Arianni Rondelli Sanchez

**Validação de teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-MSP1₁₉ de
Plasmodium vivax visando à aplicação em serviços hemoterápicos do Brasil em
áreas não endêmicas para malária**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina
Tropical de São Paulo para a obtenção do título
de Mestre em Ciências.**

**Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional**

**Orientadora: Dra. Maria Carmen Arroyo
Sanchez**

São Paulo

2014

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Sanchez, Arianni Rondelli

Validação de teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-MSP₁₉ de *Plasmodium vivax* visando à aplicação em serviços hemoterápicos do Brasil em áreas não endêmicas para malária / Arianni Rondelli Sanchez. – São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Maria Carmen Arroyo Sanchez

Descritores: 1. MALÁRIA. 2. *PLASMODIUM*. 3. ANTÍGENOS. 4. ELISA. 5. BANCOS DE SANGUE. 6. TRANSFUSÃO DE SANGUE.

USP/IMTSP/BIB-08/2014.

À minha mãe, Cleusa Rondelli Clemente, por acreditar e incentivar todos os meus
sonhos e escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conduzir minhas escolhas guiando-me sempre pelo melhor caminho.
Pela proteção a cada dia dessa trajetória.

À minha família, especialmente a minha mãe, Cleusa Rondelli Clemente e aos meus irmãos, Talles Gustavo Rondelli Sanchez e Matheus Yuri Rondelli Sanchez, por compreenderem minhas escolhas e apoiá-las incondicionalmente. Por suportarem a distância fazendo-se presentes em todos os momentos.

À minha orientadora, Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, por confiar a mim a linda missão de desenvolver este trabalho. Por acreditar na minha capacidade. Por motivar constantemente meu crescimento profissional. Pela paciência em transmitir seu conhecimento e principalmente pelo carinho de amiga e a preocupação de mãe, muitas vezes demonstrada.

Ao Dr. Eduardo Milton Ramos Sanchez, pela imensurável ajuda nos ensaios de biologia molecular e pela humildade com que dividiu seu tempo e conhecimento.

À Profa. Dra. Hiro Goto, pelo suporte e interesse sempre demonstrado e pelas inúmeras contribuições financeiras e intelectuais.

À Dra. Silvia Maria Di Santi, pela parceria e contribuição indispensáveis para a realização deste trabalho e pelo seu amor à malária e àqueles que sofrem por ela.

À Dra. Irene da Silva Soares, por gentilmente ceder o plasmídeo pET14b-*PvMSP1*₁₉ e por abrir as portas de seu laboratório sempre que precisamos de qualquer auxílio.

À aluna Fernanda Oliveira, pela contribuição na realização dos ensaios clínicos e pela agradável companhia.

À Msc. Cristiane Yumi Ozaki, pela constante ajuda nos ensaios de biologia molecular e sugestões no texto da dissertação.

Aos colegas de laboratório, em especial a Dra. Guita RubinskyElefant e Msc. Beatriz Julieta Celeste, pela agradável convivência e por tamanha prestatividade.

Às meninas da SUCEN, Maria de Jesus Costa-Nascimento e Giselle F. M. C. Lima, pela ajuda com as amostras de Banco de Sangue.

Aos Profs. Drs. Sandra do Lago Moraes e Gerhard Wunderlich, membros da Banca de Qualificação, pelas valiosas sugestões e contribuição para este trabalho.

Às secretárias Eunice Bonfim e Eliane Araújo, pelas informações, dedicação e eficiência nos trâmites burocráticos no decorrer do trabalho.

Aos bibliotecários Sônia Pedrozo Gomes e Carlos José Quinteiro, pelo auxílio nas buscas bibliográficas e formatação textual da dissertação.

Ao XVI Seminário Laveran e Deane sobre Malária, pela oportunidade de expor este trabalho, ainda em fase inicial, a pesquisadores de alto gabarito quanto a malária, possibilitando seu aprimoramento.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, pelo suporte financeiro no início do trabalho.

Às agências de financiamento da bolsa de Mestrado: CAPES e CNPq.

Ao meu namorado, Valentin Paulo Viola Neto, pela admiração, paciência e incentivo que motivaram a conclusão deste estudo.

MUITO OBRIGADA!

“A ciência não tem sentido senão quando serve aos interesses da humanidade”

Albert Einstein

RESUMO

Sanchez AR. Validação de teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-MSP1₁₉ de *Plasmodium vivax* visando à aplicação em serviços hemoterápicos do Brasil em áreas não endêmicas para malária (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

A malária transmitida por transfusão (MTT), embora seja um evento raramente relatado em áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade, representa um desafio devido à ocorrência de infecções assintomáticas e à possibilidade de sobrevivência de *Plasmodium* em hemácias estocadas por até três semanas a temperaturas entre 2 e 6°C. No Estado de São Paulo, quatro casos de MTT foram relatados, incluindo uma morte. Os doadores infectados foram identificados como portadores assintomáticos que viviam ou haviam se deslocado para o bioma Mata Atlântica do estado. Nesses doadores, geralmente as densidades parasitárias são baixas e indetectáveis pela gota espessa ou testes rápidos. O uso de plataformas incluindo testes sorológicos poderia detectar doadores suspeitos de infecção por *Plasmodium*, minimizando a possibilidade de MTT. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi padronizar a produção de antígeno recombinante MSP1₁₉ de *P. vivax*, que é a espécie mais prevalente no Brasil, e validar o teste ELISA-PvMSP1₁₉, visando à aplicação em serviços hemoterápicos brasileiros de áreas não endêmicas para malária. O antígeno recombinante produzido em condições desnaturantes mostrou-se adequado para a produção em larga escala, pela facilidade de obtenção e purificação. Os resultados de estabilidade obtidos em três lotes-piloto indicaram validade de pelo menos 27 meses sem perda de reatividade. Além disso, o teste apresentou 96,95% de sensibilidade em 197 soros de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* e especificidade de 100,0% utilizando soros de 101 indivíduos controles sadios e 99,26% quando considerados também 168 amostras de soro de pacientes com outras doenças. O coeficiente de variação das amostras positivas foi $\leq 3,8\%$ para a repetitividade e $\leq 10,6\%$ para a reprodutibilidade. Quanto à reatividade cruzada, obtiveram-se falsos resultados positivos com amostras de doença de Chagas (5,88%) e fator reumatoide (6,67%). Após a validação, avaliou-se a prevalência de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ de *P. vivax* entre doadores de sangue do Sudeste do Brasil, considerados aptos à doação, ensaiando 1.974 amostras de soro de bancos de sangue, sendo 1.309 do Estado São Paulo (SP) e 665 do Estado do Rio de Janeiro (RJ). A positividade entre as amostras de SP foi 1,15% (N = 15) e entre as do RJ foi 1,65% (N = 11). O índice de reatividade (IR) das amostras positivas variou entre 8,98-1,16 (SP) e 13,03-1,08 (RJ). Em SP e RJ, maior positividade foi encontrada nos municípios que têm contato com o bioma Mata Atlântica e no RJ, também no bairro da Tijuca, onde se encontra a Floresta da Tijuca. A presença de anticorpos IgG anti-*P. vivax* não é necessariamente um marcador de parasitemia ou doença, porém aponta para o risco de MTT, mesmo em áreas de baixa endemicidade, pois doadores assintomáticos podem ser aceitos com base em triagem clínica. Estes achados constituem-se em alerta que nos impele a rever os critérios adotados para a seleção dos doadores, com o objetivo de reduzir o risco de MTT nessas áreas sem perder doações.

Descritores: Malária. *Plasmodium*. Antígenos. ELISA. Bancos de Sangue. Transfusão de Sangue.

