GISELLE FERNANDES MACIEL DE CASTRO LIMA

Plataforma para detecção de *Plasmodium* em doadores de sangue de áreas endêmicas e não endêmicas brasileiras: processamento em *pool* utilizando marcadores moleculares e sorológicos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi

São Paulo

2015

*Aos pacientes que sofrendo com alguma enfermidade, encontrem na transfusão sanguínea a
segurança para sua recuperação e cura....*

À minha mãe Lourdes, pelo exemplo de vida, força, dedicação e determinação, pelo amor incondicional, pela amizade, conselhos, apoio e pelos valores inestimáveis que serviram de alicerce para constituir o que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu alicerce, meu esconderijo, minha força, fonte de vida. Agradeço a fidelidade, sustento, por me capacitar a fazer este trabalho e alcançar mais uma vitória e por me rodear de pessoas maravilhosas que se empenharam em me ajudar a concluir este estudo.

A todos os amigos e pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, pela amizade, força, oração, preocupação e incentivo no decorrer deste projeto.

À minha orientadora Dra. Silvia Maria Di Santi, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelos ensinamentos, companheirismo, pela inspiração de garra, dedicação, competência, seriedade, luta e perseverança em tudo o que faz e em oferecer alívio e cura aos acometidos por malária e por nos ensinar que todo o nosso esforço é para evitar ou aliviar o sofrimento dos pacientes. Pelas horas dispensadas em meu auxílio, pelo incentivo, carinho e a confiança no desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. Silvano Wendel por nos ceder esse imenso tesouro de amostras para a execução desta pesquisa e pelo fornecimento de informações e todo o suporte com as amostras para esse estudo.

Ao Dr. Venkatachalam Udhayakumar pela valiosa oportunidade de estágio no Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), pela atenção, dedicação, paciência e ensinamentos durante meu estágio.

À Dra. Naomi Lucchi por dedicar seu tempo com alegria e me treinar nas técnicas moleculares em tão pouco tempo... tanta correria... mas deu certo!

Muito Obrigada!

À Dra. Luciana Flannery, por me acolher com tanto carinho em tantos momentos, por abrir o seu lar com tanta prontidão e alegria durante minha estadia em Atlanta, por me ajudar nas realizações das PCRs e todo incentivo, conselhos e amizade que você me ofereceu.

Ao Dr. Alexandre Macedo, que tornou esse estágio possível. Foi através de um e-mail errado que encontramos a pessoa certa, você! Obrigada por tornar tudo isso possível, por trabalhar para que a colaboração desse certo. Pela dedicação, preocupação, por me acolher com tanto carinho e proporcionar momentos de descontração sempre bem-vindos! Por me ensinar a operar o EpiInfo... não foi fácil, mas conseguimos!

A toda equipe do Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), aos colegas Pauline, Ceci, Ira, Dragon, Sheila e Adeline que me receberam tão bem e me ensinaram tantas coisas em tão curto tempo. Muito obrigada pelo acolhimento e dedicação e carinho.

Ao Dr. Jose Eduardo Levi, colaborador deste projeto, pela partilha de conhecimentos e instruções que enriqueceram este trabalho.

A Dra. Carmen Arroyo Sanchez, por todo apoio, atenção e colaboração valiosa nas análises deste trabalho.

A toda equipe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, tanto a equipe atual quanto a equipe anterior, Dra. Silvia, Dona Cida, Morgana, Rosário, Lia, Christina, Maria Silvia, Dida, Lilian, Dra. Karin, Miluska, Ju Baby, Angélica e Juliana. Agradeço pela amizade, carinho, momentos de companheirismo, pelos momentos de trabalho e pelos momentos de descontração também necessários, pela prontidão e alegria em me ajudar. Obrigada por me ensinarem o que é trabalhar em equipe. São

muitos os momentos, lembranças, alíquotas, extrações, PCRs sem fim, trabalho de bancada, trabalho de campo e mutirões, muito trabalho e muito companheirismo, amizade, seriedade, mas também risadas e pela inestimável contribuição e apoio a esse trabalho, vocês são maravilhosas e este trabalho também é de vocês!

A Roseli da Secretaria da Pós-graduação, pela confiança, incentivo e carinho, pelas informações e disponibilidade, paciência e atenção a mim prestadas.

Ao XVII Seminário Laveran & Deane 2012, pela oportunidade e sugestões que enriqueceram o projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro através da Bolsa de Doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2012/18014-5 pelo apoio financeiro a esse estudo.

À U.S. Agency for International Development (USAID) e Amazon Malaria Initiative (AMI) pelo financiamento para realização do meu estágio no CDC.

À minha família querida, minha mãe inspiradora, minhas irmãs e amigas Jessika e Jeniffer, meus cunhados David e William e ao meu querido Steve, obrigada por apoiarem os meus sonhos, pela preocupação, incentivo, conselhos, amizade, risadas, ajuda, paciência e compreensão na minha ausência.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

Platão

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

Este estudo foi realizado no Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN, no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e no Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria - Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - com apoio da FAPESP 2012/18014-5, SUCEN, LIM 49, PROAP/CAPES, CNPq e U.S. Agency for International Development (USAID) através da Amazon Malaria Initiative (AMI).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	01
1. ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA.....	02
2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA NO MUNDO	02
3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA NO BRASIL.....	04
4. INFECÇÕES ASSINTOMÁTICAS	08
5. MALÁRIA TRANSMITIDA POR TRANSFUSÃO	10
6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA	17
7. JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVOS.....	23
1. GERAL.....	24
2. ESPECÍFICOS	24
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. DESENHO DO ESTUDO	26
2. ÁREA DE ESTUDO	26
3. POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	27
4. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS ALIQUOTADAS	30
5. MONTAGEM DOS <i>POOLS</i>	31
6. EXTRAÇÃO DE DNA	31
7. ANÁLISE MOLECULAR	32
7.1. PROTOCOLO LIMA QPCR (TAQMAN)	32
7.2. PROTOCOLO LIMA QPCR (EVAGREEN).....	33
7.3. PET-PCR	33
7.4. REALAMP PCR.....	35

7.5. NESTED PCR.....	36
8. DETECÇÃO DE ANTICORPOS.....	37
9. CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS	38
10. DETERMINAÇÃO DO <i>CUT-OFF</i>	38
11. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	39
12. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
RESULTADOS	41
1. MONTAGEM DOS POOLS	42
2. ANÁLISE MOLECULAR.....	42
3. DETERMINAÇÃO DO CUT-OFF PARA LIMA QPCR.....	43
4. CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE QPCR.....	46
5. LIMA QPCR TAQMAN	47
5.1 ANÁLISE DOS <i>POOLS</i>	47
5.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS <i>POOLS</i> POSITIVOS	51
6. LIMA QPCR EVAGREEN	55
7. PET-PCR	55
7.1. ANÁLISE DOS <i>POOLS</i>	55
7.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS <i>POOLS</i> POSITIVOS	56
8. REALAMP	56
8.1. ANÁLISE DOS <i>POOLS</i>	56
8.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS <i>POOLS</i> POSITIVOS	57
9. SNOUNOU nPCR	57
9.1. ANÁLISE DOS <i>POOLS</i>	57
9.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS <i>POOLS</i> POSITIVOS	58
10. DETECÇÃO DE ANTICORPOS.....	59
11. COMPARAÇÃO ENTRE CUSTOS E APLICABILIDADE DAS TÉCNICAS.....	62
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXOS.....	83

ANEXO I	84
ANEXO II	86
ANEXO III	88
ANEXO IV	89
ANEXO V	91

TABELAS

Tabela 1. Número estimado de casos de malária (a) e de óbitos (b) por Região da OMS, 2000, 2005 e 2010-2013.....	4
Tabela 2. Amostras de sangue de doadores coletadas por unidade da federação em 212 serviços de hemoterapia localizados em áreas endêmicas e não endêmicas do Brasil, por região geográfica	29
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de <i>Plasmodium</i> e sonda FAM-TAMRA (Gama et al, 2007) para realização de PCR em tempo real	33
Tabela 4. Sequências dos <i>primers</i> gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de <i>Plasmodium</i> e espécie-específico para amplificação de DNA genômico de <i>P. falciparum</i> (Lucchi, 2013) para realização de PET-PCR. <i>Primers</i> reverse contém molécula fluorescente.....	34
Tabela 5. Sequências dos <i>primers</i> gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de <i>Plasmodium</i> (Han et al, 2007) através da técnica RealAmp	35
Tabela 6. Sequências dos <i>Primers</i> utilizados para amplificação por <i>nested</i> PCR, de fragmentos de genes da <i>ssrRNA</i> de <i>Plasmodium</i> . Os <i>primers</i> rPLU5 e rPLU6 são gênero-específicos e os <i>primers</i> rFAL1 e rFAL2, rVIV1 e rVIV2, rMAL1 e rMAL2, são espécie-específicos para <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> e <i>P. falciparum</i> respectivamente.	37
Tabela 7. Cálculo do número de amostras para ensaio com teste SD Bioline Malaria Pf/Pv, para Amazônia Legal e Extra-amazônica.....	37
Tabela 8. Comparação do limite de detecção entre as qPCR ensaiadas em duplicatas e nPCR utilizando controles positivos de cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> diluídas seriadamente.	45
Tabela 9. Apresentação dos pools que exibiram algum resultado positivo nos diferentes protocolos moleculares empregados (Lima qPCR, PET-PCR, RealAmp e nPCR). Apresentação das médias <i>Cts</i> (<i>Cycle threshold</i>) nos ensaios de Lima qPCR e PET-PCR.....	48
Tabela 10. Resultados Lima qPCR (TaqMan®) positivos (média <i>Ct</i> ≤37,49) e indeterminados (uma alíquota <i>Ct</i> ≤37,49) para amplificação de <i>Plasmodium</i> em pools de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	49
Tabela 11. Apresentação dos <i>pools</i> considerados indeterminados por exibirem amplificação em apenas uma alíquota da duplicata <i>Ct</i> (<i>Cycle threshold</i>) ≤ 37,49.	50

Tabela 12. Apresentação das amostras individuais dos <i>pools</i> positivos que exibiram algum resultado positivo nos diferentes protocolos moleculares empregados (Lima qPCR, PET-PCR, RealAmp e nPCR). Apresentação das médias Ct (Cycle threshold) nos ensaios de Lima qPCR e PET-PCR.....	52
Tabela 13. Resultados Lima qPCR (TaqMan®) positivos (média Ct ≤37,49) e indeterminados (uma alíquota Ct ≤37,49) para amplificação de <i>Plasmodium</i> em amostras individuais dos <i>pools</i> positivos de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	53
Tabela 14. Apresentação das amostras individuais consideradas indeterminadas por exibirem amplificação em apenas uma alíquota da duplicata Ct (Cycle threshold) ≤ 37,49.	54
Tabela 15. Concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas Lima qPCR TaqMan® e EvaGreen® em <i>pools</i> de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	55
Tabela 16. Concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas Lima qPCR TaqMan® e PET-PCR em <i>pools</i> de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	56
Tabela 17. Concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas Lima qPCR TaqMan® e PET-PCR nas amostras individuais de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	56
Tabela 18. Resultado de 11 <i>pools</i> negativos pelo Lima qPCR selecionados mediante sorteio para comparação com outros protocolos de PCR (PET-PCR, RealAmp e nPCR). Apresentação das médias Ct nos ensaios de Lima qPCR e PET-PCR	57
Tabela 19. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e RealAmp PCR em <i>pools</i> de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica	57
Tabela 20. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e Snounou nPCR em <i>pools</i> de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	58
Tabela 21. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e Snounou nPCR nas amostras individuais de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.	59

Tabela 22. Positividade de *P. vivax* em teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv com detecção de anticorpos através de antígenos recombinantes MSP e CSP de Pv e Pf em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica. 61

Tabela 23. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e SD Bioline Pf/Pv em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica. 61

Tabela 24. Comparação entre custos, limite de detecção, tempo e processamento das técnicas moleculares e a sorológica utilizadas neste estudo. 61

FIGURAS

- Figura 1. População sob risco de contrair malária no mundo, 2013, de acordo com o nível de endemicidade. 3
- Figura 2. Mapa de risco de transmissão de malária no Brasil em 2014 6
- Figura 3. Número de casos de malária notificados na Região Amazônica e diferença percentual entre 2012 e 2014 6
- Figura 4. Casos de malária segundo estados da Amazônia Legal, 2013 e 2014..... 7
- Figura 5. Total de casos de malária registrados na Região Extra-Amazônia, de 2009 a 2014 8
- Figura 6. Composição da Hemorrede Brasileira: Setores Público e Privado em 2000
Fonte: Publicação/MS – Normas para Implantação de Unidades Hemoterápicas e Hematológicas. 27
- Figura 7. Distribuição dos doadores de sangue de acordo com o padrão de doação estratificado por sexo. 30
- Figura 8. Montagem dos *pools* com 300 µL de concentrado de hemácias de 10 doadores, formando um total de 3 mL por *pool*. 31
- Figura 9. *Primer* modificado PET-PCR. 1A. Formação de *loop* quando não há amplificação. 1B. *Primer* com emissão de fluorescência quando *loop* é desfeito pela presença de amplificação. Z: sequência específica do *primer*; FL: molécula de fluorescência; X, Y e ATA conjunto que forma estrutura em *loop*; X e Y são estrutura complementares. 34
- Figura 10. Número de doadores não analisados pelos métodos moleculares e procedência das amostras. 42.
- Figura 11. Fluxograma apresentando número de doadores analisados em *pools* e individualmente e as técnicas moleculares empregadas com os respectivos resultados..... 43
- Figura 12. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) obtida a partir dos *Cts* de controles positivos com 3,5 parasitos/µL (n= 17) e negativos para malária (n= 30) gerando um ponto de corte com Ct = 37,49..... 44

Figura 13. Gráfico mostrando amplificação dos controles positivos de cultura de <i>Plasmodium falciparum</i> diluídos em série de 3.500 a 0,35 parasitos/ μ L. Amplificação por Lima qPCR (TaqMan) .	44
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amostras de cultura de <i>P. falciparum</i> diluídas seriadamente, cujo fragmento amplificado é de 205 bp. A. Amostras de P.f. diluição de 350 – 0,35 parasitos/ μ L. B. Amostras de P.f. diluição de 100 – 0,01 parasitos/ μ L. Marcador de peso molecular de 100 bp (M), controle negativo (C-), cepa de referência para P.f. (3D7). C. Amostras de P.f. diluição 3.500 – 0,35 parasitos/ μ L. D. Amostras de P.f. diluição de 10.000 – 0,01 parasitos/ μ L.	46
Figura 15. <i>Pools</i> positivos de amostras de doadores de bancos de sangue brasileiros que apresentaram amplificação para <i>Plasmodium</i> nos ensaios Lima qPCR (TaqMan®) com média das duplicatas $\leq$ ao Ct 37,49.	49
Figura 16. <i>Pools</i> de amostras de doadores de bancos de sangue brasileiros considerados indeterminados por apresentarem amplificação para <i>Plasmodium</i> com Ct $\leq$ 37,49 em apenas uma alíquota pelo teste Lima qPCR (TaqMan®).	50
Figura 17. Amostras individuais de <i>pools</i> positivos de sangue de doadores consideradas positivas, com amplificação para <i>Plasmodium</i> pelo teste Lima qPCR (TaqMan®), com média das duplicatas $\leq$ ao Ct 37,49. Distribuição por estados brasileiros.	53
Figura 18. Amostras individuais de <i>pools</i> positivos de sangue de doadores consideradas indeterminadas nos ensaios individuais por apresentar amplificação para <i>Plasmodium</i> com Ct $\leq$ 37,49 em apenas uma alíquota pelo teste Lima qPCR (TaqMan®). Distribuição por estados brasileiros.	54
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, para detecção de espécies de <i>Plasmodium</i> de <i>pools</i> positivos pelo Lima qPCR. <i>Pool</i> positivo para <i>P. malariae</i> (199) à esquerda. <i>Pool</i> positivo para <i>P. falciparum</i> (1196) à direita. Marcador de peso molecular de 100 bp (M), controle negativo (H2O), controles positivos (Pf, Pv, Pm e Po)	58
Figura 20. Fluxograma apresentando número de amostras de soro individuais e dos <i>pools</i> , de Área Endêmica e Área Não Endêmica, além dos <i>pools</i> que resultaram positivos pelo método molecular Lima qPCR em que foram aplicados o teste imunocromatográfico SD Bioline, com seus resultados respectivos.	60
Figura 21. Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos contra antígenos recombinantes CSP e MSP de <i>P.vivax</i> e <i>P.falciparum</i> , mostrando sinal positivo fraco para <i>P.vivax</i> (seta Azul) e sinal forte para o controle (seta preta), de pool de Área Não Endêmica.	60

Figura 22. Estados que apresentaram banda positiva para *P. vivax* nos *pools* de soro de doadores de Área Endêmica e Área Não Endêmica para malária no teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv.....61

RESUMO

Lima GFMC. Plataforma para detecção de *Plasmodium* em doadores de sangue de áreas endêmicas e não endêmicas brasileiras: processamento em *pool* utilizando marcadores moleculares e sorológicos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A malária transmitida por transfusão sanguínea permanece como uma das infecções mais relevantes para os serviços de hemoterapia. Dados sobre a frequência de malária transfusional mostram valores que variam de menos que 0,2 casos por milhão de unidades de sangue em países não endêmicos a 50 casos ou mais em áreas com transmissão ativa. Embora no Brasil a incidência de malária por transfusão sanguínea não seja conhecida, este evento pode contribuir para a disseminação da doença em casos de falha na triagem clínico-epidemiológica ou na ocorrência de doadores assintomáticos nos bancos de sangue. Doadores que ocasionaram malária transfusional geralmente apresentavam parasitemias muito baixas com estimativa de um a 10 parasitos presentes por unidade de sangue, o que requer metodologias mais sensíveis para o diagnóstico e prevenção. O presente estudo de corte transversal e de abrangência nacional, visou a estimar a prevalência de marcadores específicos para malária em grande número de amostras de doadores de sangue agrupadas em *pools*, através de diferentes metodologias moleculares e um teste sorológico. Participaram 147 serviços hemoterápicos brasileiros, públicos e/ou privados localizados em áreas endêmicas e não endêmicas para malária e 13.338 doadores de sangue aprovados pelos métodos de triagem locais. As amostras foram agrupadas em *pools* de 10 totalizando 1299 *pools*. Esses *pools* foram processados por quatro técnicas diferentes de PCR em tempo real e uma técnica de *nested* PCR. Também foi empregado um teste rápido para detecção de anticorpos. Os *pools* positivos pelas PCRs foram ensaiados individualmente para detectar o(s) doador(es) positivo(s). Foram identificados 43 *pools* com amplificação para *Plasmodium* pela PCR em tempo real, sendo 4,72% de *pools* positivos da Região Amazônica e 3,19 da Extra-Amazônica. A *nested* PCR conseguiu identificar quatro *pools* com *P. vivax*, dois *pools* contendo *P. falciparum* e um *pool* com *P. malariae*, todos de doadores de Região Extra-Amazônica. Amostras dos *pools* positivos foram processadas individualmente e a PCR em tempo real mostrou amplificação em 25 doadores, uma positividade de 6,94% em 360 amostras individuais analisadas, sendo apenas uma de doador de Região Amazônica. A *nested* PCR identificou *P. malariae* em um doador e *P. vivax* em outro. O teste rápido revelou presença de anticorpos contra *P. vivax* em 13 *pools* de área não endêmica e 3 *pools* de área endêmica, sendo somente em um *pool* positivo pela PCR em tempo real. Limitações do estudo foram a descontinuação do teste rápido no Brasil que impediu a análise individual dos *pools* positivos e a problemas relativos à conservação das amostras de sangue individuais, o que dificultou a identificação de algumas amostras. A técnica de PCR em tempo real apresentou o melhor desempenho e foi capaz de identificar *Plasmodium* mesmo em amostras agrupadas em *pool* de 10, diminuindo desta forma o tempo e o custo do processamento. Os

resultados deste estudo, que analisou amostras de sangue de doadores de áreas endêmicas e não endêmicas brasileiras, constituindo um painel nacional, revelaram o risco de malária transfusional em nosso país e a necessidade de validação de protocolos sensíveis para detecção de baixas parasitemias. Estes resultados poderão subsidiar as tomadas de decisões das agências reguladoras hemoterápicas, minimizando desta forma a transmissão de malária em bancos de sangue brasileiros.

Descritores: malária transfusional; PCR em tempo real; *Plasmodium*; hemoterapia; triagem de doadores de sangue

SUMMARY

Lima GFMC. Platform for *Plasmodium* detection in blood donors from endemic and non-endemic Brazilian areas: processing of pooled samples using molecular and serological markers. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Malaria transmitted by blood transfusion remains one of the most important infections for hemotherapy services. Data on the frequency of transfusion malaria show values ranging from less than 0.2 cases per million units of blood in non-endemic countries to 50 or more cases in areas with active transmission. While in Brazil the incidence of malaria by blood transfusion is unknown, this event may contribute to the spread of the disease in cases of failure in the clinical and epidemiological screening or due to the occurrence of asymptomatic donors in blood banks. Donors that caused transfusion malaria mostly showed very low parasitemia with an estimated rate of 1 to 10 parasites per unit of blood, which requires sensitive methods for the diagnosis and prevention. This cross-sectional study with samples from whole country, aimed to estimate the prevalence of specific markers for malaria in large number of samples from blood donors grouped into pools, using different molecular methods and one serologic test. It was included 147 Brazilian public or private blood banks located in endemic and non-endemic areas for malaria with 13,338 blood donors that have been accepted by the local methods of screening. The samples were grouped into pools of 10 totalizing 1,299 pools that were processed by four different techniques of real time PCR and one nested PCR. It was also used a rapid test for antibody detection. Samples from the positive pools were tested individually by PCR to detect positive donors. Real-time PCR revealed amplification for *Plasmodium* in 43 pools with samples from Amazon Region (4.72%) and Extra-Amazon Region (3.19%). Nested PCR was able to identify four pools with *P. vivax*, two pools with *P. falciparum* and one pool with *P. malariae*, all related to samples from Extra-Amazon Region. Samples from positive pools were processed individually and real-time PCR revealed amplification in 25 donors, showing a positivity rate of 6.94% in 360 individual samples, with only one donor from Amazon Region. Nested PCR showed amplification in samples from two donors, one harboring *P. malariae* and one *P. vivax*. The rapid diagnostic test revealed the presence of antibodies against *P. vivax* in 13 pools from non-endemic area and in three pools from endemic area. Only one of the PCR positive pools resulted positive in the rapid diagnostic test. Limitations of this study were related to the unavailability of the rapid test in Brazil for processing the individual samples from the positive pools and problems concerning the storage of individual blood samples. Real-time PCR showed the best performance and was able to identify *Plasmodium* in pools of 10 samples, reducing time and cost of processing. The results of this study, which analyzed blood samples from donors from endemic and non-endemic Brazilian areas revealed the risk of transfusion malaria in our country and the need for sensitive validated protocols for detection of low parasitaemia. These results may support the decision making of blood donor

screening criteria by regulatory agencies, in order to reduce malaria transmission in Brazilian blood banks.

