite. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 9, p. 555–566, 2009.

MURILLO SOLANO, C. et al. Deletion of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombian Parasites. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0131576, 2015.

MURPHY, S. C. et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage Plasmodium falciparum infections in malaria human challenge trials. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 3, p. 383–394, 1 mar. 2012.

NIR, Y. et al. Fear of injections in young adults: Prevalence and associations. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2003.

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

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

OKOTH, S. A. et al. Variation in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 (Pfhrp2) and Plasmodium falciparum histidine-rich protein 3 (Pfhrp3) gene deletions in Guyana and Suriname. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

PARR, J. B. et al. Streamlined, PCR-based testing for pfhrp2- and pfhrp3-negative Plasmodium falciparum. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 137, 2018.

PFAFFE, T. et al. **Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications** **Clinical Chemistry**, 2011.

PINA-COSTA, A. DE et al. **Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region** **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** scielo , , 2014.

PROUX, S. et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 323, 2011.

RACHID VIANA, G. M. et al. Histidine-rich protein 2 (pfhrp2) and pfhrp3 gene deletions in *Plasmodium falciparum* isolates from select sites in Brazil and Bolivia. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0171150, 16 mar. 2017.

RAO, A.; SEQUEIRE, P. S.; PETER, S. Characteristics of dental fear amongst dental and medical students. **Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research**, 1997.

ROBERTS, C. H. et al. Development and Evaluation of a Next-Generation Digital PCR Diagnostic Assay for Ocular *Chlamydia trachomatis* Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2195 LP – 2203, 1 jul. 2013.

ROCK, E. P. et al. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. **Parasitology**, v. 95 (Pt 2), n. 1987, p. 209–27, 1987.

ROSANAS-URGELL, A. et al. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. **Malaria Journal**, v. 9, n. Lm, p. 361, 2010.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, 2004a.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5636 LP – 5643, 1 dez. 2004b.

SÁ, J. M. et al. ***Plasmodium vivax*: allele variants of the mdr1 gene do not associate with chloroquine resistance among isolates from Brazil, Papua, and monkey-adapted strains** *Experimental Parasitology*. [s.l.: s.n.].

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, dez. 1977.

SAÚDE, O. M. DA. Estratégia técnica mundial para o paludismo 2016-2030. **Saúde, Organização Mundial da**, p. 30, 2015.

SCHNEIDER, P. et al. Submicroscopic Plasmodium falciparum gametocyte densities frequently result in mosquito infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2007.

SHARMA, Y. D. Genomic organization, structure and possible function of histidine-rich proteins of malaria parasites. **International Journal of Biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 471–477, 1988.

SILLENCE, K. A. et al. Fetal Sex and RHD Genotyping with Digital PCR Demonstrates Greater Sensitivity than Real-time PCR. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 11, p. 1399 LP – 1407, 1 nov. 2015.

SIMONOVIC, A. et al. Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and QRT-PCR amplification of low-expressed transgenes. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 865–876, 1 jan. 2012.

SIMONOVIC, A. et al. Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and QRT-PCR amplification of low-expressed transgenes. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, p. 865–876, 1 jan. 2012.

SIQUEIRA, A. M. et al. Plasmodium vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 87–96, 28 dez. 2016.

SNOUNOU, G. et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 61, n. 2, p. 315–320, 1 out. 1993.

SOUZA, C. R. T. et al. Prevalence of Plasmodium falciparum and P. vivax in an area of transmission located in Pará State, Brazil, determined by amplification of mtDNA using a real-time PCR assay. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 3, p. 3409–3413, set. 2012.

SRISUTHAM, S. et al. Four human Plasmodium species quantification using droplet digital PCR. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

STEENKESTE, N. et al. Towards high-throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers. **Malaria journal**, v. 8, p. 86, abr. 2009.

STURM, A.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of Host Hepatocytes into Liver Sinusoids. **Science**, v. 1287, n. 2006, 2006.

SU, X. Z.; WELLEMS, T. E. Toward a high-resolution Plasmodium falciparum linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. **Genomics**, v. 33, n. 3, p. 430–444, maio 1996.