ABSTRACT

Sanchez AR. Validation of ELISA for *Plasmodium vivax* MSP1₁₉ antibodies aiming at the application in Brazilian haemotherapeutic services in malaria non-endemic areas (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

In non-endemic and low endemic areas, transfusion-transmitted malaria (TTM) is a rarely reported event, representing a major challenge, essentially due to the occurrence of asymptomatic infections and to the possibility of *Plasmodium* survival up to three weeks in stored red blood cells at temperatures between 2 and 6°C. In São Paulo State, four TTM were detected, including one death. Infected donors were identified as asymptomatic carriers that lived or that had displacements to the Atlantic forest biome in the state. In these donors generally the parasite densities are low and undetectable in the thick blood smear or rapid diagnostic tests. The use of platforms including serological tests might point out donors suspected of harboring *Plasmodium*, minimizing the possibility of TTM. Accordingly, the aim of this study was to standardize the production of *P. vivax* MSP1₁₉ recombinant antigen, which is the most prevalent species in Brazil, and validate ELISA-PvMSP1₁₉, aiming at the application in Brazilian haemotherapeutic services in malaria non-endemic areas. The recombinant antigen produced under denaturing conditions was suitable for large-scale production, due to the ease of obtaining and purification. The results of stability obtained in three pilot batches indicated that it was valid for at least 27 months without loss of reactivity. Furthermore, the test showed 96.95% sensitivity in sera from 197 patients with positive thick-blood smear for *P. vivax* and 100.0% specificity in sera from 101 healthy controls, and 99.26% when considered also 168 samples from patients with other diseases. The variation coefficient of positive samples was $\leq 3.8\%$ for repeatability and $\leq 10.6\%$ for reproducibility. For cross-reactivity, false positive results were obtained with Chagas' disease (5.88%) and rheumatoid factor (6.67%) samples. After validation, we evaluated the prevalence of IgG anti-MSP1₁₉ antibodies to *P. vivax* among blood donors in Southeastern Brazil, considered suitable for donation, rehearsing 1,974 serum samples from blood banks, being 1,309 from the State of São Paulo (SP) and 665 from the State of Rio de Janeiro (RJ). The positivity among samples from SP was 1.15% (N = 15) and in RJ was 1.65% (N = 11). The reactivity index (RI) of the positive samples ranged from 8.98 to 1.16 (SP) and from 13.03 to 1.08 (RJ). In SP and RJ, highest positivity was seen in Municipalities in contact to the Atlantic Forest biome, and in RJ, also in the Tijuca neighborhood, where there is the Tijuca Forest. The detection of IgG antibodies is not necessarily a marker of parasitemia or disease, however, points out to the risk of TTM, even in areas of low endemicity, since asymptomatic donors could be accepted based on clinical screening. These findings constitute an alert that impel us to review the adopted criteria for screening of the donors aiming to reduce the risk of TTM in these areas without losing donations.

Descriptors: Malaria. *Plasmodium*. Antigens. ELISA. Blood Banks. Blood Transfusion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	O indiano Ronald Ross (A) e o francês Charles Louis Alphonse Laveran (B), condecorados com os prêmios Nobel de Medicina nos anos de 1902 e 1907, respectivamente	22
Figura 2	Imagens ao microscópio óptico em imersão de <i>P. falciparum</i> (A), <i>P. vivax</i> (B), <i>P. malariae</i> (C), <i>P. ovale</i> (D) e <i>P. knowlesi</i> (E)	23
Figura 3	Fêmea de <i>Anopheles</i> durante repasto sanguíneo	24
Figura 4	Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i> no vetor e no hospedeiro vertebrado	26
Figura 5	Classificação dos países em relação à eliminação da malária	30
Figura 6	Mapa de risco por município de infecção – Brasil 2012	32
Figura 7	Casos confirmados de malária notificados na Região Extra-Amazonica por espécie parasitária em 2013	34
Figura 8	Casos confirmados de malária notificados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, por local de infecção em 2013	34
Figura 9	Modelo proposto para MSP1 na superfície de <i>P. vivax</i>	48
Figura 10	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em dois lotes (N1 e N2). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15% (A) e 12% (B), corados com Coomassie Blue R-250	68
Figura 11	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em um lote (N3). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corado com Coomassie Blue R-250	69
Figura 12	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em dois lotes sendo um em condições nativas (N4) e um em condições desnaturantes (D1). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15%, corado com Coomassie Blue R-250	70
Figura 13	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em condições desnaturantes (D2). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corado com Coomassie Blue R-250	70

Figura 14	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em dois lotes em condições desnaturantes (D3 e D4). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15% (A) e 12% (B), corados com <i>Coomassie Blue</i> R-250	71
Figura 15	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em dois lotes em condições desnaturantes (D5 e D6). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corados com <i>Coomassie Blue</i> R-250	72
Figura 16	<i>Immunoblotting</i> da His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em condições nativas e desnaturantes frente a padrão positivo (A) e negativo (B)	73
Figura 17	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ produzida em quatro lotes em condições desnaturantes. Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corado com <i>Coomassie Blue</i> R-250	75
Figura 18	<i>Immunoblotting</i> dos quatro lotes produzidos de His ₆ -PvMSP1 ₁₉ frente a padrão positivo e negativo	77
Figura 19	Perfil de reatividade em <i>Immunoblotting</i> do lote A2 da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉ frente a padrão positivo	77
Figura 20	<i>Immunoblotting</i> dos quatro lotes produzidos de His ₆ -PvMSP1 ₁₉ frente a padrão positivo e negativo	78
Figura 21	Curvas <i>ROC</i> obtidas a partir dos valores de absorbância do teste ELISA na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 197 amostras de pacientes com gota positiva para <i>P. vivax</i> e 101 de controles sadios, empregando os lotes B1, C1 e D1	80
Figura 22	Distribuição dos índices de reatividade de 197 amostras de pacientes com malária (D) e 101 controles sadios (S) no teste ELISA, empregando os lotes de antígeno recombinante B1, C1 e D, na pesquisa de anticorpos IgG	81
Figura 23	Curvas <i>ROC</i> obtidas a partir dos valores de absorbância do teste ELISA na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 197 amostras de pacientes com gota positiva para <i>P. vivax</i> , 101 de controles sadios e 168 de outras doenças, empregando os lotes B1, C1 e D1	82
Figura 24	Distribuição dos índices de reatividade de 197 amostras de pacientes com malária (D) e 101 controles sadios + 168 amostras de outras doenças (S+OD) no teste ELISA, empregando os lotes de antígeno recombinante B1, C1 e D, na pesquisa de anticorpos IgG	83