Descriptors: transfusion malaria; real time PCR; *Plasmodium*; hemotherapy; screening of blood donors

INTRODUÇÃO

1. ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária é um antigo flagelo da humanidade, com referências à doença em documentos históricos das primeiras civilizações da China, Índia, Mesopotâmia, Egito e Grécia (Cox, 2010). É definida como uma doença parasitária infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium spp.* Cinco espécies podem causar malária em humanos: *Plasmodium falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*. O modo de transmissão natural é através da picada de fêmeas infectadas do gênero *Anopheles*, porém pode ser transmitida de forma induzida por transfusão sanguínea, por uso compartilhado de agulhas contaminadas e por via congênita no momento do parto (DI SANTI e BOULOS, 1999; WHITE, 2008). Dentre as espécies, *P. vivax* é a mais cosmopolita das malárias humanas, chegando a extremos latitudinais históricos de 64° norte e 32° Sul (SNOW, 2015). O problema de saúde pública representado pelo *P. vivax* não é mais considerado como benigno, causando morbidade grave e morte. No entanto, o *P. falciparum* continua a ser a ameaça mais importante em uma escala global, responsável por mais de 90% da mortalidade por malária no mundo. Relatos sobre complicações e óbitos em infecções por *P. knowlesi* também foram registrados (COX-SINGH et al, 2008; SHARMA e KHANDURI, 2009; BAIRD, 2013).

Os casos sintomáticos são caracterizados por febre alta, calafrios, sudorese e cefaléia. As formas clínicas mais severas ocorrem principalmente em adultos não-imunes, crianças e gestantes. O quadro pode evoluir para formas complicadas, com prostração, alteração da consciência, dispnéia ou hiperventilação, convulsões, hipotensão arterial ou choque, edema pulmonar, hemorragias, icterícia, hemoglobinúria, hiperpirexia (>41°C) e oligúria, que podem levar a óbito (BRASIL, 2010). O quadro clínico clássico pode apresentar-se alterado pelo uso de profilaxia ou pelo desenvolvimento de imunidade, com sintomas atípicos ou até ausentes.

2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA NO MUNDO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que globalmente 3,3 bilhões de pessoas estejam sob risco de se infectarem com o parasito (Figura 1) e desenvolverem a doença (WHO, 2014). A distribuição da malária está concentrada em regiões de clima tropical e subtropical. Em países endêmicos os custos com prevenção, tratamento e perda de produtividade como resultado de morbidade e mortalidade relacionadas à malária

podem representar uma parcela significativa na economia com redução do Produto Interno Bruto (BREMAN et al, 2004). A doença tem transmissão ativa em 97 países segundo dados da OMS. Apesar do registro de redução no número de casos a partir de 2000, em 2013 ocorreram no mundo 198 milhões de casos, com 584.000 óbitos, sendo 82% dos casos e 90% dos óbitos na Região Africana da OMS (Tabela 1), afetando principalmente crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas (WHO, 2014). As principais intervenções responsáveis pela redução de malária no mundo, compreendem o controle de vetores através de mosquiteiros tratados com inseticida, quimioterapia preventiva em gestantes e crianças e controle dos casos através do diagnóstico e tratamento de infecções (WHO, 2014).

Figura 1. População sob risco de contrair malária no mundo, 2013, de acordo com o nível de endemidade.

FONTE: <http://worldmaliareport.org/node/68>

Tabela 1. Número estimado de casos de malária (a) e de óbitos (b) por Região da OMS, 2000, 2005 e 2010-2013

a) Região OMS	Número Total de Casos em Milhões					
	2000	2005	2010	2011	2012	2013
África	174.000	192.000	167.000	163.000	163.000	163.000
Américas	2.500	1.700	1.100	800	800	700
Mediterrâneo Oriental	14.000	10.000	9.000	11.000	10.000	9.000
Europa	0	0	0	0	0	0
Sudeste Asiático	33.000	34.000	28.000	28.000	27.000	24.000
Pacífico Ocidental	4.000	2.000	2.000	1.000	1.000	1.000
Total	227.000	240.000	207.000	203.000	202.000	198.000

b) Região OMS	Número Total de Óbitos					
	2000	2005	2010	2011	2012	2013
África	801.000	761.000	576.000	543.000	530.000	528.000
Américas	2.300	1.800	1.300	1.000	900	800
Mediterrâneo Oriental	17.000	13.000	12.000	13.000	12.000	11.000
Europa	3	0	0	0	0	0
Sudeste Asiático	53.000	50.000	46.000	44.000	43.000	41.000
Pacífico Ocidental	9.500	4.700	3.900	3.300	3.500	3.300
Total	882.000	830.000	639.000	605.000	590.000	584.000

3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA MALÁRIA NO BRASIL

O Brasil foi responsável por 42% dos casos de malária nas Américas em 2013 (WHO, 2014). Em 2014 foram registrados 144.111 casos de malária no país (BRASIL, 2015). A transmissão se concentra na Amazônia Legal (Figura 2), composta por nove estados: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins, que representam 99,6% dos casos registrados no Brasil. Nos últimos três anos observou-se tendência de queda, com 241.806 casos em 2012, 177.791 casos em 2013 e 143.552 casos em 2014 (Figura 3). Os estados com maior número de notificações entre 2013 e 2014 foram Amazonas e Acre (Figura 4). *P. vivax* é a espécie predominante no país, representando 84%

das infecções, enquanto *P. falciparum* contribui com quase 16%, visto que são notificados também alguns casos de *P. malariae* (Brasil, 2015). A incidência de malária no Brasil vem caindo anualmente desde os anos 2000, com registro pelo Ministério da Saúde de uma média de 392,6 mil casos por ano. A redução nos casos deve-se a programas de controle como o Programa de Intensificação das Ações de Controle da Malária (PIACM) vigente de 2000 a 2003 e o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) vigente de 2003 até os dias atuais, que tem como objetivos a redução da incidência, da gravidade, da letalidade e do número de internações, através de adaptações nas medidas de controle para as condições epidemiológicas específicas de cada localidade. Além disso, tem como meta priorizar o diagnóstico precoce e o tratamento oportuno e adequado, apoiar a estruturação dos serviços locais de saúde, eliminar a transmissão em áreas urbanas, manter livres da endemia as áreas onde a transmissão já foi interrompida e estabelecer medidas específicas de controle do vetor (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; PINA-COSTA et al, 2014). Para intensificação das ações de controle os municípios foram estratificados de acordo com o risco de transmissão, através da Incidência Parasitária Anual (IPA), que expressa o número de exames positivos para malária por mil habitantes em determinado lugar e período, sendo:

- alto risco – $IPA \geq 50$ casos de malária por mil habitantes;
- médio risco – IPA entre 10 e 49,9 casos de malária por mil habitantes; e
- baixo risco – $IPA \leq 9,9$ casos de malária por mil habitantes.

O principal vetor envolvido na transmissão da malária na Região Amazônica é *An. darlingi*. Na Região Extra-Amazônica a transmissão se dá principalmente por *An. (K) cruzii* e *An. (K) bellator* (DEANE, 1992; PINA-COSTA et al, 2014).

Figura 2. Mapa de risco de transmissão de malária no Brasil em 2014

Fonte: SINAN/SVS/MS e SIVEP-Malária/SVS/MS

Figura 3. Número de casos de malária notificados na Região Amazônica e diferença percentual entre 2012 e 2014

Fonte: SIVEP-MALÁRIA/SVS – Ministério da Saúde. Visualizado em: 22.08.2015

Figura 4. Casos de malária segundo estados da Amazônia Legal, 2013 e 2014

Fonte: SIVEP-MALÁRIA/SVS – Ministério da Saúde. Visualizado em: 22.08.2015

A Região Extra-Amazônica não é considerada endêmica para malária, porém é receptiva para a transmissão da doença. Casos autóctones esporadicamente são registrados, principalmente nos estados com presença de Mata Atlântica devido a reservatórios não-humanos e vetores competentes (CARVALHO et al, 1988; DEANE, 1992; BÉRTOLI e MOITINHO, 2001; CURADO et al, 2006; CERUTTI et al, 2007). Em 2014 foram notificados 559 casos (Figura 5), sendo 54 casos autóctones, com surtos localizados (Brasil, 2015). É importante ressaltar que houve aumento no número de óbitos na Região Extra-Amazônica de 10 para 15 entre 2013 e 2014. Isso se dá pela falta de conhecimento/suspeita da doença em regiões não endêmicas, o que acarreta atraso no diagnóstico e no tratamento adequado.

A maioria dos casos de malária registrados na Região Extra-Amazônica entre 2000 e 2013 ocorreu na Região Sudeste (41,6%). O estado com o maior número de casos neste período foi São Paulo (20,2%), com mais casos do que toda a Região Sul (17,2%). Na Região Sul, o Paraná teve mais casos (3.452). Na Região Centro-Oeste (20,1%), a predominância dos casos aconteceu em Goiás e na Região Nordeste (21%), no Piauí (PINA-COSTA et al, 2014). Em 2013, dos 89 casos autóctones registrados na Região Extra-Amazônica, os Estados do Piauí, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, foram responsáveis por 86,7%.

Figura 5. Total de casos de malária registrados na Região Extra-Amazônia, de 2009 a 2014

4. INFECÇÕES ASSINTOMÁTICAS

A primeira descrição de infecção assintomática por *Plasmodium* foi realizada em 1900 por Robert Koch, ao estudar moradores de Papua Nova Guiné (Coura et al, 2006). Em áreas de alta transmissão, exposições contínuas ao parasito podem levar a imunidade parcial - proteção contra os episódios clínicos, mas não contra a infecção pelo *Plasmodium* e nem a eliminação completa deste - consequentemente, originando portadores assintomáticos (Suárez-Mutis et al, 2007; Zoghi et al, 2012). A densidade parasitária é controlada pela imunidade adquirida em hospedeiros infectados, podendo limitar a parasitemia a níveis submicroscópicos, mas não é capaz de eliminar o protozoário. Adultos são mais propensos a desenvolverem infecções submicroscópicas que as crianças, e indivíduos que estão repetidamente expostos à malária têm densidades mais baixas do parasito, se comparadas às parasitemias de indivíduos menos expostos da mesma região (Okell et al, 2012). A proporção de infecções submicroscópicas é menor em áreas de alta transmissão (prevalência na gota espessa $\geq 75\%$) do que em zonas de transmissão baixa (prevalência na gota espessa $\leq 10\%$), onde o percentual pode chegar a 70 - 80% (BOUSEMA et al, 2014).

Infecções assintomáticas por *Plasmodium* já foram amplamente descritas em quase todos os continentes. Na África, Singh e colaboradores (2014) estudaram uma população de crianças aparentemente saudáveis na Nigéria, e encontraram 59,6% de infecções assintomáticas que foram diagnosticadas pela microscopia. Nas Américas, Cucunubá e

colaboradores (2013) relataram 16,5% de indivíduos assintomáticos detectados por PCR em Tierralta, Colômbia. Na Ásia, em uma região endêmica na Índia, Das e colaboradores (2014) observaram através da microscopia, que ao longo do ano infecções assintomáticas variaram de 4,8 a 5,3 vezes. Na Oceania, Waltmann e colaboradores (2015) encontraram 60.0% de infecções assintomáticas dentre infectados nas Ilhas Salomão. Os parasitos podem persistir por longos períodos de maneira assintomática e podem levar a casos transfusionais, com relatos de *P. malariae* em doador que estava assintomático há 53 anos, 27 anos para *P. vivax* e 13 para *P. falciparum* (Gauzzi e Grazan, 1964; Besson et al, 1976).

No Brasil há relatos de infecções assintomáticas em áreas endêmicas e não endêmicas: Oliveira e colaboradores (1995) relataram 20% de positividade pela gota espessa em garimpeiros de Peixoto de Azevedo, MT. Dentre os infectados, 70% eram assintomáticos e não desenvolveram sintomas nas 48 horas seguintes à coleta das amostras. Em estudo realizado em Rondônia (ALVES et al, 2002) mediante intervenção em populações ribeirinhas analisadas por gota espessa e PCR, foram detectadas infecções assintomáticas por *P. vivax* e *P. falciparum*. Os pacientes foram monitorados por dois meses. As infecções assintomáticas foram 4-5 vezes mais prevalentes que as sintomáticas: respectivamente 20% e 4,6% em Portuchuelo e 49,5% e 10% em Ji-Paraná. Ladeia-Andrade (2005), em estudo realizado no Parque Nacional do Jaú, no estado do Amazonas, reportou que entre os 144 casos de malária diagnosticados pela gota espessa ou por resultados de PCR positivas para presença de *Plasmodium*, 104 (72,4%) foram inicialmente assintomáticos, 45 (31,3%) continuaram como assintomáticos nos 30 dias seguintes, e 36 (25%) continuaram assintomáticos por 150 dias do acompanhamento (Coura et al, 2006). A descrição de casos assintomáticos em áreas de transmissão, independentemente do nível de endemicidade, representa um desafio para as estratégias de controle, tanto para a transmissão natural da doença, cujos programas se baseiam na detecção e tratamento de casos sintomáticos, como para os casos transfusionais ocorridos na Região Amazônica e Extra-Amazônica.

O grande fluxo migratório da Região Amazônica para outros estados brasileiros possibilita o surgimento de surtos de malária. Na Região Extra-Amazônica foram detectados casos de malária autóctone de decurso clínico atípico, brando ou mesmo assintomático. O parasito identificado nesses casos foi *P. vivax* (CARVALHO et al, 1985; 1988). Estudos soropidemiológicos em algumas regiões de Mata Atlântica de São Paulo mostraram evidência de exposição da população local a diversas variantes de *P. vivax* ou *P. malariae* (CURADO et al, 1997). A prevalência de infecções assintomáticas encontrada no Estado de São

Paulo entre 1980 e 2007, foi de 9,4%, segundo análise de dados secundários obtidos pelas fichas de notificação compulsória (COUTO et al, 2010). As parasitemias apresentam-se sempre muito baixas, sendo difícil o diagnóstico pela hemoscopia convencional. A importância da detecção de casos e do tratamento adequado reside principalmente no fato de que portadores assintomáticos atuam como reservatórios naturais do parasito que pode ser facilmente disseminado por vetores em diferentes regiões, permitindo a disseminação da endemia. Além disso, há o risco de transmissão da doença por via induzida: há na literatura diversos relatos de portadores assintomáticos com deslocamentos por regiões de Mata Atlântica, que realizaram doações de sangue induzindo a casos de malária transfusional, incluindo um óbito por *P. malariae* (KIRCHGATTER et al, 2005; COSTA-NASCIMENTO et al, 2006; SCURACCHIO et al, 2011). No Espírito Santo foram descritos casos autóctones diagnosticados pela gota espessa como *P. vivax*, sempre em baixas parasitemias, com menos de 300 parasitos por μL de sangue. Deve também ser considerada a possibilidade de ocorrência de infecções autolimitadas e de portadores assintomáticos que mantêm a transmissão na área, hipótese suportada pela significativa prevalência de anticorpos contra as formas sanguíneas de *Plasmodium* e por amostras de sangue de assintomáticos positivas na PCR (CERUTTI et al, 2007).

5. MALÁRIA TRANSMITIDA POR TRANSFUSÃO

A malária transmitida por transfusão sanguínea (TTS) foi descrita pela primeira vez em 1911 (WOOLSEY, 1911), e permanece como uma das infecções TTS mais importantes (KITCHEN e CHIODINI, 2006). Segundo Wylie (1993), a malária TTS ocorre principalmente a partir de produtos do sangue, como hemácias, plaquetas, concentrados de leucócitos, crioprecipitados e hemácias congeladas, não tendo sido relatado caso a partir de plasma congelado. Os parasitos da malária podem sobreviver em células vermelhas estocadas a temperaturas entre 2 e 6°C por até três semanas, sendo que o inóculo estimado nas transfusões é de um a 10 parasitos por unidade de sangue (GRANT et al, 1960; SEED et al, 2005). Em 1982, Bruce-Chwatt estimava que a incidência de malária transfusional em países endêmicos pudesse exceder 50 casos por milhão de unidades. Um estudo no Paquistão revelou que 0,57% dos candidatos apresentaram gota espessa positiva (ALI et al, 2010). Na Índia, em uma triagem de 11,736 unidades de sangue entre 2008 e 2009, foi observada uma positividade de 0,03% por testes rápidos confirmados por microscopia (BAHADUR et al, 2010).

Na Nigéria, doadores potenciais foram testados, com positividade de 20,2% pela microscopia, 3,8% pelo OptiMAL e 57,8% pelo Clinotech (FALADE et al, 2009). Seed e colaboradores (2005) estimaram que a incidência de casos transfusionais em áreas não endêmicas, varia de 0 a 2 casos por milhão de doações. Alguns bancos de sangue utilizam questionário para identificar indivíduos com risco de transmitir malária, sendo excluídos aqueles que relatem ter viajado para ou procedam de áreas endêmicas. Porém este procedimento pode permitir a coleta de sangue de um doador com malária, devido a falhas de informação por parte do candidato à doação ou ao escasso conhecimento quanto à distribuição geográfica da malária (SÁEZ-ALQUÉZAR et al, 1998). Considerem-se ainda os assintomáticos, os semi-imunes e as pessoas que podem contrair malária em áreas não endêmicas (KITCHEN e CHIODINI, 2006, SCURACCHIO et al, 2011).

Casos transfusionais são amplamente descritos em regiões endêmicas e não endêmicas em todo o mundo incluindo as 4 espécies de *Plasmodium* que causam malária em humanos. Devido a globalização, indivíduos viajando a negócios ou lazer para áreas de malária ou mesmo imigrantes provindos dessas regiões, podem se infectar e servir como reservatórios transmitindo o parasito onde houver presença de vetores viáveis, ou mesmo através de transfusão sanguínea. Na França, um doador nascido no Senegal, mas sem deslocamentos para área endêmica durante 13 anos e sem histórico de malária, transmitiu *P. falciparum* para um receptor que nunca havia saído da França e que desenvolveu sintomas de malária duas semanas após a transfusão, o receptor foi detectado através da microscopia e o doador através da Imunofluorescência Indireta (BESSON et al. 1976). Caso transfusional envolvendo *P. vivax* foi relatado na Malásia em uma criança chinesa que recebeu transfusão sanguínea de um doador do Myanmar, sem história prévia de infecção da malária e com microscopia negativa. *P. vivax* foi confirmado por PCR e as sequências de ambos, receptor e doador, foram as mesmas (ANTHONY et al, 2013). No Líbano, uma senhora desenvolveu sérias complicações devido à transmissão transfusional envolvendo *P. ovale*, diagnosticada por hemoscopia com 1,11% de parasitemia, após ter recebido sete unidades de sangue de doadores anônimos. Os critérios de exclusão foram baseados em um questionário adaptado da Associação Americana de Bancos de Sangue e não tiveram qualquer triagem para malária. Todos os doadores com antecedentes de viagem a áreas endêmicas de malária ou aqueles com histórico de infecção por malária foram excluídos (HAYDOURA et al, 2011). Na Holanda, uma receptora holandesa que nunca havia saído do país desenvolveu quadro febril após transfusão sanguínea e foi diagnosticada, através de

microscopia e PCR, com malária causada por *P. malariae*. O doador envolvido na transmissão, era de procedência holandesa, e já havia doado sangue para outros 14 receptores. Este relatou viagens ao Quênia, Tanzânia, Zanzibar, Tailândia e Costa Rica durante os anos que sucederam as doações. O doador assintomático, foi detectado através de PCR e posteriormente pela microscopia (BROUWER et al, 2013). De 1972 a 1981 foram reportados nos Estados Unidos 26 casos de malária transfusional, sendo nove por *P. malariae*, oito por *P. falciparum*, oito por *P. vivax* e um por *P. ovale* (GUERRERO et al, 1983). Entre 1972 e 1988, Nahlen e colaboradores (1991) relataram 45 casos decorrentes de transfusão, com três mortes. *P. malariae* foi o responsável pelo maior número de casos (38%), inclusive com um óbito, seguido de *P. falciparum* (29%), com dois óbitos, *P. vivax* (24%) e *P. ovale* (9%). É importante ressaltar que 12 das 17 transfusões envolvendo *P. malariae* relacionavam-se com doadores que relatavam viagens para fora dos Estados Unidos de 4 a 22 anos antes da doação.