SUTHERLAND, C. J.; HALLETT, R. Detecting malaria parasites outside the blood. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 11, p. 1561–1563, 2009.

TAKESHITA, T. et al. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of *ESR1* mutations in 325 breast cancer specimens. **Translational Research**, v. 166, n. 6, p. 540- 553.e2, 1 dez. 2015.

TAO, D. et al. A saliva-based rapid test to quantify the infectious subclinical malaria parasite reservoir. **Science Translational Medicine**, 2019.

TAYLOR, S. C.; LAPERRIERE, G.; GERMAIN, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

TE, S. H.; CHEN, E. Y.; GIN, K. Y.-H. Comparison of Quantitative PCR and Droplet Digital PCR Multiplex Assays for Two Genera of Bloom-Forming Cyanobacteria, *genus-species* and *Cylindrospermopsis* and *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 15, p. 5203 LP – 5211, 1 ago. 2015.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, nov. 1994.

TRAN, T. M. et al. A nested real-time PCR assay for the quantification of *Plasmodium falciparum* DNA extracted from dried blood spots. **Malar J**, v. 13, p. 393, 2014.

TROUVAY, M. et al. High Performance of Histidine-Rich Protein 2 Based Rapid Diagnostic Tests in French Guiana are Explained by the Absence of *pfhrp2* Gene Deletion in *P. falciparum*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–7, 2013.

TURGUT-BALIK, D. et al. Cloning, sequence and expression of the lactate dehydrogenase gene from the human malaria parasite, *Plasmodium vivax*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 13, p. 1051–1055, jul. 2004.

TURNER, R. J. Mechanisms of Fluid Secretion by Salivary Glands. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 694, n. 1, p. 24–35, 1 set. 1993.

VALLEJO, A. F. et al. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 48, jan. 2016.

VINETZ, J. M. et al. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. **New England Journal of Medicine**, 1998.

VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K. **Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene** *Forensic Science International*, 2009.

WAMPFLER, R. et al. Strategies for Detection of *Plasmodium* species Gametocytes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e76316, 27 set. 2013.

WANG, P. et al. Absolute quantification of lung cancer related microRNA by droplet digital PCR. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 836–842, 15 dez. 2015.

WARREN, L. et al. Transcription factor profiling in individual hematopoietic progenitors by digital RT-PCR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 47, p. 17807–17812, 21 nov. 2006.

WEISS, D. J. et al. Mapping the global prevalence, incidence, and mortality of *Plasmodium falciparum*, 2000-17: a spatial and temporal modelling study. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10195, p. 322–331, 27 jul. 2019.

WELLEMS, T. E.; HOWARD, R. J. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 6065–6069, ago. 1986.

WHITE, G. B. Essential malariology (2nd edition). **Parasitology Today**, v. 2, n. 1, p. 28, 28 jan. 2017.

WHITE, N. J. **The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria** *Malaria Journal*, 2008.

WILLIE, N. et al. Insights into the performance of sD bioline malaria ag p.f/Pan rapid diagnostic test and *plasmodium falciparum* histidine-Rich protein 2 gene variation in Madagascar. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1683–1691, 2018.

WILSON, M. et al. Development of droplet digital PCR for the detection of *Babesia microti* and *Babesia duncani*. **Experimental Parasitology**, v. 149, p. 24–31, 1 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. New Perspectives: malaria diagnosis. **World Health Organization**, n. October 1999, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The use of malaria rapid diagnostic tests. **World Health Organization**, p. 1–20, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2015. **World Health Organization**, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Malaria microscopy quality assurance manual. **World Health Organization**, v. 2, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Malaria Programme; ISBN 978-92-4-156565-3; Malaria; World Health Organization; World malaria report 2018.**
[s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. [s.l: s.n.]. v. WHO/HTM/GM

WRIGHT, S. et al. Fear of needles: Nature and prevalence in general practice. **Australian Family Physician**, 2009.

ZHAO, S. et al. Sensitive detection of Porcine circovirus-2 by droplet digital polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 27, n. 6, p. 784–788, 21 set. 2015.