Figura 25	Distribuição dos índices de reatividade de amostra positiva para <i>P. vivax</i> e negativa, em estudo de repetitividade	84
Figura 26	Distribuição dos índices de reatividade de amostra positiva para <i>P. vivax</i> e negativa, em estudo de reprodutibilidade	86
Figura 27	Estabilidade acelerada dos lotes B1, C1, D1	88
Figura 28	Estabilidade à temperatura ambiente dos lotes B1, C1, D1	89
Figura 29	Estabilidade a -20°C dos lotes B1, C1, D1	90
Figura 30	Estabilidade das placas pré-sensibilizadas com lotes C1 e D1, mantidas a -20°C e 4°C	91
Figura 31	Distribuição dos índices de reatividade de 1.974 amostras de Serviços Hemoterápicos, sendo 1.309 do Estado de São Paulo e 665 do Estado do Rio de Janeiro	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Casos confirmados de malária por UF de notificação na Região Extra-Amazônica em 2012 e 2013	33
Tabela 2	Casos confirmados de malária autóctones por UF de notificação na Região Extra-Amazônica em 2012 e 2013	35
Tabela 3	Principais diferenças entre os protocolos utilizados na obtenção da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉	59
Tabela 4	Comparação entre os antígenos obtidos utilizando diferentes metodologias de indução e purificação	73
Tabela 5	Condições de eluição e concentração proteica dos lotes produzidos para validação do teste ELISA-His ₆ -PvMSP1 ₁₉	74
Tabela 6	Reatividade dos lotes de antígeno His ₆ -PvMSP1 ₁₉ frente a 12 amostras positivas e nove negativas	79
Tabela 7	Desempenho dos lotes de antígeno recombinante frente a 197 amostras de pacientes com gota positiva para <i>P. vivax</i> e 101 de controles sadios	80
Tabela 8	Desempenho dos lotes de antígeno recombinante frente a 197 amostras de pacientes com gota positiva para <i>P. vivax</i> , 101 de controles sadios e 168 de outras doenças	82
Tabela 9	Número de amostras de pacientes com outras doenças reagentes pelo teste ELISA empregando os lotes B1, C1 e D1, considerando diferentes valores de <i>cut-off</i>	84
Tabela 10	Coeficiente de variação (CV) da amostra positiva no estudo de repetitividade e medianas dos índices de reatividade das amostras positiva e negativa	85
Tabela 11	Coeficiente de variação (CV) da amostra positiva no estudo de reprodutibilidade e medianas dos índices de reatividade das amostras positiva e negativa	87
Tabela 12	Positividade do teste ELISA-PvMSP1 ₁₉ para anticorpos IgG em amostras de Serviços Hemoterápicos de São Paulo e Rio de Janeiro	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Mecanismos da imunidade efetora a <i>Plasmodium</i>	45
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ag	Antígeno
AMA1	Antígeno 1 de Membrana Apical
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCA	Bicinchoninic Acid
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CV	Coefficiente de variação
D	Desnaturante
DAB	Diaminobenzina
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GE	Gota Espessa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GST	Glutathione-S transferase
His	Histidina
HRP-2	<i>histidine-rich protein 2</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Intérféron gama
IgG	Imunoglobulina de classe G
IMT	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
IPA	Incidência Parasitária Anual
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
IR	Índice de Reatividade
J	Índice de Youden
kDa	kilodaltons
LB	Luria Bertani
LR	Limiar de Reatividade
MBP	Metabissulfito de sódio
MM	Massa molecular
MSP1	Proteína 1 de Superfície do Merozoíto
MTT	Malária Transmitida por Transfusão
N	Nativo
N=	Número de indivíduos
NAT	Testes para Ácidos Nucleicos
NBR	Norma Brasileira

NC	Não calculado
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células T <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Ortofelinenodiamina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pET14b	Plasmídeo de expressão
pLDH	Lactato desidrogenase do parasito
PMM	Padrão de Massa Molecular
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
RBM	<i>Roll Back Malaria</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SSTF	Solução salina tamponada com fosfatos
TA	Temperatura ambiente
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral
Tris	Hidroximetil-aminometano
UF	Unidade da Federação
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Malária: esboço histórico	20
1.2	<i>Plasmodium</i> e <i>Anopheles</i>	22
1.3	Ciclo biológico de <i>Plasmodium</i>	24
1.4	Sintomatologia e Aspectos clínicos	26
1.5	Diagnóstico da malária	28
1.6	Epidemiologia da malária e estratégias de controle	29
1.6.1	Malária no mundo	29
1.6.2	Malária no Brasil	30
1.6.3	Malária na Região Extra-Amazônica	32
1.7	Infecções assintomáticas	38
1.8	Malária transmitida por transfusão	39
1.9	Imunidade na malária	43
1.10	Pesquisa de anticorpos na malária	45
1.11	Proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1)	46
1.11.1	MSP1 ₁₉	49
2	OBJETIVOS	52
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	Casuística	54
3.2	Aspectos éticos da pesquisa	54
3.3	Padronização da produção da proteína recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉	55
3.3.1	Protocolo 1 (Cunha et al., 2002; Rodrigues et al., 2003)	55
3.3.2	Protocolo 2	56
3.3.3	Protocolo 3 (<i>ProBond™ Purification System</i>)	57
3.3.4	Protocolo 4	58
3.3.5	Protocolo 5	58
3.3.6	Protocolo 6	58
3.4	Avaliação do antígeno recombinante His ₆ -PvMSP1 ₁₉	60

3.4.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	60
3.4.2	Dosagem do conteúdo proteico	60
3.4.3	<i>Immunoblotting</i>	60
3.4.4	Teste imunoenzimático ELISA- <i>PvMSP1₁₉</i>	61
3.5	Obtenção dos lotes da proteína recombinante His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i> para validação e ensaios clínicos	61
3.6	Validação do teste ELISA-His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i>	62
3.6.1	Testes analíticos	62
3.6.2	Estudos de estabilidade	64
3.6.2.1	Estabilidade acelerada	64
3.6.2.2	Estabilidade à temperatura ambiente (TA)	65
3.6.2.3	Estabilidade de longa duração (tempo real)	65
3.6.2.4	Estabilidade das placas pré-sensibilizadas	65
3.7	Ensaio clínicos	66
3.8	Análise estatística	66
4	RESULTADOS	68
4.1	Análise da padronização da produção da proteína recombinante His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i>	68
4.1.1	Protocolo 1	68
4.1.2	Protocolo 2	69
4.1.3	Protocolo 3	69
4.1.4	Protocolo 4	70
4.1.5	Protocolo 5	71
4.1.6	Protocolo 6	71
4.1.7	Análise da reatividade das proteínas recombinantes His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i> por reação de <i>Immunoblotting</i>	72
4.1.8	Teste ELISA-His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i>	73
4.2	Análise dos lotes obtidos da proteína recombinante His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i>	74
4.2.1	Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i> em SDS-PAGE	74
4.2.2	Análise da reatividade das proteínas recombinantes His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i> por reação de <i>Immunoblotting</i>	76
4.2.3	Teste ELISA-His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i>	78
4.3	Validação do teste ELISA-His ₆ - <i>PvMSP1₁₉</i>	79
4.3.1	Testes analíticos	79

4.3.1.1	Sensibilidade e Especificidade	79
4.3.1.2	Reação Cruzada	83
4.3.1.3	Repetitividade	84
4.3.1.4	Reprodutibilidade	85
4.3.1.5	Estabilidade	87
4.4	Ensaio clínico	92
5	DISCUSSÃO	95
6	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
	ANEXOS	132

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: esboço histórico

A malária vem acompanhando o homem desde o seu surgimento, na África, onde se acredita ter sido o berço da humanidade, e seguindo na esteira das migrações humanas às margens do Mediterrâneo para a Mesopotâmia, península Indiana, Sudeste da Ásia e conseqüentemente para os demais continentes (Bruce-Chwatt, 1980).

A grande antiguidade da infecção pode ser confirmada pela existência de fósseis de mosquitos de mais de 30 milhões de anos e pelo fato de que mais de 150 espécies de *Plasmodium* são encontradas em uma ampla variedade de vertebrados como répteis, aves e mamíferos, porém nenhum dos parasitos, exceto aqueles encontrados em alguns macacos, pode ser transmitido para o homem (Camargo, 1995). Essa alta especificidade de hospedeiro indica uma longa associação entre a espécie humana e as cinco espécies de plasmódio que infectam o homem.

Textos religiosos e médicos chineses (3000 a.C.), mesopotâmicos (2000 a.C.), indianos (1800 a.C.) e assírios, fazem referência a febres sazonais e intermitentes, com características clínicas que sugerem a presença da doença já nesses períodos, apesar de sua verdadeira relação com a malária ser incerta, uma vez que essas aflições eram frequentemente atribuídas a punições divinas ou maus espíritos (Bruce-Chwatt, 1980).