No Brasil, casos importados e induzidos por transfusão sanguínea ou por uso compartilhado de seringas são descritos na Região Extra-Amazônica. Dados compreendidos entre 1983 e 2006 mostram que, de 25.749 casos de malária notificados no Estado de São Paulo, 0,41% foram classificados como induzidos, seja pela transmissão por seringas contaminadas ou transfusão sanguínea (SÃO PAULO, 2013). Embora a incidência de malária transfusional não seja conhecida no Brasil, este evento pode contribuir para a disseminação da doença em áreas com transmissão ativa, onde a triagem clínico-epidemiológica não esteja sendo efetuada de maneira rigorosa (SÁEZ-ALQUÉZAR et al, 1998). Esses autores obtiveram grande variação nos índices de positividade de anticorpos anti-*P. vivax* e anti-*P. falciparum* entre doadores aptos em diferentes regiões do Brasil. Mais recentemente alguns casos de malária transfusional foram reportados, incluindo um caso letal causado por *P. malariae* em um receptor esplenectomizado, cuja infecção foi confirmada por hemoscopia (8,7%) e diagnóstico molecular. *P. malariae* foi transmitido por um doador assintomático, sem deslocamentos para áreas de alto risco de malária. O doador relatou ter viajado dois anos antes da doação, para Iguape, uma cidade localizada em área de Mata Atlântica do Estado de São Paulo onde são descritos casos esporádicos de malária autóctone e assintomática. A hemoscopia do doador foi negativa e a PCR confirmou *P. malariae*. A sorologia mostrou-se reagente para anticorpos IgG antiplasmodiais. Um segundo receptor do mesmo doador manteve-se assintomático, com PCR positivo (KIRCHGATTER et al, 2005). Outro caso de doador assintomático portando *P. malariae* foi relatado. A transmissão

ocorreu em um banco de sangue privado da cidade de São Paulo. O receptor, que sempre residiu na cidade de São Paulo e não tinha deslocamentos para regiões de malária nem para Mata Atlântica, recebeu componentes sanguíneos de 50 doadores diferentes. Após desenvolver quadro febril, a hemoscopia revelou *P. malariae*. Um doador foi positivo para *Plasmodium* pela microscopia, mas a identificação da espécie não foi possível devido à parasitemia muito baixa, com encontro de raríssimas formas. A PCR detectou presença de *P. malariae*. O doador reportou várias viagens a Juquiá, cidade também localizada na Mata Atlântica de São Paulo (SCURACCHIO et al, 2011).

O aumento de deslocamentos de indivíduos para diferentes regiões em viagens relacionadas a turismo e negócios, incluindo áreas com possibilidade de transmissão da malária, exige a atenção dos serviços de hemoterapia e de vigilância epidemiológica em áreas endêmicas e não endêmicas. Em bancos de sangue são utilizados questionários para identificar indivíduos com risco de transmitir malária, excluindo aqueles que relatam deslocamentos por áreas endêmicas, o que não evita transmissão transfusional, devido às falhas de informação. Em todo o mundo há uma grande preocupação quanto à segurança transfusional em relação à malária. A OMS apresenta alguns critérios relacionados à triagem de sangue quanto a infecções TTS. As recomendações incluem garantia de qualidade na triagem de todo sangue doado, com relação a HIV, hepatite B, hepatite C, sífilis e, se for caso, as infecções que possam constituir risco para a segurança do suprimento de sangue, como *Trypanosoma cruzi* e espécies de *Plasmodium*, com base em evidências epidemiológicas locais. Os principais testes utilizados para a triagem de sangue são imunoensaio enzimáticos, imunoensaio quimioluminescentes, hemaglutinação/ensaio de aglutinação de partículas, testes rápidos e teste de amplificação do ácido nucleico (NAT). No contexto da triagem de sangue, é necessária uma avaliação adequada da escolha do tipo de ensaio para cada infecção TTS, com base nas características críticas do ensaio, tais como a sensibilidade e especificidade, assim como o custo e facilidade de utilização. Embora haja um grande número de alvos potenciais para a seleção do método de triagem para malária, a escolha da técnica é muito importante e pode depender do nível de endemicidade da malária. Estratégias de triagem são geralmente complexas, combinando critérios específicos para a seleção de doadores, com base na sazonalidade, região geografia e a disponibilidade de profilaxia antimalárica, com a triagem laboratorial (WHO 2010).

Em países endêmicos, a detecção de parasitos por gota espessa é frequentemente utilizada. No entanto, existe o risco de que esta abordagem não detecte níveis baixos de

parasitemia, permitindo que a transmissão possa ocorrer (Lo et al, 2015). Em alguns países não endêmicos, a detecção de anticorpos específicos é utilizada para triagem de candidatos identificados como sendo de risco para transmissão da malária. Postula-se que o deferimento de indivíduos com risco de infecção após seis meses a contar da data da última exposição potencial, combinado com o teste de anticorpos para malária, possa impedir a transmissão (WHO 2010). No entanto, estes critérios não foram capazes de evitar um caso de malária TTS originada de um doador em que foram seguidos os critérios de indeferimento por seis meses após visita a área endêmica. O doador foi assintomático e realizou 15 doações de sangue durante seis anos. Em função dos sintomas do último receptor e da detecção de malária, o doador foi investigado. ELISA, microscopia, ensaio de imunofluorescência, QBC e PCR foram realizados. A imunofluorescência e a PCR foram os únicos testes capazes de detectar a infecção por *Plasmodium*. O caso exemplifica que mesmo seguindo os critérios de exclusão e da triagem utilizando a microscopia ou detecção de antígenos por teste imunoenzimático, a transmissão ainda pode ocorrer. Isso aponta para a necessidade de ferramentas mais sensíveis, a fim de evitar a transmissão de malária em bancos de sangue (BROUWER et al, 2013).

Embora questionários sejam aplicados como critérios de seleção para identificar e deferir indivíduos com malária, que residam ou que tenham viajado para áreas endêmicas, estas medidas mostram ser complexas e não específicas, permitindo a doação de portadores assintomáticos (BROUWER et al, 2013; SCURACCHIO et al, 2011), ou então o indeferimento de mais de 100.000 doadores por ano, como já ocorreu nos EUA (Allain et al, 2009) Algumas medidas na triagem de doadores são realizadas para evitar o risco de malária TTS em alguns países (Quadro 1).

Quadro 1. Apresentação de diferentes métodos de triagem para malária em bancos de sangue em diferentes países.

País	Crítérios de exclusão de doadores por risco de malária	Testes para detecção de <i>Plasmodium</i>	Medidas preventivas	Casos transfusionais (últimos 10 anos)
Alemanha	Não tem	Não tem	Inativação de patógenos	Não tem
Brasil	Área Endêmica: malária últimos 12 meses; febre últimos 30 dias; deslocamento para área de alto risco (IPA maior que 49,9) últimos 30 dias Área não endêmica: deslocamento para áreas endêmicas últimos 30 dias Independente da endemidade, o candidato que teve <i>P. malariae</i>	Testes de detecção do plasmódio ou de antígenos plasmodiais	Triagem epidemiológica Aplicação de testes de detecção do parasito ou seus antígenos, quando aplicável	Quatro casos
Dinamarca	Residência em área de malária nos primeiros cinco anos de vida; primeira doação depois de retorno de área endêmica nos últimos três anos; febre nos seis meses após retorno de área endêmica; histórico de malária	Teste de anticorpos para malaria IFA	Em caso de teste positivo para anticorpo, o candidato é recusado permanentemente.	Não tem
Espanha	Recusa temporária de nascidos em áreas endêmicas por três anos	ELISA para anticorpos; positivos: teste com NAT	Inativação em de plaquetas	
Estados Unidos	Histórico de malária últimos três anos; deslocamento para área de malária nos primeiros cinco anos de vida; deslocamento para área endêmica últimos 12 meses	Nenhum teste para detecção de anticorpos em doadores de sangue foi licenciado	Não tem	Um caso em 2007
Finlândia	Deslocamento para área endêmica ou malária últimos três anos; febre não diagnosticada últimos seis meses; teste positivo é recusa permanente	Teste ELISA contra anticorpos de <i>P. falciparum</i>	Leucoredução; testes em doadores residentes em área endêmica primeiros cinco anos de vida	Não tem
Israel	Deslocamento para área endêmica últimos 12 meses; residência em área endêmica últimos três anos; malária últimos três anos	Não tem	Não tem	Não tem
Itália	Doadores com fatores de risco são rejeitados, mas podem doar plasma para fracionamento seis meses depois do retorno da área endêmica.	Até 2005, teste para anticorpo era recomendado para exclusão.	Não tem	Dois possíveis casos nos últimos cinco anos.
Noruega	Deslocamento para área endêmica por mais de seis meses; febre não diagnosticada últimos seis meses após visita a área endêmica; residência em área endêmica primeiros cinco anos de vida; visita a área endêmica últimos 12 meses; teste positivo é recusado permanentemente	Teste com antígenos recombinantes de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	Aplicação de testes de detecção de anticorpos	Não tem
Nova Zelândia	Teste positivo	ELISA com quatro antígenos recombinantes de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	Teste anticorpo em visitantes de área endêmica; teste positivo para anticorpo: teste para antígenos	Não tem
Reino Unido	Doadores que realizaram somente conexão em aeroportos de área endêmica; deslocamento para área endêmica	ELISA com antígenos de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> ; NAT	Não tem	Não tem
Rússia	Não tem, pois somente cidadãos registrados podem doar	Não tem	Inativação de patógenos em concentrados de plaquetas, realizados em centros regionais	Não tem
Suécia	Não	Não	Não	Não

Fonte: Reesink et al., 2010; Brasil, 2013

Considerando as áreas endêmicas e não endêmicas no Brasil, diferentes estratégias devem ser seguidas no controle da malária TTS, segundo a Portaria Nº 2.712 de 12 de novembro de 2013 (Brasil, 2013), que aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos:

Art. 57. Para malária, a inaptidão de candidato à doação de sangue deve ocorrer usando-se, como critério de referência, a Incidência Parasitária Anual (IPA) do Município.

§ 1º Em áreas endêmicas com antecedentes epidemiológicos de malária, considerar-se-á inapto o candidato:

I - que tenha tido malária nos 12 (doze) meses que antecedem a doação;

II - com febre ou suspeita de malária nos últimos 30 (trinta) dias; e

III - que tenha se deslocado ou procedente de área de alto risco (IPA maior que 49,9) há menos de 30 (trinta) dias.

§ 2º Em áreas não endêmicas de malária, considerar-se-á inapto o candidato que tenha se deslocado ou que seja procedente de Municípios localizados em áreas endêmicas há menos de 30 (trinta) dias.

§ 3º Em áreas não endêmicas de malária, considerar-se-á apto o candidato:

I - procedente de Municípios localizados em áreas endêmicas, após 30 (trinta) dias e até 12 (doze) meses do deslocamento, sendo que, nesse período, é necessária a realização de testes de detecção do plasmódio ou de antígenos plasmodiais, conforme art. 132;

II - procedente de Municípios localizados em áreas endêmicas, após 12 (doze) meses do deslocamento, sem necessidade de realização de testes de detecção; e

III - que tenha manifestado malária após 12 (doze) meses do tratamento e comprovação de cura.

§ 4º Independentemente da endemicidade da área, será considerado inapto definitivo o candidato que teve infecção por "*Plasmodium malariae*" (Febre Quartã).

§ 5º Em casos de surtos de malária, a decisão quanto aos critérios de inaptidão deve ser tomada após avaliação conjunta com a autoridade epidemiológica competente.

Art. 132. Nas regiões endêmicas de malária, com transmissão ativa, independente da incidência parasitária da doença, será realizado teste para detecção do plasmódio ou de antígenos plasmodiais.

A ocorrência de parasitemia sem sintomas clínicos, além do fato de que *Plasmodium* pode sobreviver armazenados em glóbulos vermelhos entre 2 e 6º C por até três semanas, aumenta o risco de transmissão (Seed et al, 2005). Um único parasito identificado na

avaliação microscópica de uma gota espessa (4 μL) é equivalente a ~10.000 parasitos em uma unidade de sangue de 450 mL (Owusu-Ofori et al, 2010). Doadores de sangue infectados podem ter uma parasitemia discreta da ordem de 1-2 parasitos por μL , que não podem ser detectados por microscopia comum. Um receptor que recebesse apenas uma unidade de tal sangue poderia receber um inóculo de cerca de 400.000-800.000 parasitos (Bruce-Chwatt, 1974).

Algumas tentativas para buscar agentes capazes de inativar patógenos transmitidos por transfusões podem ser citadas, como a violeta de genciana, que poderia inativar formas vivas circulantes de *Trypanosoma cruzi* no sangue doado (NUSSENZWEIG et al, 1953). Porém, este composto não apresenta amplo espectro, além de ação deletéria sobre as plaquetas. A inativação de patógenos transfusionais deve ser segura para o receptor, ter atividade nas condições de temperatura e pH em que os hemoderivados são mantidos e não interferir na fisiologia de plaquetas, hemácias e proteínas plasmáticas, condições difíceis de manter e de alto custo.

6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA MALÁRIA

A gota espessa corada com Giemsa (Ross, 1903) tem sido utilizada para detecção dos parasitos através da microscopia há mais de um século e é considerada o padrão ouro no diagnóstico de malária. O encontro de *Plasmodium* no sangue periférico, com determinação da espécie e quantificação da parasitemia, é essencial para orientar o tipo de tratamento, o prognóstico e o acompanhamento do paciente.

Na triagem de doadores, a detecção do parasito através da gota espessa não é o método mais adequado, visto que a técnica é demorada e a sensibilidade depende da experiência do microscopista, com limite de detecção variando de 5 a 100 parasitos/ μL (MOODY, 2002; MILNE et al, 1994) o que a torna um padrão-ouro imperfeito, já que o diagnóstico é influenciado pelo nível de conhecimento dos microscopistas, qualidade dos reagentes e equipamentos, capacidade de carga de trabalho e procedimentos de controle de qualidade (WONGSRICHANALAI et al, 2007). Mesmo em centros de referência qualificados, a gota espessa pode falhar em diferenciar espécies de *Plasmodium* cuja morfologia é bastante similar, como é o caso de *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (DI SANTI et al, 2004) ou resultar em diagnóstico falso-negativo, especialmente quando a parasitemia é muito baixa, em nível submicroscópico (Ochola et al, 2006).

Os testes rápidos (RDT – *rapid diagnostic tests*) surgiram como uma alternativa para a detecção de antígenos do parasito (ÁVILA et al, 2002) e empregam técnicas de imunocromatografia. São baseados na detecção de *histidine-rich protein 2* (HRP-2), lactato desidrogenase do parasito (pLDH) ou aldolase, podem ser realizados por profissionais com treinamento mínimo e os resultados são obtidos entre 10 e 20 minutos. Porém seu alto custo e baixa sensibilidade restringem a aplicação em triagem de doadores (MURRAY et al, 2003; BELIZÁRIO et al, 2005; SEED et al, 2005). Foram desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos para detecção de antígenos, porém com sensibilidade entre 100 e 1.000 parasitos/ μ L, inferior à da gota espessa, quando esta é realizada por microscopistas experientes (HUONG et al, 2002).

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de vantagens no diagnóstico de malária mista (BARKER et al, 1994; KANUNFRE, 2003). Sua utilização tem sido indicada em áreas endêmicas, para a detecção de assintomáticos em triagem de doadores de sangue (ALLAIN, 2010). Fugikaha e colaboradores (2007) realizaram triagem de doadores de sangue, utilizando a técnica de *seminested* PCR, em quatro bancos de sangue da Região Amazônica brasileira, obtendo uma taxa de positividade entre 1 a 3%, com uma média de 2,3%. Todos os indivíduos positivos tinham infecções mistas entre *P. vivax* e *P. falciparum*. A maioria das amostras positivas originou-se dos Hemocentros de Porto Velho (RO) e de Macapá (AP). Snounou e colaboradores (1993) desenvolveram metodologia de *nested* PCR, com alta sensibilidade e especificidade, para determinação de quatro espécies de *Plasmodium* que parasitam o homem, permitindo a detecção de 1 parasito/ μ L.

Em comparação com a PCR convencional, o método quantitativo de PCR em tempo real (qPCR) utiliza marcadores fluorescentes para monitorização contínua da formação do *amplicons* ao longo da reação e fornece cópias de DNA relativas à quantidade de parasitos, o que é impossível por PCR convencional. QPCR pode oferecer informações mais confiáveis para detecção da infecção em especial sobre as infecções assintomáticas submicroscópicas (Lo et al, 2015). A técnica de qPCR tem sido utilizada para detecção simultânea das espécies de *Plasmodium*. É uma técnica rápida, automatizada, acurada e eficiente para aplicação em grandes quantidades de amostras. Estudos utilizando qPCR, tendo como padrão ouro a gota espessa, mostraram que a qPCR mostrou alta sensibilidade e especificidade (SWAN et al, 2005). Apresenta as seguintes vantagens sobre a *nested* PCR: dispensa trabalho intenso e profissionais altamente treinados e envolve uma única etapa de processamento, sendo que

a *nested* PCR exige no mínimo duas; é realizada em sistemas fechados, o que diminui a ocorrência de contaminação; os resultados são obtidos em cerca de 4 vezes menos tempo que a *nested* PCR; a técnica permite simultaneamente a detecção e quantificação dos parasitos (ROUGEMONT et al, 2004). Farcas e colaboradores (2004) mostraram correlação entre as parasitemias obtidas na gota espessa e o número de cópias gênicas amplificadas por PCR em tempo real. Além disso, a técnica dispensa a manipulação de reagentes tóxicos e realização de eletroforese em gel de agarose. Em atividades de pesquisa científica e em centros de referência a discussão não é se a PCR deve ser adotada como padrão-ouro, mas qual método deve ser recomendado. Tendo como referência a gota espessa, um estudo comparativo entre a *nested* PCR, PCR *multiplex* e PCR em tempo real, mostrou que a última apresentou melhor desempenho em relação à sensibilidade e especificidade (BOONMA et al, 2007).

A detecção de anticorpos específicos é um indicador de resposta do hospedeiro, embora não indique necessariamente que o indivíduo esteja parasitado. Por outro lado, um teste sorológico negativo não exclui a infecção por *Plasmodium*, pois os anticorpos nem sempre são detectados no início da infecção. Indivíduos que residiram em áreas endêmicas e que contraíram a doença repetidas vezes, possuem níveis de anticorpos elevados, que podem ser detectados por longos períodos após a cura. Estes indivíduos seriam excluídos da doação, critério que confere maior segurança à triagem, visto que já foram relatados casos de malária transfusional por *P. falciparum* oito anos depois da saída da área endêmica (KITCHEN et al, 2005), por *P. vivax*, cinco anos e por *P. malariae*, 44 anos (MUNGAI et al, 2001), todos em portadores assintomáticos. Em 2003, o CDC reportou um caso de malária transfusional em que os testes realizados no doador, tanto pela gota espessa como pela PCR foram negativos. A imunofluorescência indireta mostrou títulos baixos para *P. falciparum*. (ARAFAT et al, 2003). Esta técnica sorológica é de difícil aplicação em triagem de doadores, por se tratar de protocolo demorado, de leitura subjetiva e exigir grandes quantidades de antígeno. Os testes rápidos capazes de detectar anticorpos poderiam então, ser uma alternativa para o processamento de grande número de amostras, como é a demanda em serviços de hemoterapia.

Testes rápidos que utilizam o princípio da imunocromatografia para a detecção de anticorpos foram desenvolvidos, podendo ser úteis em estudos soroepidemiológicos (PARK et al, 2003). O SD Bioline Malária Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.) é um RDT para detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos contra *P. falciparum* e *P. vivax* com

antígenos de captura recombinantes das proteínas MSP e CSP para as duas espécies de parasitos humanos em sangue total, soro ou plasma. Em estudo realizado com amostras de soro de pacientes com gota espessa ou PCR positiva, este teste apresentou sensibilidade de 94% (COSTA-NASCIMENTO et al, 2007). Testes sorológicos apresentam boa sensibilidade em indivíduos imunes, que são os doadores de risco, visto que podem estar pauciparasitados e assintomáticos (KITCHEN et al, 2005).

Em áreas não endêmicas, a combinação de testes para detecção de anticorpos e de parasitos ou seus produtos pode ser uma alternativa para aumentar a sensibilidade na triagem de candidatos à doação de sangue.

Assim como no diagnóstico individual, no processamento de amostras em *pool* é preciso adotar alternativas moleculares, seja por necessidade de técnicas mais sensíveis, seja pela adoção de metodologias que possam ser aplicadas em grande número de amostras, como em estudos clínicos, epidemiológicos ou em triagem de doadores em bancos de sangue. A plataforma em *pools* foi realizada por Bharti e colaboradores (2009), onde dois grupos de soros, com 1% e 5% de prevalência de malária, foram testados por PCR, com detecção da infecção nas amostras das duas matrizes. Estes autores concluíram que estudos de campo eram necessários com amostras clínicas de sangue para validar este arranjo em *pool*.

Neste estudo, nossa proposta de utilizar técnicas moleculares (PCR em tempo real e *nested* PCR) e um teste rápido específico para detecção de anticorpos, apoia-se na necessidade de avaliar o uso desses ensaios em grande número de amostras clínicas agrupadas em *pools*. O desempenho desta plataforma foi validado em estudo anterior com boa sensibilidade e ótima correlação entre os testes moleculares (LIMA et al, 2011). O arranjo em *pools* reduz o tempo e o custo do processamento. A aplicabilidade deste estudo está também associada a diferentes aspectos relacionados ao controle da malária: em áreas endêmicas estudos epidemiológicos exigem processamento de grande amostragem, com ferramentas rápidas e eficientes. Por outro lado, em áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade, as atividades de prevenção e vigilância pressupõem constante monitoramento dos focos autóctones, onde são descritos casos assintomáticos e as coletas de sangue de populações residentes envolvem grande número de amostras. Porém, a problemática envolvendo triagem de doadores, que requer metodologia capaz de contemplar a densa rotina dos serviços de hemoterapia, é o principal objetivo deste estudo.

7. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços na busca por segurança transfusional, não existe transfusão isenta de riscos (CARRAZONE et al, 2004). A transmissão de patógenos através de hemocomponentes ocorre quando o doador infectado não é detectado pelos métodos de triagem, transferindo o agente etiológico a um hospedeiro susceptível (COVAS, 2001). Embora os dados sobre malária transfusional no Brasil sejam escassos, relatos de acidentes dessa natureza mostram a necessidade de estudos que possam determinar a prevalência de marcadores específicos para malária em candidatos à doação de hemocomponentes (SCURACCHIO et al, 2011). Acidentes transfusionais em receptores imunodeprimidos podem ocasionar doença grave e mesmo óbito (KIRCHGATTER et al, 2005). A triagem clínico-epidemiológica para seleção de doadores, somada aos testes para pesquisa de marcadores específicos, diminui sensivelmente a possibilidade de transmissão de doenças por meio de transfusão.

O presente estudo visa oferecer testes para triagem de doadores de sangue que sejam eficazes na detecção de *Plasmodium* e capazes de processar grande número de amostras diminuindo custo e tempo de processamento através do agrupamento em *pools* e avaliando diferentes técnicas moleculares, e que já foram validadas em estudo anterior com análise individual e em *pools* (Lima et al, 2011; Lucchi et al, 2013; Snounou et al, 1993). É a primeira vez que é realizado uma investigação de malária com uma amostragem de abrangência nacional, representando o universo hemoterápico brasileiro, com doadores de áreas endêmicas e não endêmicas, de serviços públicos e privados, sendo esta uma oportunidade de avaliar a situação no país quanto a prevalência de malária em doadores de sangue. É importante ressaltar que o novo Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos (Portaria 2.712/2013) recomenda realização de teste para detecção do plasmódio ou de antígenos plasmodiais nas regiões endêmicas de malária, e também indica a necessidade de testes em área não endêmica, para aplicação em candidatos que tenham frequentado áreas endêmicas de 30 dias até 12 meses antes da doação, bem como aqueles tratados e curados há mais de 12 meses. É importante ressaltar que a recomendação de que não é necessário a realização de testes de detecção em candidatos com mais de 12 meses de deslocamento de área endêmica pode resultar em transmissão de malária (Brouwer et al, 2013) e o desconhecimento de áreas com transmissão também aumenta o risco

transfusional de malária (KIRCHGATTER et al, 2005; SCURACCHIO et al, 2011). Os resultados deste estudo poderão subsidiar as iniciativas das agências reguladoras hemoterápicas.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL:

Estimar a existência de portadores assintomáticos de *Plasmodium* entre os doadores de sangue de serviços hemoterápicos brasileiros e analisar a prevalência de marcadores específicos para malária através de testes moleculares e sorológico.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.1 Avaliar o desempenho da PCR em tempo real para detecção de *Plasmodium* em amostras de sangue processadas em *pool*;
- 2.2 Avaliar o desempenho da PCR em tempo real para detecção de *Plasmodium* em amostras individuais dos *pools* positivos;
- 2.3 Comparar diferentes técnicas moleculares em tempo real no processamento de amostras em *pool* e individuais;
- 2.4 Determinar a espécie de *Plasmodium* nas amostras individuais dos *pools* positivos através da *nested* PCR;
- 2.5 Avaliar o desempenho do teste SD Bioline® para detecção de anticorpos antiplasmodiais em número significativo de amostras de soro processadas em *pool*.
- 2.6 Comparar as técnicas moleculares e sorológica e analisar a positividade e concordância entre as técnicas.
- 2.7 Relacionar os locais ou serviços hemoterápicos onde foram encontrados doadores positivos para *Plasmodium*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo de corte transversal. As amostras foram coletas em 2001, em estudo anterior, como parte da tese de doutorado do Dr. Silvano Wendel (2005). O cálculo amostral foi feito a partir da técnica de conglomerados para todo o território nacional, uma técnica mais barata e largamente utilizada em amostragens populacionais (Cochran, 1977; Kish, 1995; Levy & Lemeshow, 1999). A análise de conglomerados foi utilizada para a identificação de bancos de sangue que estivessem próximos espacialmente. Os principais conglomerados hierarquizados pelo método do Vizinho Mais Próximo, demonstraram alto grau de concentração geográfica dos serviços hemoterápicos no país. Após identificação dos pontos que realizam coleta de sangue, e da aceitação destes em participar do estudo, foram obtidas informações quanto ao número de coletas realizadas por 1000 habitantes anualmente em cada serviço, e então calculado número doadores de cada local para a participação do estudo (Wendel, 2005).

2. ÁREA DE ESTUDO

Neste estudo de abrangência nacional, participaram 147 serviços hemoterápicos: Hemocentro Coordenador, Hemocentro Regional, Hemonúcleo, Serviço de Hemoterapia, Unidade de Coleta e Transfusão, Agência Transfusional Tipo I, Agência Transfusional Tipo II ou Unidade Sorológica (Figura 6), de natureza jurídica (pública, privada, filantrópica, universitária), localizados em áreas endêmicas e não endêmicas para malária. A distribuição espacial dos serviços hemoterápicos mostra a grande importância dos serviços públicos, filantrópicos e universitários no território brasileiro, cerca de 60%, contracenando com a iniciativa privada com ou sem fins lucrativos nos 40% restantes. Neste trabalho, não foi possível diferenciar os diversos segmentos, por se tratar de estudo retrospectivo em que no estudo anterior essas informações não foram consideradas por entender que independentemente da natureza do serviço hemoterápico, ele está inserido no contexto nacional. Apesar das diferenças espaciais da representatividade (maior preponderância do segmento público na Amazônia, nos estados do Nordeste e em Minas Gerais), não foi o escopo do trabalho anterior tentar explicar a sua causa, apenas descrever a sua posição espacial. O total estimado inicialmente de 16.654 amostras a partir dos 212 serviços que concordaram em fornecer amostras para o painel nacional não foi alcançado, principalmente em decorrência da não participação do setor hemoterápico público do estado de Minas Gerais, onde se planejava coletar, inicialmente, um total de 2343 amostras (14% do total

nacional); apesar das tentativas, não foi possível uma representatividade maior. Desta forma, este estado só foi representado por um serviço privado de Belo Horizonte, cujo número de amostras foi aumentado em relação ao originariamente calculado. Em síntese, o painel nacional teve uma representatividade ausente para o Amapá e Roraima, e parcial para Minas Gerais. Apesar de não se contar com respostas dos estados do Amapá e Roraima, os dados apresentados pelo Ministério da Saúde mostram que estes estados não representam mais do que 1% de toda a produção hemoterápica brasileira, não tendo, portanto, um grande papel na influência da acurácia das informações obtidas.

Figura 6. Composição da Hemorrede Brasileira: Setores Público e Privado em 2000

Fonte: Publicação/MS – Normas para Implantação de Unidades Hemoterápicas e Hematológicas.

3. POPULAÇÃO DO ESTUDO

De acordo com o Ministério da Saúde (www.anvisa.gov.br) em 2002 (época da coleta das amostras deste estudo) o Brasil coletou 3.035.748 unidades de sangue total entre serviços públicos e privados contratados pelo SUS (Sistema Único de Saúde). O número e coletas idealizado para cada local foi baseado em dados estimados do número total de coletas por 1000 habitantes, dispostos por unidade da federação (UF). Foi observado uma intensa heterogeneidade do total de coletas por 1000 habitantes, de acordo com as diferentes unidades da federação (UF), indo de valores tão baixos como 3:1000 habitantes no Maranhão até valores iguais ou superiores a 40:1000 habitantes no Espírito Santo ou Tocantins. Como média, o Brasil colhe de cerca de 24 unidades de sangue total a cada 1000 habitantes, valores estes bem inferiores ao preconizado pela Organização Mundial da Saúde

(Hollán et al, 1990). A distribuição dos pontos de coleta mostrou, uma grande concentração no sudeste brasileiro, o que corre em paralelo à distribuição dos municípios neste país.

Atualmente, são coletadas no País, cerca de 3,6 milhões de bolsas/ano, o que corresponde ao índice de 1,8% da população doando sangue, o percentual está dentro dos parâmetros da Organização Mundial de Saúde (Portal Brasil : <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/06/ministerio-da-saude-lanca-nova-campanha-de-doacao-de-sangue>)

A população deste estudo foi constituída por 13.383 doadores de sangue provenientes de 147 serviços hemoterápicos brasileiros (Tabela 2). Este painel nacional de doadores de sangue permite avaliar a prevalência de doadores infectados por *Plasmodium* através de ferramentas moleculares. Cada serviço de hemoterapia participante utilizou seus próprios critérios de seleção de doadores. O número de amostras recebidas variou em função da adesão dos serviços ao estudo. Amostras foram obtidas de doadores já avaliados pela anamnese (conforme o padrão estipulado em cada serviço), sendo considerados aptos a doar e mediante aceitação e preenchimento do termo de consentimento informado (ANEXO I). Essas amostras foram adquiridas e processadas em estudo anterior (Wendel, 2005), e gentilmente cedidas para o presente estudo, pelo Dr. Silvano Wendel, visto que o consentimento pós-informado utilizado antes das coletas forneceu aos sujeitos da pesquisa a possibilidade de optar pela conservação das amostras para uso posterior. Neste painel, o sexo masculino teve participação em 61% das doações, as mulheres em 19% e sem informação quanto ao sexo em 20% (Figura 7). Não houve diferença na idade média entre os doadores masculinos ou femininos (cerca de 32 anos). A Região Amazônica foi representada com 1.076 doadores e a Região Extra-Amazônica com 11.924 doadores.

Tabela 2. Amostras de sangue de doadores coletadas por unidade da federação em 212 serviços de hemoterapia localizados em áreas endêmicas e não endêmicas do Brasil, por região geográfica

Regiões/Estados	Número de doadores	Total
Região Norte		920
Acre	5	
Amazonas	252	
Pará	235	
Rondônia	62	
Tocantins	366	
Região Nordeste		2559
Alagoas	200	
Bahia	672	
Ceará	345	
Maranhão	8	
Paraíba	255	
Pernambuco	511	
Piauí	280	
Rio Grande do Norte	33	
Sergipe	255	
Região Centro Oeste		1665
Distrito Federal	90	
Goiás	1155	
Mato Grosso	148	
Mato Grosso do Sul	272	
Região Sudeste		4343
Espírito Santo	302	
Minas Gerais	503	
Rio de Janeiro	678	
São Paulo	2860	
Região Sul		3896
Paraná	1935	
Rio Grande do Sul	934	
Santa Catarina	1027	
Total		13383

Figura 7. Distribuição dos doadores de sangue de acordo com o padrão de doação estratificado por sexo.

4. ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS ALIQUOTADAS

Após a coleta, os tubos com anticoagulante (K2EDTA BD Vacutainer PPT) foram mantidos em temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir, foram centrifugados por 10 minutos a 1300 x g. Orientou-se a não retirar o soro sobrenadante, deixando-o em seu tubo original em contato com o gel separador e armazená-lo em seu suporte de isopor em refrigeração a 4° C até o envio posterior. Outra importante recomendação foi a de não congelar as amostras. O envio das amostras ocorreu o mais rapidamente possível após o término da coleta de todas as amostras calculadas para o serviço colaborador. Este serviço central foi então incumbido de enviar as amostras para São Paulo, utilizando a World Courier. Os tubos PPT foram congelados a -30° C após a identificação interna em estante padrão, em ordem crescente. Após descongelamento das amostras, foram realizadas alíquotas individuais de plasma e após remover o gel entre o plasma e o concentrado de hemácias, este também teve alíquotas individuais e foi armazenado a -20°C para análises futuras. Inicialmente o número de doadores foi de 13.383, porém na separação de plasma e concentrado de hemácias verificou-se não haver volume suficiente de concentrado de hemácias em 402 amostras, sendo então o número de concentrado de hemácias 12.981 amostras e 13.383 amostras de plasma.

5. MONTAGEM DOS POOLS

Foram montados 1.299 *pools* seguindo a ordem numérica das amostras a serem analisadas, cuja origem geográfica não era conhecida pelo pesquisador. Para cada *pool* foram utilizados 300 μ L de papa de hemácias de cada 10 amostras individuais resultando em 3 mL de papa de hemácias por *pool* (Figura 8). O último *pool* foi composto apenas pelas três últimas amostras restantes contendo 900 μ L de papa de hemácias no *pool*. Uma alíquota de cada amostra individual foi armazenada para processamento individual dos *pools* positivos.

Figura 8. Montagem dos *pools* com 300 μ L de concentrado de hemácias de 10 doadores, formando um total de 3 mL por *pool*

6. EXTRAÇÃO DE DNA

Cada *pool* foi submetido à lise com saponina 1% (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA), com duas lavagens subsequentes com água ultrapura, obtendo-se um *pellet* concentrado. Desse *pellet* foi retirado 200 μ L para extração do DNA genômico com QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído em volume final de 50 μ L e estocado a -20°C para os procedimentos posteriores. Após extração o DNA foi submetido a um quantificador automático da Eppendorf® (BioPhotometer) ou da Thermo Scientific (Nanodrop) com leitura da densidade óptica a 260 nm (DO_{260}), para avaliar a quantidade de DNA, e a 280 nm (DO_{280}) para estimar a

contaminação com proteínas. O mesmo procedimento de extração foi realizado para as amostras individuais dos *pools* positivos.

7. ANÁLISE MOLECULAR

Foram empregados 3 ensaios moleculares para detecção do DNA genômico de *Plasmodium* com diferentes protocolos de qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*): Lima qPCR, PET-PCR (*Photo-Induced Electron Transfer*) e RealAmp (*Real-Time Fluorescence Loop Mediated Isothermal Amplification*), além de um protocolo para diferenciação de espécies PET-PCR *Pf*. A *nested* PCR foi empregada na identificação das espécies de *Plasmodium*. Os *pools* positivos foram abertos e as amostras individuais foram ensaiadas para identificação do doador infectado e indicação da espécie de *Plasmodium* envolvida. As amostras foram ensaiadas em duplicata nos protocolos Lima qPCR, PET-PCR e em simplicata nos protocolos RealAmp e *nested* PCR. As técnicas são descritas a seguir.

7.1. Protocolo Lima qPCR (TaqMan®)

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) para amplificação gênero-específica (Lima et al, 2011) foi modificada de Gama e colaboradores (2007) quanto a redução do volume de reagentes e modificação no número de ciclos, visando obter protocolo com menor custo e maior sensibilidade. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) M60 e M61 assim como da sonda M62 (Tabela 3) contendo FAM™ (5-carboxifluoresceína), e um *quencher* TAMRA™ (N, N, N, N-tetrametil-6-carboxirrodamina) (Applied Biosystems, Foster City, Calif.), foram desenhadas para detecção do gene que codifica a SSU rRNA de *Plasmodium*. A reação foi preparada com 2.5 µL de DNA genômico adicionado a um volume de 22.5 µL por reação contendo 12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x, 500 nM de cada primer gênero-específico M60 e M61, e 300 nM da sonda M62 marcada FAM™ e TAMRA™. Amplificação e detecção foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram ensaiadas em duplicata no ABI PRISM 7300 ou 7500 da (Applied Biosystems). O valor de *Cycle Threshold* (C_t), utilizado como ponto de corte (*cut-off*) da reação foi delimitado através de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), realizado com os resultados dos controles positivos e negativos. O C_t é um limiar que mostra o número do ciclo em que houve fluorescência suficiente para cruzar a linha que mostra o início de uma amplificação exponencial. O limite de detecção é de 1 parasito/µL (Lima et al, 2011).

Tabela 3. Sequências dos *primers* gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de *Plasmodium* e sonda FAM-TAMRA (GAMA et al, 2007) para realização de PCR em tempo real

<i>Primers/Sonda</i>	Sequência 5' → 3'
Primer M60	ACA TGG CTA TGA CGG GTA ACG
Primer M61	TGC CTT CCT TAG ATG TGG TAG CTA
Sonda M62	FAM [™] - TCA GGC TCC CTC TCC GGA ATC GA - TAMRA [™]

7.2. Protocolo Lima qPCR (EvaGreen®)

Com o intuito de reduzir ainda mais os custos do protocolo de Lima qPCR (LIMA et al, 2011) descrito acima, foi realizada modificação nos reagentes e sonda, para utilização de corante intercalante EvaGreen® (Biotium) e Fast EvaGreen® Master Mix 2X (Biotium) em substituição à sonda M62 marcada FAM[™] e TAMRA[™] e ao TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems). Utilizamos os mesmos *primers* M60 e M61, desenhados para detecção do gene que codifica a SSU rRNA de *Plasmodium*. A reação foi preparada com 2.5 µL de DNA genômico adicionado a um volume de 17.5 µL por reação contendo 12,5 µL de Fast EvaGreen® Master Mix 2X (Biotium) contendo corante intercalante EvaGreen® e 500 nM de cada *primer* gênero-específico M60 e M61. O volume da reação foi ajustado para 20 µL com redução da água. Amplificação e detecção foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram ensaiadas em duplicata em termociclador Eco[™] (Illumina). O C_t utilizado como ponto de corte (*cut-off*) foi o mesmo usado no protocolo Lima qPCR.

7.3. PET-PCR

Uma colaboração com o Centers for Diseases Control and Prevention (CDC, Malaria Branch, Atlanta, GA, EUA) foi estabelecida e permitiu a comparação com diferentes técnicas de PCR em tempo real nas amostras agrupadas em *pools* e individuais: PET-PCR e RealAMP, cuja metodologia foi incorporada aos protocolos inicialmente propostos para este estudo.

O protocolo de PET-PCR foi descrito por Lucchi e colaboradores (LUCCHI et al, 2013), para amplificação da SSU rRNA do gene 18S utilizando um *primer* modificado na extremidade 5' com a adição de uma cauda universal com 17 bases de oligonucleótidos marcados com fluoróforo HEX (*P. falciparum* e *P. vivax*) ou FAM (gênero). O *primer* marcado

forma um *loop* e permanece fechado na ausência de amplificação, não emitindo, portanto, fluorescência devido à proximidade de quatro bases G (Figura 9). A reação foi realizada em *duplex* para amplificação de *Plasmodium* (PET-gen) e *P. falciparum* (PET-Pf) e separadamente para *P. vivax* (PET-Pv). As reações foram realizadas em um volume de 20 µL, com 10 µL de TaqMan 2x Environmental Master Mix (Applied Biosystems), 125 nM de *primer forward* e *reverse* (Tabela 4), e 2 µL de DNA. A ciclagem foi realizada com 95°C por 10 min seguida por 45 ciclos de 95°C por 10 seg e 60°C por 40 seg. Qualquer valor de C_t obtido até 40 ciclos, foi considerado como positivo. Possui limite de detecção de até 3.2 parasitos/µL (Lucchi et al, 2013).

Figura 9. *Primer* modificado PET-PCR. 1A. Formação de loop quando não há amplificação. 1B. *Primer* com emissão de fluorescência quando loop é desfeito pela presença de amplificação. Z: sequência específica do *primer*; FL: molécula de fluorescência; X, Y e ATA conjunto que forma estrutura em loop; X e Y são estrutura complementares

Tabela 4. Sequências dos *primers* gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de *Plasmodium* e espécie-específico para amplificação de DNA genômico de *P. falciparum* (LUCCHI, 2013) para realização de PET-PCR. *Primers reverse* contém molécula fluorescente

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'
<i>Plasmodium</i>	
<i>Forward</i>	GGC CTA ACA TGG CTA TGA CG
<i>Reverse</i>	FAM-agg cgc ata gcg cct gg CTG CCT TCC TTA GAT GTG GTA GT
<i>P. falciparum</i>	
<i>Forward</i>	ACC CCT CGC CTG CTC TTT TT
<i>Reverse</i>	HEX-agg cgc ata gcg cct gg TCG GGC CCC AAA AAT AGG AA

7.4. RealAmp PCR

A técnica de RealAmp PCR consiste em uma amplificação isotérmica onde a amplificação é detectada através de sinal fluorescente e é mediada por *primers* que fazem *loops*. A amplificação ocorre através da DNA polimerase BST que tem capacidade de deslocamento da fita dupla. Amplificação gênero-específica do gene que codifica para o RNA ribossômico 18S de *Plasmodium* resulta da formação de pirofosfato de magnésio que aparece como um precipitado no decorrer da reação, indicando um sinal positivo. É eficiente na amplificação de poucas cópias de DNA (10^9) em menos de uma hora. Quatro *primers* específicos para 6 regiões da sequência alvo (Tabela 5) fazem com que a reação seja altamente específica (HAN et al, 2007). A adição de dois *primers* (*loopprimers*) aceleram a formação do produto, diminuindo o tempo da reação. Como não exige termocicladores sofisticados, tem potencial para diagnóstico molecular *point-of-care*, adequado para bancos de sangue (NOTOMI et al, 2000; LUCCHI et al, 2010). O protocolo de Lucchi et al (2010) foi ajustado para usar 2,5 μ L de DNA. A reação foi preparada com 2X de tampão (40 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM KCl, 16 mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)SO₄, 0.2% Tween-20, 0.8M Betaine, 2.8 mM de cada dNTP), 0.25 mL de uma diluição de 1:100 de SYBR green e 8 unidades de Bst polimerase (New England Biolabs, Ipswich, MA), mantendo o volume total por reação de 12,5 μ L. A amplificação ocorreu em um único passo, em temperatura de 63°C por um tempo máximo de 60 min em equipamento ESE-Quant Tube scanner (ESE GmbH., Stockach, Germany) que foi programado para recolher sinais de fluorescência em intervalos de 1 minuto. As amostras que apresentassem amplificação com curva sigmoide dentro do período de 60 minutos foram consideradas positivas, possui limite de detecção que varia de 1–10 parasitos/ μ L dependendo da espécie.