Através de observações lógicas, relacionando o aparecimento da doença com as estações do ano e o local onde viviam os doentes, o médico grego Hipócrates (século V a.C.), descreveu os primeiros detalhes sobre as formas clínicas e complicações compatíveis com a malária, associando calafrios, sudorese e a periodicidade da febre (Bruce-Chwatt, 1980; Retief e Cilliers, 2006; Neghina et al., 2010).

Sucessivamente, diferentes relatos sobre a doença continuaram a ser feitos no decorrer da história. Galen, assim como outros escritores gregos e romanos fizeram

referência à malária ou “Febre Romana”, como também foi chamada, relatando a ocorrência de epidemias da doença na Grécia, Itália, outras partes da Europa e demais continentes através dos séculos. No entanto, por um período de quase 1500 anos, nenhum conhecimento adicional sobre a causa ou tratamento da malária foi relatado (Bruce-Chwatt, 1980).

No início do século XVII, missionários jesuítas aprenderam com os ameríndios a tratar as febres com uma preparação (“Pó dos Jesuítas”) proveniente da casca de uma árvore, a quina (“*Peruvian bark*”), que foi levada para Roma e logo se espalhou pela Europa e Ásia. O reconhecimento de sua ação nas febres intermitentes por Morton e Sydenham (Inglaterra) e Torti (Itália), representou o primeiro avanço terapêutico real. Essas febres específicas receberam no século XVIII o nome italiano “mal’aria”, devido à crença de que fossem causadas pela inalação de maus vapores e emanações de pântanos (Bruce-Chwatt, 1980; Camargo, 1995). Em 1749, Lineu descreveu a árvore e deu-lhe o nome de *Cinchona*, mas o seu alcalóide principal, o quinino, foi isolado em 1820, por Pelletier e Caventou, em Paris (Knell, 1991).

Os eventos mais importantes na história da malária ocorreram no final do século XIX, com a descrição do parasito e descoberta do papel dos insetos na transmissão de algumas doenças infecciosas. Em 1880, o francês Charles Louis Alphonse Laveran, na Argélia, descreveu o parasito da malária em células vermelhas humanas, mas a elucidação do modo real de transmissão se verificou em 1897, quando Ronald Ross, na Índia, encontrou um parasito da malária em um mosquito, que havia se alimentado do sangue de um paciente com malária (Bruce-Chwatt, 1980; Knell, 1991; Cox, 2002). Devido às suas contribuições, Ross e Laveran (Figura 1) receberam o Prêmio Nobel de Medicina em 1902 e 1907, respectivamente.

O complexo ciclo evolutivo do parasito da malária no homem e na fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* foi esclarecido através dos estudos realizados pelos italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e especialmente Giovanni Battista Grassi, em 1898-99 (Bruce-Chwatt, 1980; Cox, 2002). Em 1900, Patrick Manson e colaboradores confirmaram que a malária era realmente transmitida pelo mosquito *Anopheles* (Bruce-Chwatt, 1980).

A forma como a malária se estabeleceu no Novo Mundo ainda permanece

sujeita a especulações, pois não existem dados históricos confiáveis sobre esse ponto. Acredita-se que as espécies *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* tenham sido trazidas do Sudeste Asiático, através das primeiras viagens trans-Pacífico, enquanto que *Plasmodium falciparum*, de origem pós-Colombiana, tenha vindo com escravos africanos trazidos pelos colonizadores espanhóis para a América Central (Bruce-Chwatt, 1980).

Figura 1 – O indiano Ronald Ross (A) e o francês Charles Louis Alphonse Laveran (B), condecorados com os prêmios Nobel de Medicina nos anos de 1902 e 1907, respectivamente

Fonte: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1902/ross-facts.html;

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1907/laveran-facts.html

1.2 *Plasmodium* e *Anopheles*

Os parasitos do gênero *Plasmodium* compreendem 156 espécies pertencentes à família Plasmodiidae, ordem Haemosporida, classe Aconoidasida, filo Apicomplexa, reino Protozoa (NCBI taxonomy database, 2014) e infectam alternadamente um hospedeiro vertebrado e um invertebrado.

Cinco espécies podem parasitar o homem (Figura 2): *P. malariae* (Laveran, 1881), *P. vivax* (Grassi e Feletti, 1890), *P. falciparum* (Welch, 1897), *Plasmodium ovale* (Stephans, 1922) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton e Mulligan 1933).

P. falciparum invade hemácias indistintamente, levando a rápida multiplicação. *P. vivax* invade hemácias jovens e reticulócitos e tem capacidade de formar hipnozoítos (formas latentes no fígado). *P. malariae* invade hemácias velhas e tem o ciclo de três dias, forma quartã. *P. ovale* é semelhante a *P. vivax* na morfologia, na invasão preferencial de reticulócitos e formação de hipnozoítos. *P. knowlesi*, recentemente descrito como a quinta espécie que acomete o homem, possui 24 ciclos de replicação/hora (Cox-Singh et al., 2008; White, 2008; CDC, 2012).

Figura 2 – Imagens ao microscópio óptico em imersão de *P. falciparum* (A), *P. vivax* (B), *P. malariae* (C), *P. ovale* (D) e *P. knowlesi* (E)

Fonte: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html> (A);
<http://www.nyas.org/Publications/Ebriefings/Detail.aspx?cid=d73bddd8-a497-417b-8673-2cb0607e82b4> (B); Collins, 2007 (C e E);
<http://www.medicine.cmu.ac.th/dept/parasite/proto/049.htm> (D)

O gênero *Anopheles* (Figura 3) inclui 465 espécies, divididas em sete subgêneros, dos quais quatro podem transmitir os parasitos da malária: *Anopheles*, *Cellia*, *Kerteszia* e *Nyssorhynchus* (Harbach, 2013).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da doença pertencem aos subgêneros *Nyssorhynchus* (N.) – *An. (N.) darlingi*, *An. (N.) albitarsis* e *An. (N.) aquasalis* e *Kerteszia* (K.) – *An. (K.) cruzii*, *An. (K.) bellator* e *An. (K.)*

homunculus (Pinotti, 1951; Tadei e Dutary-Thatcher, 2000).

An. (N.) darlingi é o principal vetor responsável pela malária endêmica na Região Amazônica. Seus criadouros preferenciais são reservatórios grandes e profundos, à sombra e contendo água fria e plantas flutuantes, sendo amplamente distribuído no Brasil (Pina-Costa et al., 2014). *An. (K.) cruzii* e *An. (K.) bellator* se reproduzem em coleções de água formadas no interior das bromélias, sendo *An. (K.) cruzii* o principal vetor em áreas de Mata Atlântica, tanto de *P. vivax* e *P. malariae* (malária humana) (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Duarte et al., 2013), quanto de *P. simium* e *P. brasilianum* (malária simiana) (Deane, 1992).

Figura 3 – Fêmea de *Anopheles* durante repasto sanguíneo

Fonte: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/index.html>

1.3 Ciclo biológico de *Plasmodium*

O gênero *Plasmodium* é obrigatoriamente intracelular, sendo sua reprodução realizada de forma sexuada (mosquito) e assexuada (vertebrado e mosquito).

A fase de reprodução sexuada (fertilização) ocorre no estômago do mosquito *Anopheles*, seguida por três fases de reprodução assexuada (esporogonia) sendo que a primeira delas ocorre no epitélio do estômago e corpo do mosquito e as outras duas fases ocorrem no hospedeiro vertebrado, uma nas células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exoeritrocítica) e a outra no sangue, repetidas vezes (esquizogonia eritrocítica) (Vaughan et al., 2008).

Durante o repasto sanguíneo, para a maturação dos ovos, a fêmea do mosquito *Anopheles* ingere sangue infectado com gametócitos que liberam os

gametas machos e fêmeas. Por fertilização, forma-se o zigoto que sofre meiose e se transforma em uma forma invasiva, o oocineto; este atravessa a parede do estômago do mosquito, transformando-se em oocisto. Com o início da esporogonia, o oocisto cresce e se divide, completando seu desenvolvimento em 12 a 14 dias, resultando na produção de milhares de esporozoítos invasivos, que migram pela hemolinfa do mosquito e invadem as glândulas salivares (Aly et al, 2009).

Ao realizar novo repasto sanguíneo, os esporozoítos (máximo de 100) são inoculados na pele entrando na circulação através das células do endotélio capilar. Após 30 a 40 minutos, atingem os sinusóides hepáticos, atravessam as células de Kupffer e invadem vários hepatócitos até formar o vacúolo parasitóforo, onde ocorre replicação maciça e crescimento, originando os merozoítos. Com a ruptura dos hepatócitos, os merozoítos são liberados em vesículas, os merossomos, que atravessam os sinusóides hepáticos e liberam milhares de merozoítos na corrente sanguínea, após um período que varia de 6 a 15 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium* (Prudêncio et al., 2006; Vaughan et al., 2008). Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, alguns esporozoítos podem originar hipnozoítos, que são formas latentes do parasito nos hepatócitos, capazes de se desenvolver meses ou anos mais tarde, desencadeando recaídas características dessas espécies (Krotoski, 1989). Na circulação, os merozoítos penetram nos eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico.

No ciclo eritrocítico ocorre nova divisão assexuada, com os merozoítos se desenvolvendo em trofozoítos que amadurecem, dividem-se e formam os esquizontes. Os esquizontes maduros levam à ruptura das hemácias e liberam de seis a 24 merozoítos, para cada esquizonte, capazes de infectar novas hemácias (Figura 4). Os receptores para a invasão são encontrados nos micronemas e nas roptrias. Após um período de reprodução assexuada, alguns trofozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, formas infectantes para o mosquito vetor (Hadley, 1986).

Figura 4 – Ciclo biológico de *Plasmodium* no vetor e no hospedeiro vertebrado

A – Ciclo no mosquito, B – Ciclo eritrocítico, C – Ciclo hepático.

1 – Esporozoítos, 2, 3 – Merozoítos, 4 – Trofozoítos, 5 – Esquizontes, 7 – Gametócitos, 8 – Gametas (macro e micro), 9 – Oocineto, 10 – Oocisto, 11 – Esporozoítos

Fonte: <http://www.atlas-malaria.com/images/ciclobiologico.jpg>

A invasão das hemácias pelos merozoítos envolve múltiplas interações receptor-ligante. Acredita-se que a ligação inicial às hemácias envolva antígenos da superfície dos merozoítos, ancorados à GPI (glicosilfosfatidilinositol), como a proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1), sendo seguida pela reorientação apical, que envolve o antígeno de membrana apical 1 (AMA1), e por várias interações secundárias, entre diferentes ligantes e receptores de hemácias, necessárias para ativação do processo de invasão (Persson et al., 2008; Boyle et al., 2010). Vias alternativas e múltiplos ligantes podem ser utilizados para a invasão, fornecendo novas estratégias e facilitando a invasão em face a polimorfismos dos receptores no hospedeiro ou resposta imune (Duraisingh et al. 2003).

1.4 Sintomatologia e aspectos clínicos

O ciclo eritrocítico do parasito é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária. Em indivíduos não imunes, o paroxismo malárico caracteriza-se

por febre alta, calafrios, suores e cefaleia, que normalmente ocorrem em padrões cíclicos, como consequência da ruptura das hemácias infectadas com esquizontes e exposição do material do parasito ao sistema imune e outros sistemas fisiológicos do hospedeiro. O caráter intermitente da febre depende do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de plasmódio: 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (malária terçã) e 72 horas para *P. malariae* (malária quartã) (Brasil, 2010); entretanto a constatação dessa regularidade é pouco comum, atualmente. Em infecções naturais por *P. vivax*, os primeiros dois ou três ciclos de ruptura dos esquizontes no sangue podem ser assintomáticos (Karunaweera et al., 2003).

De modo geral, as formas clínicas mais graves são causadas por *P. falciparum*, principalmente em adultos não imunes, crianças e gestantes (Brasil, 2010). O quadro clínico pode evoluir para formas de malária complicada, destacando-se forte cefaleia, hipertermia, vômitos, sonolência, convulsões, insuficiência renal aguda, edema pulmonar agudo, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria e choque, que podem levar a óbito (Brasil, 2005a). Em contraste, infecções por *P. vivax* não apresentam, na maioria dos casos, sérios riscos ou complicações, nem a mesma gravidade e taxa de letalidade que as causadas por *P. falciparum* (Mendis et al., 2001; Karunaweera et al., 2003), embora levem a alta morbidade (Arévalo-Herrera e Herrera, 2001).

Postula-se que há uma relação entre severidade da doença e idade das hemácias invadidas (Iyer et al., 2007). *P. falciparum* invade hemácias indistintamente, o que possibilita atingir altas parasitemias em um curto período de tempo. *P. vivax* e *P. ovale* invadem preferencialmente os reticulócitos, limitando a parasitemia, pois a taxa de hemácias jovens de um indivíduo é em torno de 1%. *P. malariae* invade exclusivamente hemácias maduras, o que faz com que esta espécie leve a parasitemias muito baixas em indivíduos imunocompetentes, podendo permanecer por muitos anos, em uma forma assintomática. A preferência de *P. knowlesi* não foi identificada, até o momento (Kerlin e Gatton, 2013).

O período de incubação da doença, tempo compreendido entre a picada do mosquito infectado e o aparecimento dos primeiros sintomas, varia de acordo com a espécie de plasmódio, sendo de 7 a 10 dias para *P. falciparum*, de 10 a 15 para *P.*

vivax e *P. ovale* e de 30 dias para *P. malariae* (Revisão em Di Santi e Boulos, 1999).

1.5 Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária baseia-se no encontro de parasitos no sangue periférico, sendo a gota espessa corada por Giemsa (Ross, 1903) o método de referência (Warhust e Williams, 1996). Sua sensibilidade depende da experiência do microscopista, podendo chegar entre cinco e 50 parasitos por microlitro, embora o mais comum seja 500 parasitos por microlitro (Milne et al., 1994; Moody, 2002). O tempo necessário para ler uma lâmina negativa é de 20 minutos, o que a torna um procedimento pouco adequado quando se examina grande número de amostras (Kitchen e Chiodini, 2006). Mesmo em centros de referência qualificados, a gota espessa pode ser incapaz de diferenciar entre espécies de *Plasmodium* cuja morfologia é bastante similar, como é o caso de *P. vivax* e *P. malariae*. Por estes motivos, novos métodos de diagnóstico, mais sensíveis e práticos, vêm sendo desenvolvidos (Di Santi et al., 2004).

Os testes rápidos ou imunocromatográficos representaram um avanço no diagnóstico da malária, principalmente nas regiões em que é difícil manter um diagnóstico microscópico de qualidade. Baseiam-se na detecção de *histidine-rich protein 2* (HRP-2), lactato desidrogenase do parasito (pLDH) ou aldolase. Apresentam algumas vantagens em relação à gota espessa, pois dispensam o uso de microscópios, podem ser realizados por profissionais com treinamento mínimo e os resultados são obtidos entre 10 e 20 minutos. As principais desvantagens são a baixa sensibilidade dos testes para detecção de *P. vivax* em baixas parasitemias (200 parasitos por microlitro) e custo mais elevado em relação à gota (Moraes et al., 2013).