Tabela 5. Sequências dos *primers* gênero-específicos para amplificação de DNA genômico de *Plasmodium* (HAN et al, 2007) através da técnica RealAmp

Primers	Sequência 5' → 3'
<i>F3</i>	GTATCAATCGAGTTTCTGACC
<i>B3c</i>	CTTGTCACCTCTCTTCT
<i>FIP (F1c-F2)</i>	TCGAACTCTAATTCCTGTTACCTATCAGCTTTGATGTTAGGGT
<i>BIP (B1-B2c)</i>	CGGAGAGGGAGCCTGAGAAATAGAATTGGGTAATTTACGCG
<i>LPF</i>	CGTCATAGCCATGTTAGGCC
<i>LPB</i>	AGCTACCACATCTAAGGAAGGCAG

7.5. *Nested* PCR

A *nested* PCR foi empregada na detecção da espécie de *Plasmodium* nas amostras positivas. Após realização dos ensaios de PCR em tempo real, os *pools* que resultaram positivos foram ensaiados com protocolo convencional de *nested* PCR (Snounou et al, 1993), que será chamado neste trabalho de Snounou nPCR, usando genes de *ssr* RNA como alvo. A primeira reação empregará *primers* gênero-específicos rPLU5 e rPLU6 que amplificam um fragmento de 1.2 Kb, e a segunda reação (*nested*), *primers* espécie-específicos para cada espécie (Tabela 6). A reação será preparada com 25 µL em cada tubo, sob as seguintes condições: 250 nM de cada *primer*, 125 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 0,4 U de *Taq* polimerase e 1 µL de DNA genômico. Condições da primeira reação da PCR: um ciclo de denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e então 24 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Na 2ª reação serão realizados 30 ciclos de amplificação, nas mesmas condições. Os fragmentos obtidos serão separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (0,089 M Trizma Base, 0,089 M Ácido Bórico, 0,02 M EDTA), e visualizados com GelRed (Biotium) através de luz UV com marcador de peso molecular de 100 bp. A técnica permite detectar baixas parasitemias como 1 parasito/µL, mas sua reprodutibilidade é garantida acima de 10 parasitos/µL (Snounou et al, 1993)

Tabela 6. Sequências dos *Primers* utilizados para amplificação por *nested* PCR, de fragmentos de genes da *ssrRNA* de *Plasmodium*. Os *primers* rPLU5 e rPLU6 são gênero-específicos e os *primers* rFAL1 e rFAL2, rVIV1 e rVIV2, rMAL1 e rMAL2, são espécie-específicos para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum* respectivamente

Primers	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)
Plasmodium		1200
Forward - rPLU6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG	
Reverse - rPLU5	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC	
P. falciparum		205
Forward - rFAL1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT	
Reverse - rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC	
P. vivax		120
Forward - rViv1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC	
Reverse - rVIV2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA	
P. malariae		144
Forward - rMAL1	ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC	
Reverse - rMAL2	AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA	

8. DETECÇÃO DE ANTICORPOS

Para detecção de anticorpos foi utilizado o teste imunocromatográfico SD Bioline Malaria Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.), que é um teste rápido para detecção qualitativa de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos contra *P. falciparum* e *P. vivax* com antígenos de captura recombinantes MSP e CSP para as duas espécies de parasitos humanos em sangue total, soro ou plasma. Para cálculo do número significativo de amostras para realização do teste foram considerados os parâmetros mostrados na Tabela 7:

Tabela 7. Cálculo do número de amostras para ensaio com teste SD Bioline Malaria Pf/Pv, para Amazônia Legal e Extra-amazônica

	Amazônia Legal	Extra-Amazônica
Total de amostras coletadas	1.076	12.307
Frequência esperada	5% – 7% (*)	0,2% - 0,4% (*)
Intervalo de confiança	95%	95%
Tamanho de amostra	320	1.659

(*) Dados obtidos em testes sorológicos com amostras de bancos de sangue de referência.

O teste foi realizado em 32 *pools* para amostras da Amazônia Legal e 166 *pools* da Extra-Amazônica. Foram depositados 10 µL de soro em membrana de nitrocelulose com

antígenos de captura recombinantes de *P. falciparum* (MSP) na banda teste em uma região, e com antígenos de captura recombinantes de *P. vivax* (MSP) na segunda banda teste em outra região da membrana. Foram adicionados 110 µL (quatro gotas) de diluente e aguardado o tempo mínimo de 15 minutos para visualização das bandas. Somente os testes cuja linha controle foi revelada, foram considerados válidos.

9. CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Foram utilizadas como controle positivo da qPCR, amostras de cultura de *P. falciparum* (gentilmente fornecidas pela Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz, Fiocruz, RJ) diluídas seriadamente em sangue humano total não infectado (razão 10), cuja sensibilidade analítica mostrou amplificação com 1 parasito/µL (LIMA et al, 2011). Essas amostras diluídas seriadamente com parasitemia variando de 350 a 0,035 p/µL foram utilizadas para determinar os limites de detecção dos vários testes moleculares. Como controle negativo foram utilizadas amostras de indivíduos testados por PCR, com resultado negativo e sem deslocamento para áreas com possibilidade de transmissão, além de água ultrapura. Em todos os ensaios do Snounou nPCR foram incluídos controles positivos (DNA genômico de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*) e negativos (água ultrapura). Para o teste SD Bioline Malaria Pf/Pv foram utilizados como controles positivos *pools* contendo amostras clínicas reagentes por outras técnicas sorológicas, como imunofluorescência indireta ou ELISA e amostras negativas. Como controle negativo foram utilizadas amostras de plasma em *pool*, de indivíduos sem deslocamento para áreas de transmissão e com sorologia negativa por outras técnicas.

10. DETERMINAÇÃO DO CUT-OFF NA PCR EM TEMPO REAL

O *cut-off* foi obtido através da curva *Receiver Operating Characteristic* - ROC (Greiner, 2000) a partir da análise dos C_t s dos resultados dos controles positivos, usamos 3,5 parasitos/µL, e negativos como H2O e *pools* de amostras negativas padrão (LIMA et al, 2011).

Trata-se de uma curva de plotagem da sensibilidade de uma prova (capacidade de se detectar corretamente a condição de interesse, ou seja, a infecção por *Plasmodium*, disposta no eixo das ordenadas) contra a sua proporção de resultados falso positivos (incapacidade de reconhecer indivíduos não infectados, no eixo das abscissas). Cada ponto no gráfico (gerado a partir de uma decisão de qual seria o limite de sensibilidade desejável para o teste) é unido por segmentos de linha, formando-se uma curva empírica, a curva ROC. Esta

curva pode ser então submetida a uma estimativa de máxima probabilidade (*maximum likelihood estimate*), produzindo uma suavização da mesma, a fim de se construir um modelo estatístico para o teste (curva ROC paramétrica). A próxima etapa na elaboração da curva ROC foi a confecção de um índice que resuma a acurácia do teste avaliado. Isto foi feito mediante a elaboração do cálculo da área sob a curva ROC, que varia de 0 (ausência total de acurácia) até 1,0 (acurácia completa, pois a sensibilidade será igual a 100%, com uma proporção de resultados falso positivos igual a zero), respeitando-se o limite inferior da área sob a curva, que não deve ser inferior a 0,5 (chance diagonal).

11. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

As amostras de DNA utilizadas como controles positivos pertencem ao Biorrepositório do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/IMTSP e foram obtidas de amostras de sangue de pacientes diagnosticados com malária, que concordaram com o armazenamento do material biológico, mediante consentimento informado do paciente, para a realização de pesquisas futuras (Anexo II). Fica garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originariamente envolvidos e a conservação e utilização eticamente corretas do material, bem como das informações obtidas a partir dele.

Todas as amostras de sangue coletadas obedeceram aos critérios estabelecidos pela resolução número 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, mediante termo de consentimento informado de cada participante (ANEXO I e II).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 205/12). Investigadores do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) obtiveram permissão institucional para usar amostras para o estudo atual sob uma determinação não-pesquisa (número 2013-390). Pesquisadores do CDC prestaram assessoria técnica e participaram sem nenhum contato direto com os participantes do estudo ou acesso a qualquer informação pessoal identificável. O certificado de autorização Nº 2012-10-085, datado de 19 de outubro de 2012 para transporte das amostras (importação/exportação), foi emitido pelo Conselho do CDC para permitir o movimento de alíquotas de DNA para o laboratório do CDC em Atlanta, GA, EUA.

12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando os seguintes softwares: Graph Pad Prism 5, Sigma Stat 3.5, Graph Pad Software (Quick Calcs) e Microsoft Office Excel 2013.

Para cálculos de sensibilidade, especificidade, intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%) e cut-off, empregou-se a curva ROC (Greiner et al., 2000, Martinez et al., 2003). A comparação entre proporções (positividade) foi realizada empregando o teste exato de Fisher, χ^2 ou χ^2 com correção de Yates, conforme indicado. O grau de concordância entre as técnicas (duas a duas) foi avaliado pelo índice Kappa de Cohen e respectivo IC 95%. Realizou-se comparação entre o resultado obtido pelas técnicas estudadas, verificando-se a existência de associação marginal, com o emprego do teste de McNemar (Kirkwood, Sterne, 2003).

Os níveis de significância dos testes empregados na análise estatística foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

1. MONTAGEM DOS POOLS

O número total de amostras de sangue colhidas dos doadores participantes foi 13.383, porém foram ensaiadas por metodologias moleculares 12.981 amostras distribuídas em 1.299 *pools* com 10 amostras cada. Isto porque, durante a montagem dos *pools* foi detectada a ausência de 402 amostras no local de armazenagem. Como as amostras foram utilizadas em estudo anterior, algumas tinham volume insuficiente para análise molecular ou não estavam mais disponíveis. A numeração original não foi alterada na análise sorológica. O número de doadores cujas as amostras não foram ensaiadas por testes moleculares e a procedência dessas amostras são apresentadas na Figura 10. A Região Amazônica inicialmente representada com 1.076 doadores teve perda de 23 amostras, sendo portanto analisadas 1.053 amostras (92 *pools*) pelos protocolos moleculares, enquanto a Região Extra-Amazonica inicialmente com 11.924 doadores, teve perda de 379 amostras totalizando 11.545 doadores para análise molecular (1.181 *pools*). Também foram obtidos 26 *pools* formados com doadores de Região Amazônica e Extra-Amazonica, totalizando então os 1.299 *pools* avaliados. Os doadores do Acre (n=5) e Maranhão (n=8) estavam presentes nos *pools* mistos.

Figura 10. Número de doadores não analisados pelos métodos moleculares e procedência das amostras.

2. ANÁLISE MOLECULAR

Foram utilizados cinco protocolos para amplificação de DNA genômico nos *pools* e nas amostras individuais. O fluxograma apresentado (Figura 11) descreve as amostras

utilizadas e os ensaios aplicados aos *pools* e às amostras individuais com seus respectivos resultados.

Figura 11. Fluxograma apresentando número de doadores analisados em *pools* e individualmente e as técnicas moleculares empregadas com os respectivos resultados.

3. DETERMINAÇÃO DO CUT-OFF PARA LIMA qPCR

Para a determinação do *cut-off* do teste molecular Lima qPCR, foi utilizado o C_t gerado no gráfico de amplificação dos controles positivos contendo 3,5 parasitos/ μ L, que apresentaram amplificação em todos os ensaios realizados e dos controles negativos H₂O e PNeg (*pool* de amostras negativas). Estes controles positivos foram obtidos através de cultivo de *P. falciparum* e diluição em série (razão 10) para obtenção de parasitemias de 350

a 0,035 parasitos/ μ L. Com o *cut-off* correspondente ao C_t 37,49, obteve-se sensibilidade e especificidade de 100,0% nos ensaios contendo 3,5 parasitos/ μ L (Figura 12).

Apesar de incluímos em todos os ensaios o controle contendo 1 parasito/ μ L, este não obteve amplificação reprodutível em todas as placas ensaiadas, optando-se se assim pelo controle contendo 3,5 parasitos/ μ L para o cálculo do *cut-off* (Figura 13). As amostras utilizadas como controles positivos foram ensaiadas pelas técnicas moleculares para confirmar o limite de detecção de cada uma (Tabela 8).

Figura 12. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) obtida a partir dos C_t s de controles positivos com 3,5 parasitos/ μ L ($n=17$) e negativos para malária ($n=30$) gerando um ponto de corte com $C_t=37,49$

Figura 13. Gráfico mostrando amplificação dos controles positivos de cultura de *Plasmodium falciparum* diluídos em série de 3.500 a 0,35 parasitos/ μ L. Amplificação por Lima qPCR (TaqMan).

Tabela 8. Comparação do limite de detecção entre as qPCR ensaiadas em duplicatas e nPCR utilizando controles positivos de cultura de *Plasmodium falciparum* diluídas seriadamente.

Controles positivos <i>P.falciparum</i>	PET-PCR <i>cut-off</i> = $C_t \leq 40$						Lima qPCR <i>cut-off</i> = $C_t \leq 37,49$			Snounou nPCR
	PET-PCR gênero			PET-PCR <i>Pf</i>			Lima qPCR gênero			
	Ct1	Ct2	Média	Ct1	Ct2	Média	Ct1	Ct2	Média	
350p/μL	30,37	29,99	30,18	30,31	29,47	29,89	25,93	26,37	26,15	Pos
35p/μL	32,99	32,53	32,76	33,62	32,64	33,13	29,31	29,26	29,29	Pos
3,5p/μL	37,33	35,86	36,60	36,98	35,81	36,40	33,66	32,93	33,30	Pos
0,35p/μL	39,85	41,26	40,56	39,90	41,46	40,68	35,63	35,48	35,56	Pos
0,035p/μL	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	45,00	40,00	36,85	38,43	Neg
1p/μL	39,04	41,17	40,11	39,27	40,36	39,82	34,87	35,09	34,98	Pos

Pf= *P.falciparum*; Pos= Positivo; Neg= Negativo; C_t = Cycle threshold; nPCR= Snounou nested PCR.

Em diferentes ocasiões foram realizados protocolos de Lima qPCR (TaqMan) e Snounou nPCR para avaliação de detecção de baixas parasitemias, em amostras de *P. falciparum* de cultura diluídos seriadamente. Em um experimento, Snounou nPCR que é uma técnica bem padronizada e amplamente utilizada na detecção de *Plasmodium*, conseguiu amplificar controles contendo até 0,35 parasitos/μL (Figura 14A); em outro, com controles contendo diluições de 100 até 0,01 parasito/μL, a nPCR mostrou amplificação somente até a diluição de 10 parasitos/μL (Figura 14B). Entretanto, quando estas amostras foram ensaiadas por Lima qPCR TaqMan, houve amplificação até 0,35 parasitos/μL (Figura 14C) e 0,01 parasito/μL (Figura 14D), respectivamente para as duas séries de diluições.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1,5% com amostras de cultura de *P. falciparum* diluídas seriadamente, cujo fragmento amplificado é de 205 bp. **A.** Amostras de *P.f.* diluição de 350 – 0,35 parasitos/ μ L. **B.** Amostras de *P.f.* diluição de 100 – 0,01 parasitos/ μ L. Marcador de peso molecular de 100 bp (M), controle negativo (C-), cepa de referência para *P.f.* (3D7). **C.** Amostras de *P.f.* diluição 3.500 – 0,35 parasitos/ μ L. **D.** Amostras de *P.f.* diluição de 10.000 – 0,01 parasitos/ μ L.

4. CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DA REAÇÃO DE qPCR

- qPCR positivo: quando houve amplificação nas duas alíquotas ensaiadas e a média das duplicatas foi $C_t \leq 37,49$ para Lima qPCR ou a média das duplicatas foi $C_t \leq 40$ para PET-PCR;
- qPCR indeterminado: quando houve amplificação com $C_t \leq 37,49$ em apenas uma alíquota e a média das duplicatas não alcançou $C_t 37,49$ para Lima qPCR ou $C_t \leq 40$ para PET-PCR;

O resultado indeterminado foi adotado visto que nos controles com baixas parasitemias (≤ 1 parasito/ μ L) a ocorrência de amplificação em uma só alíquota também foi observada.

5. LIMA qPCR (TaqMan®)

5.1. Análise dos *pools*

Para avaliar o desempenho da técnica Lima qPCR na detecção de *Plasmodium* em amostras de sangue processadas em *pool*, ensaiamos 1.299 *pools*. A técnica mostrou amplificação para *Plasmodium* em 43 *pools* (Tabela 9), o que significa uma positividade de 3,31% com CI 95% de 2,47-4,43 dos *pools* ensaiados. Foram consideradas como positivas as amostras cuja média das duplicatas apresentasse $C_t \leq 37,49$. Todas as amostras com amplificação acima do C_t 37,49 foram consideradas negativas. Os Estados da Região Amazônica que apresentaram amplificação para *Plasmodium* nos *pools* foram: Amazonas 4 *pools*, Pará 1 *pool*. Na Região Extra-Amazônica foram: Goiás 9 *pools*, Mato Grosso do Sul 2 *pools*, Minas Gerais 2 *pools*, Paraná 11 *pools*, Rio de Janeiro 1 *pool*, Rio Grande do Sul 1 *pool*, Santa Catarina 2 *pools*, São Paulo 9 *pools*. Um *pool* continha doadores do Paraná e Mato Grosso do Sul e também resultou positivo representando 2,5% dos *pools* positivos. A Região Amazônica apresentou 4,72% (2,03-10,57) do total de *pools* enquanto a Região Extra-Amazônica 3,19% (2,33-4,35) dos *pools* positivos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($\alpha < 0,05$) (Tabela 9 e Figura 15).

Tabela 9. Apresentação dos *pools* que exibiram algum resultado positivo nos diferentes protocolos moleculares empregados (Lima qPCR, PET-PCR, RealAmp e nPCR). Apresentação das médias *C_t*s (*Cycle threshold*) nos ensaios de Lima qPCR e PET-PCR

Nº do <i>Pool</i>	qPCR - <i>Plasmodium</i>				qPCR - <i>Pf</i>	Snounou nPCR <i>Pf - Pv - Pm</i>
	Lima qPCR (TaqMan®)	Lima qPCR (EvaGreen®)	PET-PCR	RealAmp	PET-PCR <i>Pf</i>	
	Média <i>C_t</i> ≤ 37,49	Média <i>C_t</i> ≤ 37,49	Média <i>C_t</i> ≤ 40		Média <i>C_t</i> ≤ 40	
35	38,68	36,49	NR	NR	NR	NEG
50	39,13	NR	NR	NR	NR	<i>Pv</i>
88	37,45	NR	NR	NR	NR	NR
155	36,02	38,50	45,00	POS	45,00	<i>Pv</i>
159	39,10	NR	NR	NR	NR	<i>Pv</i>
186	36,78	NR	NR	NR	NR	NEG
199	37,01	32,88	43,72	NEG	45,00	<i>Pm</i>
283	35,99	36,86	45,00	NEG	45,00	NEG
306	37,49	NR	NR	NR	NR	NR
326	37,34	NR	NR	NR	NR	NR
390	39,55	NR	45,00	POS	45,00	NR
391	39,10	NR	45,00	POS	45,00	NEG
644	29,82	34,84	45,00	POS	45,00	NEG
683	37,49	NR	NR	NR	NR	NR
684	35,94	33,23	45,00	POS	45,00	<i>Pv</i>
685	37,22	40,41	45,00	NEG	45,00	NEG
686	36,75	38,97	45,00	NEG	45,00	NEG
688	37,47	NR	NR	NR	NR	NR
694	37,42	NR	NR	NR	NR	NR
698	36,69	36,47	45,00	NR	45,00	NEG
701	37,40	NR	45,00	NR	45,00	NR
705	37,10	34,81	45,00	POS	45,00	NEG
715	38,67	NR	45,00	POS	45,00	NEG
727	37,43	NR	45,00	NR	45,00	NR
719	37,34	NR	45,00	NR	45,00	NR
727	37,43	NR	45,00	NR	45,00	NR
728	38,96	NR	45,00	POS	45,00	NEG
729	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NR
730	36,67	33,84	45,00	POS	45,00	NEG
742	37,27	40,49	45,00	POS	45,00	NEG
750	37,45	NR	NR	POS	NR	NR
751	37,05	41,00	45,00	POS	45,00	NEG
753	35,99	37,20	45,00	NEG	45,00	NEG
755	36,88	NR	NR	NR	NR	NEG
756	37,03	39,50	45,00	POS	45,00	NEG
757	37,39	NR	NR	NR	NR	NR
771	37,17	35,24	45,00	NEG	45,00	NEG
775	38,98	NR	45,00	POS	45,00	NEG
782	37,05	NR	45,00	NEG	45,00	NEG
783	37,40	36,46	NR	POS	NR	NR
792	36,84	35,03	45,00	POS	45,00	NEG
807	39,14	NR	45,00	POS	45,00	NEG
920	37,46	NR	45,00	NR	45,00	NR
941	36,12	NR	NR	NR	NR	NEG
943	36,34	NR	45,00	NR	45,00	<i>Pf</i>
984	37,01	NR	NR	NR	NR	NEG
1037	41,00	NR	39,14	NR	45,00	NR
1141	37,43	NR	45,00	POS	45,00	NEG
1196	34,66	NR	45,00	POS	45,00	<i>Pf</i>
1200	37,48	NR	45,00	NR	45,00	NR
1241	35,63	NR	43,89	POS	44,49	NEG
1253	33,55	NR	45,00	POS	45,00	NEG
1255	37,49	NR	45,00	NR	45,00	NR
1264	37,31	NR	45,00	NR	45,00	NR

Pf: *P. falciparum*; *Pv*: *P. vivax*; *Pm*: *P. malariae*; POS: Positivo; NEG: Negativo; NR: Não Realizado.

Figura 15. *Pools* positivos de amostras de doadores de bancos de sangue brasileiros que apresentaram amplificação para *Plasmodium* nos ensaios Lima qPCR (TaqMan®) com média das duplicatas $\leq$ ao C_t 37,49.