Os métodos moleculares, em geral, apresentam sensibilidade e especificidade mais elevadas do que a gota espessa e os testes rápidos, além de permitirem a discriminação da espécie de *Plasmodium*. Entretanto, as técnicas são complexas e de custo elevado, o que dificulta sua aplicação em setores primários de saúde (Moraes et al., 2013). A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta alta sensibilidade e especificidade, além de vantagens no diagnóstico de malária mista (Barker et al.,

1992; Kanunfre, 2003). Sua utilização tem sido indicada em áreas endêmicas, para a detecção de assintomáticos, triagem de doadores de sangue (Kitchen & Chiodini, 2006) e como teste de referência para avaliação do desempenho de novos testes diagnósticos (Padley et al., 2008). Snounou et al. (1993) desenvolveram metodologia de *nested* PCR, com alta sensibilidade e especificidade, para as espécies de *Plasmodium* que parasitam o homem, permitindo a detecção de um parasito por microlitro. Lima (2011) padronizou PCR em tempo real em *pool* de amostras obtendo sensibilidade e especificidade semelhantes em relação ao ensaio realizado com amostras individuais.

1.6 Epidemiologia da malária e estratégias de controle

1.6.1 Malária no mundo

Em meados do século XIX, a malária era endêmica na maioria dos países do mundo, afetando 90% da população (Roll Back Malaria, 2008). O emprego de inseticidas de ação residual, principalmente o DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), a partir de 1945, apresentou a possibilidade de interromper a transmissão, levando à substituição dos programas de controle por programas de erradicação (Bruce-Chwatt, 1980, Roll Back Malaria, 2008), que conseguiram interromper a transmissão em climas temperados e algumas áreas tropicais, levando a uma redução importante do número de casos e diminuição da morbidade e mortalidade. Porém na maioria dos países tropicais socioeconomicamente menos desenvolvidos, o programa defrontou-se com dificuldades financeiras e operacionais, não alcançando o mesmo êxito (WHO, 1971; 1974) e levando a Organização Mundial da Saúde (OMS) a modificar as estratégias para controle integrado em longo prazo, em 1973 (WHO, 1974).

Na década de 1980, a morbidade e mortalidade da malária começaram a aumentar devido a vários fatores, como resistência do mosquito aos inseticidas, resistência do parasito às medicações, enfraquecimento dos programas de controle devido à descentralização e integração a serviços de saúde locais sem recursos e crises humanitárias (Roll Back Malaria, 2008), levando à adoção da Estratégia Global de Controle da Malária em 1992 e à criação da parceria *Roll Back Malaria*

(RBM) para coordenar os esforços de combate à doença (WHO, 2010).

Em 2013, havia 97 países e territórios com transmissão de malária e sete, em fase de prevenção da reintrodução da doença, perfazendo um total de 104 países e territórios onde a malária é considerada endêmica (Figura 5). Globalmente, estima-se que 3,4 bilhões de pessoas estejam em áreas de risco. A OMS estima que 207 milhões de casos de malária tenham ocorrido em todo o mundo em 2012, com um total aproximado de 627 mil mortes, a maioria dos casos (80%) e de mortes (90%) ocorreu na África, sendo que 77% do total de mortes foram em crianças com menos de 5 anos de idade (WHO, 2013).

Figura 5 – Classificação dos países em relação à eliminação da malária

Fonte: <http://www.who.int/gho/malaria/en/>

1.6.2 Malária no Brasil

No Brasil, as atividades de combate à malária foram implementadas em 1923 (Brasil, 1999). Na década de 1940, estima-se que ocorriam seis milhões de casos anuais, sendo 85% do território nacional atingido pela doença (Brasil, 1983; Ladislau et al., 2006). Nos anos 60, como consequência da Campanha de Erradicação da Malária, ocorreu um decréscimo no número de casos, com uma média de 100.000

casos anuais (Brasil, 1999; 2004; Ladislau et al., 2006). A transmissão foi interrompida gradativamente nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e parte da Centro-Oeste. Porém, na Amazônia Legal (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), não se observou tal impacto (Brasil, 1999).

A partir da década de 70, com a implementação de programas de integração e desenvolvimento econômico da Amazônia Legal, houve um crescimento demográfico acentuado e desordenado na região, levando à ocorrência de epidemias de malária dispersas (Brasil, 2004; Ladislau et al., 2006), culminando com mais de 630.000 casos em 1999 (Brasil, 2007; Ladislau et al., 2006).

No decorrer dos anos, foi observada uma tendência de concentração progressiva da malária na Amazônia Legal (Figura 6), passando de 94,9% dos casos em 1980 para 99,5% em 2006 (Brasil, 2007). Observou-se também, um aumento do número de casos de malária por *P. vivax*, em relação a *P. falciparum*. Assim, em 1988, *P. falciparum* representava 50% dos casos. Em 1989, *P. vivax* foi responsável por 52% dos casos de malária. Essa porcentagem foi aumentando nos anos subsequentes, chegando a 80% em 1999 (Brasil, 2004).

Em 2013, foram notificados 178.207 casos, dos quais 143.734 foram por *P. vivax* (80,66%), 29.334 por *P. falciparum* (16,46%), 2.484 por *P. vivax* + *P. falciparum* (1,39%), 32 por *P. malariae* (0,018%) e um por *P. ovale* (0,00056%) (Brasil, 2014a).

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

Figura 6 – Mapa de risco por município de infecção – Brasil 2012

Baixo risco (IPA <10/1.000 hab.), médio risco (IPA entre 10 e 49/1.000 hab.), alto risco (IPA ≥50/1.000 hab.)

IPA = Incidência Parasitária Anual, que expressa o número de exames positivos de malária por mil habitantes em determinado lugar e período

Fonte: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/20/Mapa-de-risco-mal-ria-Brasil-2012.pdf>

1.6.3 Malária na Região Extra-Amazônica

A Região Extra-Amazônica não é considerada endêmica para malária (Brasil, 2007). Nas décadas de 60 e 70, o tratamento maciço e constante de casos interrompeu a transmissão de malária nessa região. Porém, fatores como vasta área coberta pela Mata Atlântica, presença do mosquito transmissor (Duarte et al., 2013), presença de símios infectados (Duarte et al., 2008; Yamazaki et al., 2011) e casos importados, tornam essas áreas vulneráveis à ocorrência de episódios da doença. Em 2011, a Região Extra-Amazônica apresentou um coeficiente de letalidade mais de cem vezes maior que o da Região Amazônica: 1,8% x 0,017% (Brasil, 2013a), devido principalmente à falha no diagnóstico e demora na instituição da terapia oportuna e correta.

Dados do boletim *on line* da Coordenação Geral do Programa Nacional de

Controle da Malária (Brasil, 2013c) relatam a ocorrência de aproximadamente 6.366 casos de malária confirmados (autóctones e importados) entre 2007 e 2012, sendo que no ano de 2010 ocorreu o maior número de casos (901) nessa região. Em 2012 e 2013, foram notificados 958 e 691 casos (Tabela 1), respectivamente, distribuídos pelos estados da Região Extra-Amazônica (Figura 7). Em relação à espécie de infecção, em 2013, 248 casos (35,9%) foram devidos a *P. falciparum* e infecções mistas e 443 (64,1%) a não falciparum. Uma justificativa para a elevada proporção de *P. falciparum* pode ser atribuída ao fato de que 43% dos casos notificados referem-se a infecções adquiridas fora do Brasil. Entre as UF da Região Extra-Amazônica, os Estados de São Paulo e Rio de Janeiro apresentaram o maior número de notificações de casos originados fora do Brasil (Figura 8).

Tabela 1 – Casos confirmados de malária por UF de notificação na Região Extra-Amazônica em 2012 e 2013

Estados	2012	2013
São Paulo	216	159
Rio de Janeiro	134	108
Minas Gerais	107	84
Piauí	73	51
Paraná	61	58
Goiás	81	32
Espírito Santo	53	54
Santa Catarina	46	33
Ceará	31	14
Distrito Federal	28	15
Mato Grosso do Sul	26	15
Pernambuco	21	17
Bahia	18	18
Rio Grande do Sul	17	12
Rio Grande do Norte	22	7
Paraíba	9	4
Alagoas	7	5
Sergipe	6	5
TOTAL	958	691

Fonte: Brasil, 2013c

Figura 7 – Casos confirmados de malária notificados na Região Extra-Amazônica por espécie parasitária em 2013
Fonte: Brasil, 2013c

Figura 8 – Casos confirmados de malária notificados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, por local de infecção em 2013
Fonte: Brasil, 2013c

Nos estados da Região Extra-Amazônica, principalmente os que possuem áreas com cobertura de Mata Atlântica, observa-se a ocorrência de casos de malária autóctone, ou seja, casos originados no local onde se manifestam e são notificados. No período de 1999 a 2006, os estados da Região Extra-Amazônica apresentaram uma média anual de 211 casos autóctones, com surtos localizados em alguns municípios da região. Esse quadro é preocupante, considerando que toda a Região Extra-Amazônica é receptiva para a transmissão de malária e os serviços de vigilância em saúde de alguns municípios são carentes de uma estrutura adequada para o enfrentamento do problema. O fluxo migratório da Região Amazônica para outros estados brasileiros possibilita o surgimento de surtos de malária, como os registrados em 2002, no Ceará, e em 2004, 2005 e 2006, no Piauí e Espírito Santo (Brasil, 2007).

Segundo o boletim *on line* da Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária (Brasil, 2013c), em 2012 e 2013 foram confirmados 188 casos autóctones, nos estados da Região Extra-Amazônica (Tabela 2).

Tabela 2 – Casos confirmados de malária autóctones por UF de notificação na Região Extra-Amazônica em 2012 e 2013

Estados	2012	2013
Espírito Santo	38	37
São Paulo	27	16
Piauí	13	14
Rio de Janeiro	4	10
Goiás	5	2
Mato Grosso do Sul	5	1
Bahia	3	2
Rio Grande do Norte	3	1
Ceará	1	1
Distrito Federal	1	1
Pernambuco	0	2
Paraná	0	1
TOTAL	100	88

Fonte: Brasil, 2013c

Em relação ao Estado de São Paulo, a malária autóctone ocorre na região da Serra do Mar, com cobertura do bioma Mata Atlântica, onde é detectada alta densidade de vetores do subgênero *Kerteszia* e ocorre transmissão persistente com casos de decurso clínico geralmente atípico, brando por *P. vivax* (Carvalho et al. 1985; 1988) e *P. malariae* (Curado et al., 1997), com parasitemias sempre muito baixas e de difícil detecção pela hemoscopia convencional (Couto et al., 2010). No restante do estado, principalmente nas regiões das bacias hidrográficas dos rios Paraná, Paranapanema e São José dos Dourados, encontram-se vetores do subgênero *Nyssorhynchus* e ocorrem surtos esporádicos, decorrentes, principalmente de fluxo de indivíduos infectados provenientes da região endêmica (Couto et al., 2010). Entre 1980 e 2007, foram registrados 821 casos autóctones, sendo 80,7% com baixas parasitemias e 91,6% na região leste, no bioma Mata Atlântica, onde houve maior número de infecções assintomáticas e por *P. vivax* em relação ao restante do estado. Considerando o período de 1994 a 2007, dos 364 casos notificados, 18% eram infecções assintomáticas (Couto et al., 2010).

No bioma Mata Atlântica do Estado de São Paulo, a baixa incidência de casos de malária, a presença de casos assintomáticos (Couto et al., 2010), a separação geográfica dos pacientes e os resultados sorológicos e moleculares sugerem a participação de reservatórios símios na transmissão (Yamasaki et al., 2011). Corroboram esta hipótese os estudos de Cochrane et al. (1990) e Fandeur et al. (2000) que, com base em evidências moleculares, consideram *P. brasilianum* e *P. malariae* uma mesma espécie. Do mesmo modo, *P. simium* tem sido identificado como *P. vivax* que circula em primatas do Novo Mundo (Li et al., 2001). Essa similaridade sugere a existência de uma possível situação zoonótica nessas regiões, em que os símios poderiam ser reservatórios para a malária humana e indicam a existência de relação entre a malária símia e a autóctone da Região Extra-Amazônica (Duarte et al., 2008; Yamazaki et al., 2011; Pina-Costa et al., 2014). Estudos de Tazi e Ayala (2011) sugerem que *P. simium* pode ter derivado de *P. vivax*, enquanto *P. malariae* pode ter derivado de *P. brasilianum*.

A malária autóctone associada ao bioma Mata Atlântica é conhecida como “*bromeliad-malaria*” (Zavortink, 1973), devido ao hábito do mosquito *An. (K.)*

cruzii, principal vetor de *Plasmodium* nessa área (Duarte et al. 2013), utilizar as coleções de água que se acumulam nas bromélias como locais de reprodução. Quatro áreas de transmissão de malária no Estado de São Paulo são importantes neste contexto: as costas norte e sul, o Vale do Ribeira e áreas da região metropolitana de São Paulo, cercadas pela Serra do Mar. A persistência da malária fora da Região Amazônica e sua associação a áreas com cobertura de Mata Atlântica foi confirmada pela detecção de mosquitos infectados por *P. vivax* e *P. malariae* no Vale do Rio Branco, área de proteção ambiental no Município de Itanhaém, SP (Neves et al., 2013) e no subdistrito de Parelheiros, periferia do Município de São Paulo, SP (Duarte et al., 2013).

Entre 2000 e 2013, foram diagnosticados 362 casos autóctones no estado (Brasil, 2014b). Nos últimos anos, os casos autóctones ocorreram nas regiões da grande São Paulo (Município de Juquitiba), Vale do Ribeira, Baixada Santista e Litoral Norte (Brasil, 2014b).

O Estado do Rio de Janeiro, embora caracterizado como área de transmissão interrompida de malária, tem notificado casos autóctones em regiões turísticas montanhosas e perto da Mata Atlântica (Costa et al., 2010; Brasil et al., 2013), onde as bromélias são abundantes e onde há mosquitos transmissores, *An. (K.) cruzii* e *An. (K.) bellator* (Revisão em Oliveira-Ferreira et al., 2010). Além disso, nas planícies costeiras, observa-se a presença do vetor do subgênero *Nyssorhynchus*, principalmente *An. darlingi*, bem como *An. aquasalis*, que tem mantido a introdução de casos esporádicos de malária e surtos (Revisão em Pina-Costa et al., 2014). Entre 2002 e 2010 foram notificados 808 casos, sendo 35 autóctones (Miguel et al., 2014).

Na região de Lumiar, distrito de Nova Friburgo, que recebe turistas e caminhoneiros da Amazônia, ocorrem casos autóctones anualmente desde 1993 (Veltri et al., 2011). Os casos de malária são detectados principalmente entre os visitantes que vão à floresta nas encostas. Entre 2001 e 2008, foram relatados nove casos em Nova Friburgo. Em Guapimirim, região turística perto da Mata Atlântica, foram descritos casos a partir de 2008, nas localidades de Garrafão e Monte Olivette. Em Sana, distrito de Macaé, desde 2011, são identificados casos que ocorrem perto

da floresta virgem e longe da área turística (Brasil et al., 2013). Em Nova Friburgo e Sana o vetor incriminado na transmissão é *An. (K.) cruzii*. Outros casos isolados também ocorreram nos municípios de Cachoeiras de Macacu, Teresópolis e Sapucaia (Revisão em Pina-Costa et al., 2014).