Tabela 10. Resultados Lima qPCR (TaqMan®) positivos (média $C_t \leq 37,49$) e indeterminados (uma alíquota $C_t \leq 37,49$) para amplificação de *Plasmodium* em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

Resultado	Região	<i>Pools</i> Positivos	Total de <i>pools</i>	%	IC (95%)	Chi-quadrado*	Significância estatística ($\alpha < 0,05$)
qPCR Positivo	Amazônica	5	106	4,72	2,03-10,57	0,5756	Não
	Extra-Amazônica	38	1.192	3,19	2,33-4,35		
	TOTAL	43	1.298				
qPCR indeterminado	Amazônica	4	106	3,77	1,48-9,30	0,1645	Não
	Extra-Amazônica	50	1.192	4,19	3,20-5,49		
	TOTAL	54	1.298				

*Chi-quadrado com correção de Yates.

Observou-se neste estudo, que 4,16% (3,20-5,38), 54 dos 1.299 *pools* ensaiados por Lima qPCR Taqman® apresentaram amplificação até C_t 37,49 em apenas uma alíquota (Tabela 10), porém a média das duplicatas ficou acima do *cut-off*. Como pode ser observado na Tabela 9 os *pools* 35, 50, 159, 391, 715, 728, 729, 775 e 807 foram considerados negativos pela média no protocolo Lima qPCR Taqman®, porém como esses *pools* apresentaram amplificação em uma alíquota até C_t 37,49, foram denominados indeterminados (Tabela 11). Estes *pools* apresentaram positividade por outras técnicas. A Região Amazônica foi representada com 4 *pools* do Tocantins (3,77%) e a Região Extra-Amazônica (4,19%) com: 1 *pool* da Bahia, 1 do Espírito Santo, 3 de Goiás, 1 Minas Gerais, 2

Mato Grosso do Sul, 18 do Paraná, 1 do Rio de Janeiro, 2 do Rio Grande do Sul, 1 de Santa Catarina, 15 de São Paulo e 5 *pools* mistos de Região Extra-Amazônica (Figura 16). A comparação entre a Região Amazônica e a Região Extra-Amazônica não foi estatisticamente significativa ($\alpha=0,05$).

Tabela 11. Apresentação dos *pools* considerados indeterminados por exibirem amplificação em apenas uma alíquota da duplicata C_t (Cycle threshold) $\leq 37,49$.

Nº do <i>Pool</i>	qPCR - <i>Plasmodium</i>		Nº do <i>Pool</i>	qPCR - <i>Plasmodium</i>		Nº do <i>Pool</i>	qPCR - <i>Plasmodium</i>	
	Lima qPCR (TaqMan®)			Lima qPCR (TaqMan®)			Lima qPCR (TaqMan®)	
	alíquota	$C_t \leq 37,49$		alíquota	$C_t \leq 37,49$		alíquota	$C_t \leq 37,49$
15	37,18		424	37,47		775	36,95	
33	37,25		580	37,29		776	37,12	
35	36,36		687	37,27		779	37,17	
37	37,16		689	37,11		784	37,23	
50	37,26		695	37,32		787	37,03	
131	37,46		710	37,05		789	37,45	
141	37,12		715	36,34		791	37,25	
148	37,45		718	37,26		793	36,72	
159	37,20		722	37,04		795	37,00	
238	37,34		723	36,65		807	37,28	
247	36,94		728	36,91		809	37,43	
260	37,49		734	37,35		817	37,01	
287	37,11		738	36,68		900	37,42	
336	37,37		761	36,93		908	37,13	
351	37,47		763	37,37		909	37,41	
372	37,24		766	37,12		916	36,41	
391	37,19		768	37,04		927	36,79	
404	37,16		773	37,31		929	37,47	

qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction*

Figura 16. *Pools* de amostras de doadores de bancos de sangue brasileiros considerados indeterminados por apresentarem amplificação para *Plasmodium* com $C_t \leq 37,49$ em apenas uma alíquota pelo teste Lima qPCR (TaqMan®).

5.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS *POOLS* POSITIVOS

Os *pools* que resultaram em amplificação para *Plasmodium* foram abertos e suas respectivas amostras foram ensaiadas individualmente. Um total de 360 amostras individuais foram testadas por Lima qPCR (TaqMan®). Destas, 25 apresentaram amplificação para *Plasmodium* (Tabela 12). Um doador do estado do Amazonas resultou positivo. Na Região Extra-Amazônica, 5 doadores foram positivos em Goiás, 1 em Minas Gerais, 1 em Mato Grosso do Sul, 12 no Paraná, 2 em Santa Catarina e 3 em São Paulo (Figura 17). As duas regiões representam uma positividade de 6,94% (4,75-10,05) nas 360 amostras individuais ensaiadas, a Região Amazônica com 2,50% (0,44-12,88) e a Região Extra-Amazônica 7,50% (5,09-10,92). A comparação entre a Região Amazônica e a Região Extra-Amazônica não foi estatisticamente significativa ($\alpha=0,05$) (Tabela 13). Sete *pools* positivos não puderam ser analisados devido à problemas na conservação das amostras individuais.

Tabela 12. Apresentação das amostras individuais dos *pools* positivos que exibiram algum resultado positivo nos diferentes protocolos moleculares empregados (Lima qPCR, PET-PCR, RealAmp e nPCR). Apresentação das médias *C_t*s (*Cycle threshold*) nos ensaios de Lima qPCR e PET-PCR

Pool Referente	Nº do Doador Positivo	qPCR - <i>Plasmodium</i>		Snounou nPCR <i>Pf</i> - <i>Pv</i> - <i>Pm</i>
		Lima qPCR (TaqMan®)	PET-PCR	
		Média <i>C_t</i> ≤ 37,49	Média <i>C_t</i> ≤ 40	
141	1401	36,73	42,91	NEG
	1408	37,10	45,00	NEG
199	1985	37,16	45,00	NEG
	1988	32,03	37,08	<i>Pm</i>
391	3906	37,21	45,00	NEG
684	7265	36,53	45,00	NEG
	7268	37,08	45,00	NEG
	7272	37,24	45,00	NEG
685	7277	37,29	45,00	NEG
	7279	37,38	45,00	NEG
	7281	37,05	45,00	NEG
686	7284	37,49	45,00	NEG
	7287	36,60	45,00	NEG
	7291	37,26	45,00	NEG
728	7026	37,39	45,00	NEG
730	7046	37,25	45,00	NEG
751	7531	36,65	45,00	NEG
	7533	36,69	45,00	NEG
	7538	37,41	45,00	NEG
753	7555	36,84	45,00	NEG
756	7589	36,95	45,00	NEG
775	7777	37,42	45,00	NEG
941	9437	41,00	45,00	<i>Pv</i>
943	9459	37,28	45,00	NEG
1196	12288	37,10	45,00	NEG
1253	12863	36,30	45,00	NEG

qPCR: *quantitative Polymerase Chain Reaction*; PET-PCR: *Photo-Induced Electron Transfer*; nPCR: *nested PCR*; *Pf*: *Plasmodium falciparum*; *Pv*: *P. vivax*; *Pm*: *P. malariae*.

Figura 17. Amostras individuais de *pools* positivos de sangue de doadores consideradas positivas, com amplificação para *Plasmodium* pelo teste Lima qPCR (TaqMan®), com média das duplicatas $\leq$ ao C_t 37,49. Distribuição por estados brasileiros.

Tabela 13. Resultados Lima qPCR (TaqMan®) positivos (média $C_t \leq 37,49$) e indeterminados (uma alíquota $C_t \leq 37,49$) para amplificação de *Plasmodium* em amostras individuais dos *pools* positivos de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

Resultado	Região	Doadores Positivos	Total de Amostras ensaiadas	Total de <i>pools</i>	%	IC (95%)	Chi-quadrado*	Significância estatística ($\alpha < 0,05$)
qPCR Positivo	Amazônica	1	40	4	2,50	0,44-12,88	0,3992	Não
	Extra-Amazônica	24	320	32	7,50	5,09-10,92		
	TOTAL	25	360	36				
qPCR indeterminado	Amazônica	12	40	4	30,00	18,07-45,43	0,005	Sim
	Extra-Amazônica	39	320	32	12,19	9,04-16,23		
	TOTAL	51	360	36				

*Chi-quadrado com correção de Yates.

Foi observado que 14,17% (10,94-18,15), 51 das 360 amostras individuais dos *pools* positivos, apresentaram amplificação até C_t 37,49 em apenas uma alíquota, sendo consideradas indeterminadas (Tabela 14). Dos 40 doadores de região Amazônica que tiveram amostras ensaiadas, 30,00% foram denominados indeterminados sendo: 8 doadores do Amazonas, 3 do Pará e 1 do Tocantins; a Região Extra-Amazônica com 320 doadores analisados, apresentaram resultados indeterminados em 39 doadores: 8 doadores de Goiás, 2 de Minas Gerais, 1 do Mato Grosso do Sul, 14 do Paraná, 1 do Rio Grande do Sul, 2 de Santa Catarina e 11 de São Paulo (Figura 18), com 12,19% (9,04-16,23). As duas regiões apresentaram diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0,05$) (Tabela 13).

Tabela 14. Apresentação das amostras individuais consideradas indeterminadas por exibirem amplificação em apenas uma alíquota da duplicata C_t (*Cycle threshold*) $\leq 37,49$.

<i>Pool</i> Referente	Nº do Doador	Lima qPCR (TaqMan®) <i>Plasmodium</i> $C_t \leq 37,49$	<i>Pool</i> Referente	Nº do Doador	Lima qPCR (TaqMan®) <i>Plasmodium</i> $C_t \leq 37,49$
141	1406	36,96	742	7170	36,09
155	1545	37,32	742	7169	36,41
	1852	36,67		7166	37,24
186	1851	36,67	753	7557	36,43
	1858	37,24		7558	37,36
199	1987	37,05	755	7570	36,10
	1981	37,20	756	7587	37,06
	3913	35,63		7581	37,19
	3907	36,86	771	7743	37,15
391	3911	36,99	807	8097	37,29
	3905	37,19	943	9456	36,90
	3908	37,37		9864	36,85
644	6460	37,07	984	9866	37,17
	6463	37,23		9872	37,41
	7271	36,86	1141	11745	36,79
684	7270	37,34	1196	12290	36,78
	7264	37,45		12296	37,49
	7276	35,43		12740	36,44
685	7282	36,16		12743	36,66
	7280	36,83	1241	12739	36,79
	7278	37,31		12744	36,81
686	7283	37,10		12745	37,38
	7288	37,41		12864	35,97
705	6792	35,66	1253	12865	36,81
	6795	36,84		12857	36,89
728	7029	36,75

Figura 18. Amostras individuais de *pools* positivos de sangue de doadores consideradas indeterminadas nos ensaios individuais por apresentar amplificação para *Plasmodium* com $C_t \leq 37,49$ em apenas uma alíquota pelo teste Lima qPCR (TaqMan®). Distribuição por estados brasileiros.

6. Lima qPCR (EvaGreen®)

O protocolo de Lima qPCR com a substituição de Sonda TaqMan® por corante intercalante de DNA Evagreen® foi aplicado somente em alguns *pools* positivos (n= 19) por falta de material genômico das amostras que foram testadas por outras técnicas, além de várias repetições dos ensaios. Destes, 12 apresentaram amplificação para *Plasmodium* (Tabela 9), sendo 2 *pools* de Goiás, 5 do Paraná, 1 do Rio de Janeiro, 1 de Santa Catarina e 3 de São Paulo. Em comparação com o protocolo Lima qPCR (TaqMan®), a positividade utilizando sonda TaqMan® foi de 89,47% (68,61-97,06) nos 19 *pools* analisados pelas duas técnicas e com Evagreen® 63,16% (41,04-80,85), não foi observada diferença estatisticamente significativa (p=0,131, teste McNemar), com pobre concordância entre as técnicas (Tabela 15).

Tabela 15. Concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas Lima qPCR TaqMan® e EvaGreen® em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE		Lima qPCR		TOTAL		P McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
		Positivo	Negativo	n	%				
		n	n	n	%				
Lima qPCR EvaGreen	Positivo	11	1	12	63,16	0,131	0,07	-0,285 a 0,424	pobre
	Negativo	6	1	7	36,84				
	TOTAL	17	2	19	100				

As amostras individuais dos *pools* positivos não foram realizadas devido à escassez de material genômico.

7. PET-PCR

7.1. ANÁLISE DOS POOLS

A reação de PET-PCR foi realizada em *duplex* para amplificação de *Plasmodium* (PET-gen) e *P. falciparum* (PET-Pf) em 1212 *pools*. A técnica considera positiva a amostra que apresentar amplificação até o C_t 40, sendo o limite de detecção até 3.2 parasitos/ μ L (LUCCHI et al, 2013). Foi observada amplificação para *Plasmodium* somente em 1 *pool* (Tabela 9) sendo este de Sergipe. Em comparação com o protocolo Lima qPCR (TaqMan®) a positividade foi de 2,48% (1,74-3,51) nos 1.211 *pools* analisados pelas duas técnicas e com PET-PCR 0,08% (0,01-0,47), observou-se diferença estatisticamente significativa (p=< 0,001, teste McNemar), mostrando péssima concordância entre as técnicas (Tabela 16).

Tabela 16. Concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas Lima qPCR TaqMan® e PET-PCR em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE		Lima qPCR TaqMan		TOTAL		P McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
		Positivo	Negativo						
		n	n	n	%				
PET-PCR	Positivo	0	1	1	0,08	<0,001	0,002	-0,005 a 0,001	péssima
	Negativo	30	1.180	1.210	99,92				
	TOTAL	30	1181	1.211	100				

7.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS *POOLS* POSITIVOS

Foram analisadas individualmente 363 amostras correspondentes aos *pools* positivos por Lima qPCR. Destes, apenas um doador apresentou amplificação para *Plasmodium*, o doador 1.988 de Santa Catarina (Tabela 12). A concordância entre Lima qPCR e PET-PCR resultou pobre (Tabela 17).

Tabela 17. Concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas Lima qPCR TaqMan® e PET-PCR nas amostras individuais de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE		Lima qPCR TaqMan		TOTAL		P McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
		Positivo	Negativo						
		n	n	n	%				
PET-PCR	Positivo	1	0	1	0,28	<0,001	0,086	-0,072 a 0,244	pobre
	Negativo	20	339	359	99,72				
	TOTAL	21	339	360	100				

8. RealAmp PCR

8.1 ANÁLISE DOS *POOLS*

Por esta técnica, que considera como positivas amostras com qualquer amplificação de DNA no período de 60 minutos, foram ensaiados 38 *pools*, sendo que 11 destes foram negativos pelas outras técnicas de PCR. Estes 11 *pools* foram selecionados mediante sorteio para análise deste protocolo. RealAmp apresentou amplificação em 22 *pools* (Tabela 9), incluindo todos os 11 *pools* negativos pelas outras técnicas (Tabela 18).

Tabela 18. Resultado de 11 *pools* negativos pelo Lima qPCR selecionados mediante sorteio para comparação com outros protocolos de PCR (PET-PCR, RealAmp e nPCR). Apresentação das médias C_t nos ensaios de Lima qPCR e PET-PCR

Nº do <i>Pool</i>	qPCR - <i>Plasmodium</i>			RealAmp	qPCR - <i>Pf</i>	Snounou nPCR
	Lima qPCR (TaqMan®)	Lima qPCR (EvaGreen®)	PET-PCR		PET-PCR <i>Pf</i>	
	Média $C_t \leq 37,49$	Média $C_t \leq 37,49$	Média $C_t \leq 40$		Média $C_t \leq 40$	<i>Pf</i> - <i>Pv</i> - <i>Pm</i>
190	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
209	40,05	NR	45,00	POS	45,00	NEG
393	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
414	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
596	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
615	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
818	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
838	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
1050	41,00	NR	45,00	POS	44,96	NEG
1072	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG
1289	41,00	NR	45,00	POS	45,00	NEG

Pf: *P. falciparum*; *Pv*: *P. vivax*; *Pm*: *P. malariae*; POS: Positivo; NEG: Negativo; NR: Não Realizado.

A positividade do Lima qPCR (TaqMan®) foi 52,63% (37,26-67,52) e do RealAmp de 81,58% (66,58-90,78) nos 38 *pools*. A comparação entre as técnicas mostrou péssima concordância (Tabela 19).

Tabela 19. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e RealAmp PCR em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE	Lima qPCR		TOTAL		P McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
	Positivo	Negativo	n	%				
	n	n	n	%				
RealAmp PCR	Positivo	13	18	31	81,58	0,046	-0,361 a -0,141	péssima
	Negativo	7	0	7	18,42			
	TOTAL	20	18	38	100			

8.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS POOLS POSITIVOS

Como este teste apresentou resultados discrepantes com as outras técnicas nos *pools* testados, foi realizada análise individual em uma amostragem (n=16) que resultaram negativas para as outras técnicas moleculares. Destas, 15 apresentaram amplificação para *Plasmodium*.

9. SNOUNOU nPCR

9.1 ANÁLISE DOS POOLS

A técnica de Snounou nPCR foi aplicada aos *pools* que apresentaram amplificação para *Plasmodium* pela técnica Lima qPCR, com intuito de detectar a espécie. Foram ensaiados 49 *pools* sendo 39 *pools* positivos pelo Lima qPCR (Tabela 9) e 11 *pools* negativos obtidos através de sorteio para avaliar positividade e especificidade (Tabela 18). Dentre os 39 *pools* positivos, Snounou nPCR conseguiu identificar a espécie de *Plasmodium* em 7 *pools* (Tabela 9; Figura 19), sendo 1 *Pm* (Santa Catarina), 2 *Pf* (1 de Mato Grosso do Sul e 1 de Minas Gerais), 4 *Pv* (1 de São Paulo, 1 do Rio Grande do Sul, 1 do Paraná e 1 São Paulo e Paraná). A positividade do Lima qPCR TaqMan foi de 51,02% (37,47-64,42) dentre os 49 *pools* e de 14,29% (7,10-26,67) para Snounou nPCR, com pobre concordância entre as duas técnicas (Tabela 20).

Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, para detecção de espécies de *Plasmodium* de *pools* positivos pelo Lima qPCR. *Pool* positivo para *P. malariae* (199) à esquerda. *Pool* positivo para *P. falciparum* (1196) à direita. Marcador de peso molecular de 100 bp (M), controle negativo (H2O), controles positivos (*Pf*, *Pv*, *Pm* e *Po*)

Tabela 20. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e Snounou nPCR em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE		Lima qPCR		TOTAL		P McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
		Positivo	Negativo						
		n	n	n	%				
Snounou nPCR	Positivo	5	2	7	14,29	<0,001	0,115	-0.076 a 0.306	pobre
	Negativo	20	22	42	85,71				
	TOTAL	25	24	49	100				

9.2. ANÁLISE INDIVIDUAL DOS POOLS POSITIVOS

Snounou nPCR foi aplicado em 352 amostras individuais dos *pools* positivos para Lima qPCR TaqMan. Dentre eles, a técnica conseguiu identificar a espécie em dois doadores, um de Santa Catarina diagnosticado com *P. malariae* e um doador do Mato Grosso do Sul portando *P. vivax* (Tabela 12). A positividade do Lima qPCR TaqMan foi de 6,82% (4,62-9,94)

em 352 amostras individuais e 0,57% (0,16-2,05) pelo Snounou nPCR, com pobre concordância entre as técnicas (Tabela 21).

Tabela 21. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e Snounou nPCR nas amostras individuais de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE		Lima qPCR TaqMan		TOTAL		p McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
		Positivo	Negativo						
		n	n	n	%				
Snounou nPCR	Positivo	1	1	2	0,57	<0,001	0,067	-0,068 a 0,203	pobre
	Negativo	23	327	350	99,43				
	TOTAL	24	328	352	100				

9. DETECÇÃO DE ANTICORPOS

O teste rápido imunocromatográfico para detecção de anticorpos SD Bioline Malaria Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.) foi aplicado em 32 *pools* montados com soro de doadores de área endêmica e 266 *pools* com soros de doadores de área não endêmica, obtidos a partir de sorteio (Tabela 7), além dos 37 *pools* que resultaram positivos pelo Lima qPCR TaqMan. Os *pools* de amostras e testes realizados estão esquematizados no fluxograma (Figura 20). Os *pools* positivos apresentaram banda fraca, em relação à banda controle do teste (Figura 21). Na área endêmica 3 *pools*, sendo 1 de Rondônia e 2 de Tocantins (Figura 22) apresentaram banda para *P. vivax* representando 9,38% de positividade para anticorpos anti-*Plasmodium vivax*. Na área não endêmica, 13 *pools* (2 de Goiás, 1 Alagoas, 1 Piauí, 1 Paraná, 1 Bahia, 3 Santa Catarina e 4 São Paulo) apresentaram banda para *P. vivax*, o que representa 7,83% de positividade para anticorpos anti-*Plasmodium vivax* (Tabela 22). Dos 37 *pools* positivos para Lima qPCR, apenas o *pool* 199 foi positivo (*P. vivax*). Não houve banda para *P. falciparum* em nenhum *pool* de área endêmica ou não endêmica dentre os testados. A positividade do Lima qPCR Taqman foi de 70,27% (54,22-82,51) nos 37 *pools* testados e 2,70% (0,48-13,82) no SD Bioline Malaria Pf/Pv, com pobre concordância entre os testes (Tabela 23).

O teste SD Bioline Malaria Pf/Pv (Standard Diagnostics, Inc.) não pode ser aplicado nas amostras individuais dos *pools* positivos devido a descontinuação da comercialização deste no Brasil.

Figura 20. Fluxograma apresentando número de amostras de soro individuais e dos *pools*, de Área Endêmica e Área Não Endêmica, além dos *pools* que resultaram positivos pelo método molecular Lima qPCR em que foram aplicados o teste imunocromatográfico SD Bioline, com seus resultados respectivos

Figura 21. Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos contra antígenos recombinantes CSP e MSP de *P.vivax* e *P.falciparum*, mostrando sinal positivo fraco para *P.vivax* (seta Azul) e sinal forte para o controle (seta preta), de *pool* de Área Não Endêmica

Figura 22. Estados que apresentaram banda positiva para *P. vivax* nos *pools* de soro de doadores de Área Endêmica e Área Não Endêmica para malária no teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv

Tabela 22. Positividade de *P. vivax* em teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv com detecção de anticorpos através de antígenos recombinantes MSP e CSP de Pv e Pf em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

Região	Pools Positivos	Total de Amostras	Total de pools	%	IC (95%)	Chi-quadrado*	Significância estatística ($\alpha < 0,05$)
Amazônica	3	320	32	9,38	3,24-24,22	0,9515	Não
Extra-Amazônica	13	1.659	166	7,83	4,63-12,94		
TOTAL	16	1.979	198				

*Chi-quadrado com correção de Yates.

Tabela 23. Concordância entre os resultados obtidos das técnicas Lima qPCR TaqMan® e SD Bioline Pf/Pv em *pools* de doadores de Região Amazônica e Extra-Amazônica.

TESTE	Lima qPCR TaqMan		TOTAL		P McNemar	Kappa	IC (95%)	Força da concordância
	Positivo	Negativo	n	%				
	n	n	n	%				
SD Bioline	Positivo	1	0	1	2,70	<0,001	0,023	-0,023 a 0,070
	Negativo	25	11	36	97,30			
	TOTAL	26	11	37	100			

10. COMPARAÇÃO ENTRE CUSTOS E APLICABILIDADE DAS TÉCNICAS

Neste estudo, foram analisadas várias técnicas com custos, processamentos e formas variadas de detecção (DNA gênero-específico, espécies-específico e de anticorpos). A comparação entre custos, tempo de processamento e etapas necessárias para cada técnica avaliada neste estudo encontra-se na tabela 24.

Tabela 24. Comparação entre custos, limite de detecção, tempo e processamento das técnicas moleculares e a sorológica utilizadas neste estudo.

Técnica	Preço/Amostra	Limite Detecção	Quantitativo	Tempo de Processamento	Espécies	Etapas de Processamento
Lima qPCR TaqMan	~ R\$ 10,81	3,5 - 0,35 p/μL	Sim	~2 horas	<i>Plasmodium</i>	1
Lima qPCR Evagreen	~ R\$ 3,00	3,5 p/μL	Sim	~2 horas	<i>Plasmodium</i>	1
PET-PCR	~ R\$ 10,81	3,5 p/μL	Sim	~3 horas	<i>Plasmodium</i>	1
RealAmp	~ R\$ 11,00	3,5 p/μL	Não	~1 hora	<i>Plasmodium</i>	1
Snounou nPCR	~ R\$ 35,00	10 - 1 p/μL	Não	~8 horas	<i>P.f.</i> , <i>P.v.</i> , <i>P.m.</i> , <i>P.o.</i>	2 + eletroforese
SD Bioline Pf/Pv	~ R\$ 16,00	NA	Não	10 - 20 minutos	Anticorpos contra <i>P.f.</i> e <i>P.v.</i>	1

NA= não se aplica.

DISCUSSÃO

A segurança transfusional é uma questão de saúde pública, mas as estratégias para minimizar os riscos relacionados a malária são desafiadores, tanto pelo desconhecimento da epidemiologia da infecção, quanto pela dificuldade de se identificar o doador assintomático e validar um teste capaz de detectar baixas parasitemias. A Portaria Nº 2.712 de 12 de novembro de 2013 (Brasil, 2013), que aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos, recomenda que a triagem de doadores no que concerne à malária utilize testes para detecção de *Plasmodium* ou antígenos plasmodiais, porém sem a indicação de um teste validado. Estes testes devem ser aplicados em doadores residentes em ou procedentes de área endêmica. No entanto, regiões consideradas não endêmicas, como a costa brasileira coberta por Mata Atlântica, bem como as infecções assintomáticas com parasitemias submicroscópicas, aumentam o risco de malária TTS. Este cenário potencializa os desafios propostos pela OMS, que embora reconhecendo que não existe transfusão sanguínea totalmente isenta de riscos, orienta que avanços devem ser buscados para se obter segurança dos produtos sanguíneos a serem utilizados em transfusões, pautados por rigorosos parâmetros de qualidade (WHO, 2010).

Este é o primeiro estudo de abrangência nacional que avalia doadores de áreas endêmicas e não endêmicas para malária, com uma amostragem de 13.383 doadores para análise de marcadores específicos para malária e pesquisa de prevalência de infecção por *Plasmodium* em doadores aceitos para doação. A oportunidade de apresentar indicadores de prevalência para malária em doadores de sangue pode auxiliar as agências reguladoras de hemoterapia.

As características de doadores de sangue infectados por *Plasmodium* são ausência de sintomas e baixas parasitemias (Ashley & White, 2014). Sendo assim, técnicas com alta sensibilidade e especificidade são necessárias para detecção desses casos. A técnica de microscopia considerada o padrão ouro não é indicada, pois além de exigir processamento demorado e não ser aplicável em grande número de amostras, como é o caso dos bancos de sangue, sua sensibilidade é inferior aos testes moleculares e o diagnóstico é subjetivo à experiência do observador. Esta técnica não foi aplicada neste estudo por se tratar de análise retrospectivo com amostras preservadas congeladas, impossibilitando a análise microscópica. Por esta razão os resultados apresentados mostram a positividade de cada técnica e a comparação entre elas, não se referindo a percentuais de sensibilidade. Os protocolos moleculares Lima qPCR TaqMan, e Snounou nPCR foram validados em estudo anterior e alcançaram boa sensibilidade 91,84% e 93,88% respectivamente. A especificidade

foi 100,00% para os dois ensaios e a concordância entre os testes excelente: Kappa 0,871 (72,86 – 100) (Lima et al, 2011).

O algoritmo ideal para triagem de infecções TTS deve considerar o processamento em *pools*, pois permite analisar grande número de amostras em tempo reduzido, com menor custo em relação à análise individual (Lima et al, 2011). As técnicas empregadas neste estudo, em *pools* de 10 amostras, foram capazes de identificar DNA de *Plasmodium* ou anticorpos antiplasmodiais com diferentes performances. A técnica de Lima qPCR utilizando sonda TaqMan obteve a maior positividade (43 *pools*), seguida do protocolo RealAmp com 22 *pools* positivos e Lima qPCR com corante intercalante de DNA EvaGreen, com 12 *pools*. A técnica de PET-PCR obteve positividade em um *pool* apenas, e estes resultados são associados ao limite de detecção intrínseco a este protocolo, de 3,2 parasitos/ μ L. A técnica de RealAmp, apesar de amplificar *Plasmodium* em 22 *pools*, mostrou-se não específica, visto que mostrou amplificação também em 11 *pools* considerados negativos por outras técnicas e em 15/16 amostras individuais também negativas. O protocolo Snounou nPCR selecionado para identificar as espécies de *Plasmodium* nos *pools* positivos, conseguiu identificar a espécie envolvida em 7 *pools*. Apesar da perda de 402 amostras, esta redução não comprometeu as análises, pois estas amostras estavam concentradas nos bancos de sangue do Paraná e de São Paulo, responsáveis por grande número de amostras coletadas. O teste imunocromatográfico SD Bioline conseguiu detectar anticorpos anti-*P. vivax* mesmo em amostras agrupadas em *pools*, porém sua utilização foi prejudicada devido a descontinuidade no mercado brasileiro, uma situação comum aos testes imunocromatográficos.

A técnica de Lima qPCR utilizando sonda TaqMan, foi a que obteve maior positividade, com amplificação de DNA genômico abaixo de *cut-off*, definido como Ct =37,49, em 43 *pools*. Utilizando este ponto de corte, calculado por curva ROC, foi observada uma positividade de 4,72% dentre as amostras de doadores de bancos de sangue da Região Amazônica e 3,19% da Região Extra-Amazônica nos *pools* ensaiados. O número de *pools* considerados indeterminados, isto é, com amplificação em somente uma simplicata, mostrou coerência quando comparado ao número de *pools* positivos, sendo 3,77% na Região Amazônica e 4,19% na Região Extra-Amazônica. Os resultados revelaram que na Região Extra-Amazônica, os estados com maior positividade para *Plasmodium* foram Paraná, seguido de Goiás e São Paulo. O protocolo de Snounou nPCR detectou espécies de

Plasmodium em Santa Catarina (*P. malariae*), Mato Grosso do Sul, Minas Gerais (*P. falciparum*), São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná (*P. vivax*).

Os ensaios das amostras individuais dos *pools* positivos conseguiram identificar, através do protocolo Lima qPCR TaqMan, vários doadores positivos (n=25; 6,94%), bem como amostras consideradas indeterminadas (n=51; 14,17%). Snounou nPCR identificou *P. malariae* em doador de Santa Catarina e *P. vivax* em doador do Mato Grosso do Sul dentre as amostras positivas. Dentre as positivas, um doador era de área endêmica e 24 da não endêmica. Nas amostras indeterminadas 12 doadores eram de área endêmica e 39 da não endêmica.

A diferença na positividade nos *pools* (n=43) e nas amostras individuais (n=25) dos *pools* positivos pode ser explicada pelo fato de que várias amostras com baixas parasitemias, quando arranjadas em *pool* aumentam a chance de amplificação de DNA genômico de *Plasmodium*. Quando aberto o *pool*, a amostra individual com baixa concentração de DNA se encontra no limite de detecção, impossibilitando amplificação a níveis detectáveis pelo protocolo. Alguns exemplos deste evento se encontram na Tabela 24, que apresenta amostras individuais consideradas indeterminadas por resultarem em amplificação em uma só alíquota. Nesta situação, em alguns dos *pools* que apresentaram amplificação para *Plasmodium*, não foi possível identificar o doador: no *pool* 644, positivo por várias técnicas, não foi possível identificar o doador nem a espécie envolvida, apesar de duas amostras individuais (6460 e 6463) serem consideradas indeterminadas, com amplificação em apenas uma alíquota; o mesmo pode ser observado nos *pools* 186, 742 e 984 com 3 amostras individuais indeterminadas, e ainda no *pool* 1241, com 5 amostras individuais indeterminadas. A hipótese que o agrupamento em *pool* tenha permitido a amplificação do gênero *Plasmodium*, mas a baixa concentração de DNA nas amostras individuais não tenha contribuído para uma quantidade de DNA molde suficiente para a amplificação deve ser considerada, principalmente pela repetição deste evento nos resultados obtidos.

A técnica de *nested* PCR também não conseguiu detectar a espécie de *Plasmodium* em todas as amostras individuais de *pools* positivos. Embora seja um protocolo bem padronizado e amplamente utilizado na detecção de *Plasmodium*, seu limiar de detecção pode atingir 1 parasito/ μ L, mas sua reprodutibilidade é garantida a partir de 10 parasitos/ μ L (Snounou et al, 1993). Este perfil foi observado nos controles com 10 e 1 parasitos/ μ L usados neste estudo e tem sido observado com diferentes protocolos moleculares quando o alvo de detecção são amostras com parasitemias extremamente baixas. A amplificação por PCR é

um processo estocástico e a identificação de positividade em gel de agarose pode ser arbitrária quando a densidade do parasito na amostra é baixa ou quando a qualidade do DNA é pobre, gerando produtos de amplificação pequenos ou fracos com um sinal de banda vago (Lo et al, 2015).

O estudo revelou uma alarmante positividade na área não endêmica, comparável à área endêmica, indicando que a região não endêmica é vulnerável para a transmissão de malária e deve ser analisada quanto às medidas de controle. Como consequência, exige maior atenção nos critérios para triagem de doadores. A triagem clínico-epidemiológica através de questionários com perguntas específicas para deslocamentos ou procedência de áreas endêmicas ou consideradas não endêmicas, mas passíveis de transmissão, somada a testes moleculares sensíveis pode ser uma alternativa mais segura aos serviços de hemoterapia, evitando seleção de assintomáticos e o indeferimento desnecessário de doadores. Apesar dos índices de positividade na Região Extra-Amazônica revelados neste estudo serem altos, estes estão de acordo com os locais onde são descritos casos autóctones (Couto et al, 2010; Cerutti et al, 2007; Pina-Costa et al, 2014).

Este trabalho apresentou risco de transmissão de malária por transfusão sanguínea nos seguintes estados: Amazonas, Pará, Tocantins (região endêmica); Goiás Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, Bahia, Espírito Santo, sendo a maior positividade nos estados do Paraná, Goiás e São Paulo nos *pools* de amostras, considerando amostras positivas e indeterminadas. Nas amostras individuais: Amazonas, Tocantins e Pará (região endêmicas), Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Não foi possível analisar o tipo de serviço de hemoterapia nem a localização destes nas amostras positivas, pois essas informações não foram relevantes ao estudo anterior de onde se originaram as amostras.

Apesar de Lima qPCR ter controle positivo com 1 parasito/ μ L com amplificação em todos os ensaios, optou-se pela escolha de *cut-off* com 3,5 parasitos/ μ L para este estudo, visto que com essa parasitemia não apresentou variação nos C_t s das placas ensaiadas.

A técnica de RealAmp apresentou custo maior que Lima qPCR e PET-PCR e mostrou-se inadequada devido à sua baixa especificidade, indicando que a técnica apresenta problemas de amplificação e deve ser revista. Além disso, não é indicada para processamento de grande número de amostras por ser permitir ensaiar somente 8 amostras por vez.

A técnica de PET-PCR apesar de apresentar custo e tempo de processamento similares à de Lima pPCR, mostrou-se com baixa positividade e também deve ser aprimorada.

A técnica EvaGreen apresentou menor custo de processamento, mas também requer ajustes no protocolo para alcançar sensibilidade e especificidades adequadas.

Snounou nPCR apesar de ser uma técnica que diferencia as espécies de *Plasmodium*, apresentou o maior custo e tempo de processamento, não sendo indicada para triagem em bancos de sangue

O teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv apresentou positividade de 9,38% em pools de área endêmica e 7,83% nos *pools* de área não endêmica. Porém, seu alto custo e a descontinuidade no mercado prejudica sua indicação para triagem de doadores.

Como limitações do estudo pode-se citar o fato de que as amostras foram coletadas entre 2001 e 2002, e as condições de armazenamento de algumas amostras dificultaram o processamento dos testes, principalmente na análise individual dos *pools* positivos; por se tratar de amostras de estudo anterior, não foi possível o acesso aos doadores positivos para investigação epidemiológica e tratamento, nem acesso aos receptores das bolsas de doadores positivos; a descontinuação do teste imunocromatográfico SD Bioline Pf/Pv para detecção de anticorpos, impossibilitou a análise individual dos *pools* positivos;

A técnica Lima qPCR TaqMan, apresentou melhor desempenho entre todas as técnicas moleculares, sendo compatível com a triagem de grande número de amostras. Foi capaz de amplificar *Plasmodium* tanto em *pools* de amostras quanto em amostras individuais, além de ter sido validada em estudo anterior com excelente concordância, sensibilidade e especificidade. O fato de não detectar a totalidade das amostras individuais dos pools positivos encontra na literatura relatos semelhantes: Costa e colaboradores (2014) mostraram que, independente do protocolo de PCR, uma grande variação entre as duplicatas foi observada, com 38% das amostras ensaiadas alternando entre positivas e negativas.

Neste estudo, diferentes protocolos moleculares foram avaliados com o objetivo de contribuir com a triagem de doadores assintomáticos em bancos de sangue, seja de áreas endêmicas ou não endêmicas para malária. A positividade encontrada nas amostras de bancos de sangue brasileiros, independentemente da endemicidade regional, aponta para a necessidade de normatizar e monitorar a triagem de doadores com risco de transmitir

malária por via transfusional, principalmente considerando o risco de evolução para casos graves ou mesmo óbitos em receptores imunodeprimidos.

CONCLUSÕES

- Foi avaliada a prevalência de marcadores específicos para malária entre doadores de sangue de serviços hemoterápicos brasileiros através de testes moleculares e sorológico;
- Foi comprovada e estimada a existência de portadores assintomáticos de *Plasmodium* entre os doadores de sangue de serviços hemoterápicos brasileiros em áreas endêmicas e não endêmicas para malária;
- A positividade da técnica Lima qPCR para detecção de *Plasmodium* foi 3,31% nos 1.299 *pools* ensaiados;
- A positividade da técnica Lima qPCR para detecção de *Plasmodium* foi 6,94% nas amostras individuais dos 36 *pools* positivos;
- A técnica de Snounou nPCR conseguiu identificar espécies de *Plasmodium* em 7 *pools* (4 *pools* com *P.vivax*, 1 *P.malariae*, e 2 *P.falciparum*) e em 2 amostras de doadores (*P.malariae* e *P. vivax*);
- O teste SD Bioline Pf/Pv foi aplicado em número significativo de mostras agrupadas em *pools* de área endêmica e não endêmica, e apresentou positividade de 9,38% nos 32 *pools* de área endêmica e 7,83% nos 266 *pools* de área não endêmica;
- A comparação entre Lima qPCR e as outras técnicas moleculares (EvaGreen, PET-PCR, RealAmp) revelou pobre e péssima concordância tanto nas amostras agrupadas em *pools* quanto nas amostras ensaiadas individualmente;
- A comparação entre Lima qPCR e SD Bioline Pf/Pv revelou pobre e péssima concordância;

- Observou-se a presença de doadores com testes positivos para *Plasmodium* nos estados de área endêmica: Amazonas, Mato Grosso, Pará e Tocantins;
- Observou-se a presença de doadores com testes positivos para *Plasmodium* nos estados de área não endêmica: Bahia, Espírito Santo, Goiás, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allain JP. Malaria and transfusion: a neglected subject coming back to the forefront. *Clin Infect Dis*. 2010; 51:1199-200.
- Ali N, Ahmed J, Ali N, Jehan F, Saleem S. Transfusion transmitted malaria in three major blood banks of Peshawar, Pakistan. *Afr J Biotechnol*. 2010; 9: 5445-9.
- Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66:639-40.
- Anthony CN, Lau YL, Sum JS, Fong MY, Ariffin H, Zaw WL, et al. Malaysian child infected with *Plasmodium vivax* via blood transfusion: a case report. *Malaria J* 2013;12: 308.
- Arafat R, Long S, Perry M, Marsh S. Probable Transfusion-Transmitted Malaria- Houston, Texas, 2003; 52:1075-6.
- Ávila PE, Kirchgatter K, Brunialti KCS, Oliveira AM, Siciliano RF, Di Santi SM. Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-Check™, for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil. *Rev Inst Med trop Sao Paulo*. 2002; 44: 293-6.
- Bahadur S, Pujani M, Jain M. Use of rapid detection tests to prevent transfusion-transmitted malaria in India. *Asian J Transfus Sci*. 2010; 4: 140-1.
- Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth DF. *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*: factors affecting sensitivity and specificity of PCR-based diagnosis of malaria. *Exp Parasitol*. 1994; 79: 41-9.
- Bharti AR, Letendre SL, Patra KP, Vinetz JM, Smith DM. Malaria diagnosis by a polymerase chain reaction-based assay using a pooling strategy. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81:754-7.
- Baird JK. Evidence and implications of mortality associated with acute *Plasmodium vivax* malaria. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:36–57.
- Belizário VY, Pasay CJ, Bersabe MJ, Leon WU, Guerrero DM, Bugaoisan VM. Field evaluation of malaria rapid diagnostic tests for the diagnosis of *P. falciparum* and non-*P. falciparum* infections. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36: 552-61.
- Bértoli M, Moitinho MLR. Malária no estado do Paraná, Brasil. *Rev Soc Med Trop* 2001; 34: 43-7.
- Besson P, Robert JF, Reviron J, Richard-Lenoble D, Gentilini M. 2 cases of transfusional malaria. Attempted prevention combining an indirect immunofluorescence test with clinical selection criteria. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 1976;19: 369-73.

- Boonma P, Christensen PR, Suwanarusk R, Price RN, Russell B, Lek-Uthai U. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malaria J*. 2007; 6:124.
- Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12: 833-40.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.712 disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2013/prt2712_12_11_2013.html
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal (PIACM) de julho de 2000 a dezembro de 2002: relatório de gestão. Série C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília DF, 2003. 68 pp.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília DF, 2010. 35 pp.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, volume 46; 5pp, 2015.
- Breman JG, Alilio MS, and Mills A. The Intolerable Burden of Malaria II: What's New, What's Needed Supplement to Volume 71(2) Disease Control Priorities in Developing Countries Project, Fogarty International Center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland Northbrook (IL): *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*; Copyright © 2004.
- Brouwer EE, van Hellemond JJ, van Genderen PJ, Slot E, van Lieshout L, Visser LG, et al. A case report of transfusion-transmitted *Plasmodium malariae* from an asymptomatic non-immune traveller. *Malar J* 2013;12: 439.
- Bruce-Chwatt LJ. Transfusion malaria. *Bull World Health Organ*. 1974;50: 337-46.
- Bruce-Chwatt LJ. Transfusion malaria revisited. *Trop Dis Bull*. 1982; 79: 827-40.
- Carrazone CFV, Brito AM, Gomes YM. Importância da avaliação sorológica pré-transfusional em receptores de sangue. *Rev Bras Hemoter*. 2004; 26:93-8.
- Carvalho ME, Glasser CM, Ciaravolo RMC, Etzel A, Santos LA, Ferreira CS. Sorologia de malária *vivax* no foco Aldeia dos Índios, Município de Peruíbe, São Paulo, 1984 a 1986. *Cad Saúde Públ* 1988; 4:276-92.
- Carvalho ME, Glasser CM, Santos LA, Ciaravolo RMC. Nota sobre o encontro de casos autóctones de malária *vivax* por meio de técnica sorológica em São Paulo. *Cad. Saúde Públ* 1985; 1: 250-2.

- Cerutti CJr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab MC, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J* 2007; 6:33.
- Costa-Nascimento MJ, Lima GFMC, Araújo RAS, Kirchgatter K, Carvalho ME, Pereira BF, Bergara DM, Di Santi SM. Avaliação do teste imunocromatográfico SD BIOLINE MALARIA *P.f./P.v.* para detecção de anticorpos em malária, utilizando sangue total, soro ou plasma humano. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Campos do Jordão, SP. Resumos. 2007.
- Costa-Nascimento MJ, Toniolo CRC, Lima, GFMC, Araújo RAS, Kirchgatter K, Wunderlich G, Di Santi SM. Malária autóctone em região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo: benignidade ou risco oculto? III Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, Ubatuba, SP. Resumos. 2006.
- Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:229-37.
- Couto RA, Latorre MRDO, Di Santi SM e Natal Delsio. Autochthonous malaria notified in the State of São Paulo: clinical and epidemiological characteristics from 1980 to 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:52-8.
- Covas DT. Doenças infecciosas transmissíveis por transfusão de sangue. In Hematologia Fundamentos e Prática. (Ed. MA Zago, RF Passeto, R Pasquini), São Paulo: Atheneu; 2001. pp. 977-90.
- Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors* 2010; 3:5.
- Cox-Singh J, Davis TME, Lee KS, Shasul SSG, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008; 46:165-71.
- Cucunubá ZM, Guerra Á, Rivera JA, Nicholls RS. Comparison of asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in two malaria-endemic Colombian locations. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107: 129-36.
- Curado I, Duarte AMRC, Lal AA, Oliveira SG, Kloetzel JK. Antibodies anti-bloodstream and circumsporozoite antigens (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae/P.brasilianum*) in areas of very low malaria endemicity in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92:235-43.

- Curado I, Dos Santos Malafronte R, de Castro Duarte AM, Kirchgatter K, Branquinho MS, Bianchi Galati EA. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta Trop* 2006; 100:54-62.
- Das NG, Dhiman S, Talukdar PK, Goswami D, Rabha B, Baruah I, Veer V. Role of asymptomatic carriers and weather variables in persistent transmission of malaria in an endemic district of Assam, India. *Infect Ecol Epidemiol*. 2015; 5: 25442.
- Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87:1-20.
- Di Santi SM, Boulos M. Protozoários – Malária. In *Parasitologia humana e seus Fundamentos Gerais*. (Ed. B. Cimerman e S. Cimerman), São Paulo: Atheneu; 1999.
- Di Santi SM, Kirchgatter K, Brunialti KCS, Oliveira AM, Ferreira SRS, Boulos M. PCR - Based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2004; 46:183-7.
- Falade CO, Nash O, Akingbola TS, Michael OS, Olojede F, Ademowo OG. Blood banking in a malaria-endemic area: evaluating the problem posed by malarial parasitaemias. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103: 383-92.
- Farcas GA, Zhong KJY, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbol*. 2004; 42: 636–8.
- Fugikaha E, Fornazari PA, Penhalbel RSR, Lorenzetti A, Maroso RD, Amoras JT, Saraiva AS, Silva RU, Bonini-Domingos CR, Mattos LC, Rossit ARB, Cavasini CE, Machado RLD. Triagem molecular de portadores assintomáticos de *Plasmodium sp* entre Bancos de Sangue da região Amazônica brasileira. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*. 2007; 49: 1-4.
- Gama BE, Silva-Pires FES, Lopes MNR, Cardoso MAB, Britto C, Torres KL, Lima LM, de Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia. *Exp Parasitol*. 2007; 116 : 427–32.
- Gauzzi M, Grazan S. A relapse of quartan malaria after 53 years of latency. *Trop. Dis Bull* 1964, 61:11-12.
- Grant DB, Perinpanayagam MS, Shute PG, Zeitlin RA. A case of malignant tertian (*Plasmodium falciparum*) malaria after blood-transfusion. *Lancet*. 1960; 2: 249-70.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med*. 2000; 45: 23-41.
- Guerrero IC, Weniger BC, Schultz MG. Transfusion malaria in the United States, 1972-1981. *Ann Int Med*. 1983; 99: 221-6.

- Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2521–28.
- HAY, SI, EA OKIRO, PW GETHING, AP PATIL, AJ TATEM, CA GUERRA, AND RW SNOW. Estimating the global clinical burden of *Plasmodium falciparum* malaria in 2007. *PLoS Medicine* 2010; 7: e1000290
- Haydoura S, Mazboudi O, Charafeddine K, Bouakl I, Baban T, Taher AT, et al. Transfusion-related *Plasmodium ovale* malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. *Parasitol Intern* 2011; 60: 114–116.
- Huong NM, Davis TM, Hewitt S, Huong NV, Uyen TT, Nhan DH, Cong le D. Comparison of three antigen detection methods for diagnosis and therapeutic monitoring of malaria: a field study from southern Vietnam. *Trop Med Int Health*. 2002; 7: 304-8.
- Kanunfre KA. Desempenho de metodologia molecular no diagnóstico da malária em amostras de sangue de indivíduos de área endêmica no Brasil. São Paulo. Dissertação de Mestrado em Fisiopatologia Experimental – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2003.
- Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *BMJ* 2005; 331:576-b.
- Kitchen A, Mijovic A, Hewitt P. Transfusional transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient. *Vox Sanguinis* 2005; 88: 200-1.
- Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sanguinis*. 2006; 90: 77-84.
- Ladeia-Andrade S 2005. Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil, Tese. Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 287 pp.
- Lima GFMC, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MCA, Segurado AAC, Hristov AD, Inoue J, Costa-Nascimento MJ, Di Santi SM. Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large -scale. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*. 2011; 106: 691-700.
- Lo E, Zhou G, Oo W, Afrane Y, Githeko A, Yan G. Low parasitemia in submicroscopic infections significantly impacts malaria diagnostic sensitivity in the highlands of Western Kenya. *PLoS One* 2015; 10:e0121763.

- Lucchi NW, Demas A, Narayanan J, Sumari D, Kabanywany A, Kachur SP, Barnwell JW, Udhayakumar V. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS One*. 2010; 5: e13733.
- Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PLoS One*. 2013;8: e56677.
- Milne LM, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J. Clin. Pathol*. 1994; 47: 740–742.
- Moody A. Rapid Diagnostic Test for Parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 66-78.
- Mungai M, Tegtmeier G, Chamberland M, Parise M. Transfusion-transmitted malaria in the United States from 1963 through 1999. *N Engl J Med*. 2001; 344: 1973-8.
- Murray CK, Bell D, Gasser RA, Wongsrichanalai C. Rapid diagnostic testing for malaria. *Trop Med Intern Health*. 2003; 8: 876-83.
- Nahlen BL, Lobel HA, Cannon SE, Campbell CC. Reassessment of blood donor selection criteria for United States travelers to malaria areas. *Transfusion*. 1991; 31: 798-804.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:E63.
- Nussenzweig V, Sonntag R, Biancalana A, Freitas JLP, Amato Neto V. Ação da violeta de genciana sobre o *T. cruzi* *in vitro*: sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. *Rev Paulista Med* 1953; 42: 57-8.
- Ochola LB, Vounatsou P, Smith T, Mabaso MLH, Newton CRJC. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 582–588.
- Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Commun*. 2012; 3: 1237.
- Oliveira JPA, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infec Dis* 1995; 20:15.
- Owusu-Ofori AK, Parry C, Bates I. Transfusion-transmitted malaria in countries where malaria is endemic: a review of the literature from sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis*. 2010; 51: 1192-8.
- Park SK, Lee KW, Hong SH, Kim DS, Lee JH, Jeon BH, Kim WS, Shin HJ, An SH, Park H. Development and evaluation of an immunochromatographic kit for the detection of antibody to *Plasmodium vivax* infection in South Korea. *Yonsei Med J*. 2003; 44: 747-50.

- Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, de Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109: 618-33.
- Ross R. An improved method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. *Lancet*. 1903; 1: 86-7.
- Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol*. 2004;42: 5636-43.
- Sáez-Alquézar A, Ramos AMSV, Di Santi SM, Branquinho MS, Kirchgatter K, Cordeiro IAC, Murta M, Saraiva JCP, Oliveira SG, Bochetti MGG, Pirolla JA, Guerzoni D, Chamone DAF. Controle da malária transfusional em região endêmica e não-endêmica no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31: 27-34.
- São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. SUCEN/SINAN/Divisão de Zoonoses. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/malaria8306_cepid.htm. Acesso em 11/12/13
- Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, Lima GF, Inoue J, Sanchez MC, Di Santi SM. Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2011; 53: 55-9.
- Seed CR, Kitchen A, Davis TM. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfus Med Rev*. 2005; 19: 229-40.
- Sharma A, Khanduri U. How benign is benign tertian malaria? *J Vector Borne Dis* 2009; 46: 141-4.
- Singh R, Godson II, Singh S, Singh RB, Isyaku NT, Ebere UV. High prevalence of asymptomatic malaria in apparently healthy schoolchildren in Aliero, Kebbi state, Nigeria. *J Vector Borne Dis*. 2014; 51: 128-32.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 61: 315–20.
- Snow RW. Global malaria eradication and the importance of *Plasmodium falciparum* epidemiology in Africa. *BMC Med* 2015; 13:23.
- Suárez-Mutis MC, Cuervo P, Leoratti FM, Moraes-Avila SL, Ferreira AW, Fernandes O, Coura JR. Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax*

- infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49:159-64.
- Swan H, Sloan L, Muyombwe A, Chavalishewinkoon-Petmitr P, Krudsood S, Leowattana W, Wilairatana P, Looareesuwan S, Rosenblatt J. Evaluation of a real-time polymerase chain reactions assay for diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 73: 850–4.
- Waltmann A, Darcy AW, Harris I, Koepfli C, Lodo J, Vahi V, Piziki D, Shanks GD, Barry AE, Whittaker M, Kazura JW, Mueller I. High Rates of Asymptomatic, Sub-microscopic *Plasmodium vivax* Infection and Disappearing *Plasmodium falciparum* Malaria in an Area of Low Transmission in Solomon Islands. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9:e0003758.
- Wendel, Silvano. Risco residual da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil. São Paulo. Tese de doutorado em Ciências - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2005.
- White NJ. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 172-2.
- WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. World Health Organization 2010; 67 pp.
- WHO. World Malaria Report 2014. World Health Organization 2014; 227 pp.
- Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:119-27.
- Woolsey G. Transfusion for pernicious anaemia: two cases. *Ann Surg* 1911; 53: 132-5.
- Wylie BR. Transfusion transmitted infection: viral and exotic diseases. *Anaesth Intensive Care.* 1993; 31: 24-30.
- Zoghi S, Mehrizi AA, Raeisi A, Haghdoost AA, Turki H, Safari R, Kahanali AA, Zakeri S. Survey for asymptomatic malaria cases in low transmission settings of Iran under elimination programme. *Malar J* 2012; 11:126.

ANEXO I

(TCLE Banco de Sangue)

Informações para o paciente e termo de consentimento livre e esclarecido

Prezado Sr (a)

Está sendo desenvolvida uma pesquisa na no Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sobre o risco residual de doenças transfusionais, especialmente a doença de Chagas. A seguir, explicaremos o motivo desta pesquisa e qual seria a sua participação. É importante realçar que em nenhum momento haverá custo financeiro da sua parte, ou qualquer risco à sua saúde.

A proposta da pesquisa é levantar os dados sobre os doadores brasileiros no que concerne ao risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas pela transfusão de sangue, particularmente a doença de Chagas. Testes adequados já são rotineiramente utilizados nos Bancos de Sangue (inclusive no que o senhor está doando generosamente seu sangue neste momento). Todavia, nenhum procedimento tem 100% de segurança e, portanto, a partir de uma análise de doadores que representem todo o nosso país, poderemos avaliar e quantificar se este risco é praticamente nulo, ou se há ainda regiões que mereçam uma atenção maior por parte das autoridades de saúde. Desta forma, os doadores que assim desejarem participar desta pesquisa só precisarão, durante o ato da doação, fornecer cerca de 20 ml de seu sangue; esta amostra será então remetida para São Paulo, onde será submetida a uma série de exames adicionais, alguns deles ainda considerados experimentais. Com isto, pode-se fazer um levantamento nacional sobre a epidemiologia e sorologia dos doadores de sangue normalmente triados para a doença de Chagas, assim como quantificar a possibilidade ou não de transmissão de doenças transfusionais associadas, e a quantificação de risco residual de transmissão de doenças transfusionais nos receptores de sangue brasileiros.

O pesquisador principal será o Dr. Silvano Wendel Neto, pós graduando da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CRM-SP 43.498). A duração desta pesquisa terá cerca de 36 meses, já tendo se iniciada em Julho de 2000. Quaisquer dúvidas poderão ser resolvidas diretamente pelo pesquisador pelo telefone (11) 3255-7746, FAX (11) 3257-1290, e-mail snwendel@uninet.com.br, ou no endereço: Rua Adma Jafet 91, CEP 01308-050, São Paulo, SP

Não se espera nenhum tipo de desconforto ao senhor (a) durante a coleta desta amostra, posto que este procedimento é normalmente efetuado durante a sua doação de sangue. Apenas serão colhidos 2 (dois) tubos adicionais, que serão posteriormente encaminhados para a cidade de São Paulo.

O senhor (a) terá acesso a qualquer tempo às informações obtidas nesta pesquisa, caso seja de seu desejo. Também terá a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento que assim desejar e deixar de participar deste estudo, sem que isto traga qualquer prejuízo à sua saúde ou assistência. Além disso, por ser uma pesquisa feita pela FMUSP, terá sempre a disponibilidade de assistência no Hospital das Clínicas da FMUSP por eventuais danos à sua saúde que possam ser diretamente imputadas à pesquisa, embora ressalte-se que haverá apenas a necessidade de doação de cerca de 20 ml de seu sangue durante o ato da doação de sangue. O processo de seleção ao doador, pelo qual o (a) senhor (a) está passando no momento neste conceituado serviço hemoterápico é totalmente independente da pesquisa ora efetuada e está sempre em conformidade com as normas do Ministério da Saúde.

Diante do exposto, solicitamos o obséquio de preencher (em letra de forma) o formulário em anexo.

A ser mantida no Banco de Sangue responsável pela coleta da amostra de sangue

Nome Completo:.....

RG:.....

Endereço:.....

Número da doação (preenchida e fornecida pelo Banco de Sangue):

Marcar com X:

☐

Sim, declaro que entendi o texto acima e consinto que a amostra do meu sangue seja analisada para testes referentes à doença de Chagas, assim como outras doenças que sejam necessárias para levantamentos epidemiológicos e sorológicos pertinentes à transmissão de doenças por via transfusional. Entendo também que apenas o Banco de Sangue responsável pela coleta do meu sangue terá acesso à minha identificação completa, e que o autor desta pesquisa só terá acesso ao número de identificação da doação (fornecido pelo próprio Banco de Sangue), idade, sexo e se já doei sangue anteriormente.

☐

Não concordo em participar da pesquisa acima mencionada.

Assinatura:.....

Data: ____/____/____

A ser entregue para o autor principal da pesquisa (Dr. Silvano Wendel Neto)

Número da doação (preenchida e fornecida pelo Banco de Sangue):

Marcar com X:

☐

Sim, declaro que entendi o texto acima e consinto que a amostra do meu sangue seja analisada para testes referentes à doença de Chagas, assim como outras doenças que sejam necessárias para levantamentos epidemiológicos e sorológicos pertinentes à transmissão de doenças por via transfusional. Entendo também que apenas o Banco de Sangue responsável pela coleta do meu sangue terá acesso à minha identificação completa, e que o autor desta pesquisa só terá acesso ao número de identificação da doação (fornecido pelo próprio Banco de Sangue), idade, sexo e se já doei sangue anteriormente.

☐

Não concordo em participar da pesquisa acima mencionada.

Assinatura:.....

Data: ____/____/____

ANEXO II

(TCLE Amostras Clínicas)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:..... CEP:..... FONE:DDD(.....).....
2. RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº:..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:..... CEP:..... FONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Validação de PCR em tempo real e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em *pool*, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala.

PESQUISADOR : Silvia Maria Di Santi

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador Científico

INSCRIÇÃO CRBio: 01078-01

UNIDADE DO HCFMUSP: Moléstias Infecciosas e Parasitárias

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO (X)	RISCO MÉDIO ()
RISCO BAIXO ()	RISCO MAIOR ()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses.

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa a obter um método de diagnóstico de malária para grande número de amostras. Na parte inicial deste estudo, precisamos avaliar se os testes que vamos utilizar são adequados, e para isso serão realizados exames com sangue colhido de pessoas sem malária, como é o seu caso, como controle negativo.

2 – Serão realizados exames com novas técnicas chamadas PCR, além de testes para verificar a presença de anticorpos que existem em pessoas que tiveram ou têm malária. Estes tipos de exames são diferentes daqueles que são utilizados para diagnóstico de malária rotineiro, sendo utilizados somente em estudos.

3 – Será coletado um tubo de 5 ml de sangue da veia do antebraço, e todo o material utilizado é descartável.

4 – O senhor (a) sentirá apenas o desconforto da picada da agulha no momento da coleta do sangue, que será realizada por profissional capacitado;

5 – Embora não haja benefício direto para o participante, trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que algumas técnicas poderão ser usadas para detectar doadores de sangue com malária, e somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício;

6 – Não há outro procedimento que possa ser vantajoso para o senhor (a) optar quanto à coleta de sangue.

7 – Em qualquer etapa do estudo o senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Silvia Maria Di Santi, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 4º andar, Ambulatório dos Viajantes, no Laboratório de Malária, no telefone 3089-8025. Se o senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar, tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26, Email: capneso@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo;

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum deles;

10 – O senhor (a) terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas;

11 – Não há despesas pessoais para o senhor (a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – Esta amostra será utilizada para este estudo, porém solicitamos sua concordância em armazená-la para eventuais estudos posteriores, assegurando que estes serão submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Estou ciente das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "Validação de PCR em tempo real e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em pool, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala". Eu discuti com a Dra. Silvia Maria Di Santi sobre a minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Concordo que a amostra de sangue colhida seja armazenada para eventuais estudos, respeitadas as normas para tanto".

Assinatura do participante/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste indivíduo ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO III

(Comitê de Ética)

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/07/2012, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 205/12 intitulado: **"PLATAFORMA PARA DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA APLICADA EM AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE DE ÁREAS ENDÊMICAS E NÃO ENDÊMICAS BRASILEIRAS PROCESSADAS EM POOL: DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES E SOROLÓGICOS."** apresentado pelo Departamento de MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Silvia Maria Fátima Di Santi

Pesquisador (a) Executante: Giselle Fernandes Maciel de Castro Lima

CEP-FMUSP, 17 de Julho de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO IV

(Plataforma Brasil)

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Plataforma para diagnóstico de malária aplicada em amostras de doadores de sangue de áreas endêmicas e não endêmicas brasileiras processadas em pool: determinação da frequência de positividade utilizando marcadores moleculares e sorológicos.

Área Temática:

Pesquisador: Sílvia Maria Fátima Di Santi

Versão: 1

Instituição: Fundação Faculdade de Medicina - ICESP

CAAE: 00770912.7.1001.0065

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 56764

Data da Relatoria: 11/07/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de prevalência de doenças malária em doadores de sangue. Serão avaliadas amostras de 13000 coletadas previamente para um estudo de Chagas. As amostras serão testadas por PCR. O consentimento informado realizado na pesquisa anterior indica que poderão ser realizados outros estudos relacionados a segurança transfusional

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a prevalência de malária em doadores de sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios para a comunidade são importantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A malária pode ser tratada. Os pesquisadores não informam se os doadores positivos para malária serão informados deste resultado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequado

Recomendações:

O colegiado compreende a dificuldade de retornar aos doadores e solicita que sejam realizados relatórios semestrais sobre o desenvolvimento da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O colegiado compreende a dificuldade de retornar aos doadores e solicita que sejam realizados relatórios semestrais sobre o desenvolvimento da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

Na data de emissão desse parecer estavam pendentes os pareceres de algumas co-participantes. As mesmas deverão ser apresentadas antes do início do projeto.

SAO PAULO, 16 de Julho de 2012

Assinado por:
Roger Chammas

ANEXO V
(SUCEN)

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
"SUCEN"
Comissão Científica

São Paulo, 08 de fevereiro de 2012.

Ofício Comissão Científica Permanente nº 02/2012

À Dra. Silvia Di Santi
Núcleo de Estudos em Malária

O projeto de pesquisa "Plataforma para diagnóstico de malária aplicada em amostras de doadores de sangue de áreas endêmicas e não endêmicas brasileiras processadas em pool: determinação da frequência de positividade utilizando marcadores moleculares e sorológicos" foi aprovado quanto ao mérito na 269ª reunião da Comissão Científica Permanente (C.C.P.), em 26 de janeiro de 2012.

A Comissão julgou o projeto consistente; sem aspectos a serem aprimorados e sugere à pesquisadora a busca de recursos em agências de fomento externas. Tal sugestão se deve à escassez de recursos financeiros institucionais, rememorando que dois projetos anteriores sob coordenação de V.S., financiados parcialmente pela SUCEN, vão exigir liberação simultânea de recursos.

Se não aprovado por agência de fomento externa, o projeto poderá ser reapresentado com os custos divididos entre as Instituições participantes, elencadas neste. A Comissão considera que o conhecimento da contrapartida das Instituições participantes irá aprimorar a gestão de recursos de projetos interinstitucionais.

Atenciosamente,

Assinatura manuscrita de Regiane Maria Tironi de Menezes.

PqC Regiane Maria Tironi de Menezes
Secretária Executiva da Comissão Científica Permanente