Segundo o boletim *on line* da Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária (Brasil, 2013c), em 2012 e 2013 foram notificados 242 casos, com três e 10 casos autóctones do Estado do Rio de Janeiro, respectivamente.

1.7 Infecções assintomáticas

A infecção por *Plasmodium* apresenta um fenótipo clínico bem variável, desde casos assintomáticos até doença grave fatal. Espécie de *Plasmodium*, infecções prévias e imunidade desempenham papel importante na definição da clínica. A infecção assintomática por *Plasmodium* é comum em áreas de alta transmissão da África e sudeste da Ásia, onde os moradores estão continuamente expostos ao parasito (Owusu-Agyei et al., 2002; Singh et al., 2014). Foi descrita em moradores de Papua Nova Guiné já em 1900 por Robert Koch (Harrison, 1978). Desde então, este fenômeno vem intrigando os pesquisadores e, apesar do grande número de estudos realizados, principalmente na África e Sudeste da Ásia, há muitas questões para serem respondidas. A maior parte dos resultados refere-se a infecções assintomáticas por *P. falciparum*, embora estejam aumentando os relatos de infecção assintomática por *P. vivax* (Coura et al., 2006).

No Brasil, as infecções assintomáticas por *P. vivax* foram descritas em Santa Catarina em 1971 (Jones et al., 1971). Na Região Amazônica, a infecção assintomática foi relatada mais recentemente. Entre garimpeiros infectados em Mato Grosso, foram relatados 70% de assintomáticos (Andrade et al., 1995; Oliveira et al., 1995). Entre a população nativa de Rondônia, foram detectadas infecções assintomáticas, em uma proporção quatro a cinco vezes maior que malária sintomática, respectivamente, 20% e 4,6% em Portuchuelo e 49,5% e 10% em Jiparaná (Alves et al., 2002). Em populações residentes às margens do rio Negro no Amazonas, encontrou-se 72,4% de assintomáticos, dos quais 31,3% assim

continuaram por 30 dias, e 25% por 150 dias de seguimento (Ladeia-Andrade, 2005), e 20,4% de infecções assintomáticas por *P. vivax*, que não apresentaram sintomas nos seis meses anteriores ou posteriores ao exame (Suárez-Mutis et al., 2006).

É necessário que esses resultados de altos índices de infecção assintomática no Brasil sejam analisados com cuidado, pois não há um critério homogêneo para definir o que seja infecção assintomática. Além disso, alguns estudos se baseiam no resultado da PCR no diagnóstico inicial, sem considerar outros fatores, como presença de sintomas dias antes da coleta, emprego de antimaláricos, seguimento dos indivíduos e espécie de *Plasmodium*, pois alguns pacientes podem estar no período pré-patente (Coura et al., 2006).

Infecções assintomáticas também são relatadas em áreas não endêmicas, como no Estado de São Paulo em que no período de 1980 a 2007, foram constatadas 9,6% entre os casos autóctones, enquanto que entre 1994 a 2007 dos 364 casos notificados, 18% eram infecções assintomáticas (Couto et al., 2010).

A detecção e tratamento de casos assintomáticos em áreas de transmissão, independentemente do nível de endemicidade, representa um desafio para as estratégias de controle da transmissão natural da doença, pois portadores assintomáticos podem servir como fonte de infecção (Alves et al., 2005) para os vetores, permitindo a disseminação da endemia. Além disso, há o risco de malária transmitida por transfusão sanguínea (MTT).

1.8 Malária transmitida por transfusão

Casos de malária induzidos por transfusão sanguínea, uso compartilhado de agulhas contaminadas e por via congênita no momento do parto (Revisão em Di Santi e Boulos, 1999) fazem parte da realidade das regiões endêmicas e não endêmicas.

O primeiro incidente relatado de infecção transmitida por transfusão refere-se à malária (Kitchen e Chiodini, 2006) e o primeiro caso de MTT foi relatado em 1911 (Woolsey, 1911), permanecendo no contexto mundial como uma das infecções transfusionais mais comuns (Kitchen e Chiodini, 2006). Segundo Wylie (1993), a

MTT 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 3 semanas, sendo que um inóculo estimado de um a 10 parasitos por unidade de sangue nas transfusões é capaz de transmitir a infecção (Hutton e Shute, 1939; Grant et al., 1960; Seed et al., 2005a).

Em países endêmicos, a ocorrência de MTT pode contribuir para a disseminação da doença em áreas com transmissão ativa. Estudos realizados no Continente Africano revelam que a MTT é altamente prevalente em doadores de sangue. Infecções assintomáticas ou com sintomatologia branda, aliadas à falta de ensaios de triagem adequados nos Bancos de Sangue reduzem a eficiência da seleção dos doadores e limitam o diagnóstico e prejudicam a segurança das transfusões (Tagny et al., 2007). Na África Subsaariana, a prevalência de MTT entre 1980 e 2009 foi de 10,2% e países como a Nigéria tiveram 55,0% de positividade (Owusu-Ofori et al., 2010). Em Camarões, 6,5% dos doadores tinham infecção por *Plasmodium sp* (90,6% por *P. falciparum* e 9,4% por *P. malariae*) (Noubouossie et al., 2012). Entretanto, mesmo que se dispusesse de métodos adequados para triagem dos doadores nessas áreas, a rejeição dos positivos colocaria em risco o suprimento de sangue (Owusu-Ofori et al., 2010).

Países não endêmicos têm discutido medidas para prevenção da MTT. Em alguns países, doadores que tenham tido malária no passado, vivido ou viajado para áreas endêmicas são excluídos definitivamente da doação. Em outros, a elegibilidade da doação é restaurada se não forem detectados anticorpos após o período estabelecido de rejeição do doador (Muerhoff et al., 2008; Reesink et al., 2010; Seed et al., 2010).

Desde 1986, a França vem adotando a auto-exclusão, questionário, entrevista clínica e triagem sorológica como estratégia na seleção de doadores, levando à redução de cinco a 10 vezes no número de casos de MTT. De acordo com as redes de hemovigilância da França, nenhum caso de MTT foi decorrente de falhas nos testes sorológicos (Garraud et al., 2008). Austrália, Reino Unido, Dinamarca, Finlândia e

Nova Zelândia também utilizam como rotina a triagem sorológica para malária em doadores de risco (Reesink et al., 2010; Seed et al., 2010). Os casos de sorologia positiva são confirmados por testes rápidos na Nova Zelândia e por NAT (testes para ácidos nucleicos) no Reino Unido, onde não houve nenhum caso de MTT nos últimos cinco anos (Reesink et al., 2010). Bancos de Sangue de vários países não endêmicos vêm estudando a adoção da sorologia para malária (Garraud et al., 2008). Na Turquia, onde a triagem para malária dos doadores é realizada através de questionário, 97% das rejeições foram consideradas desnecessárias, por um estudo que sugere a implementação de teste sorológico para malária na triagem dos doadores (Değirmenci et al., 2012).

Nos últimos 15 anos, vários casos de MTT foram relatados em países ou áreas não endêmicas, sendo, quatro no Brasil (Di Santi et al., 2005; Kirchgatter et al., 2005; Reesink et al., 2010; Scurachio et al., 2011); três na França (Garraud et al., 2008; Reesink et al., 2010; Vareil et al., 2011); dois na Itália (Reesink et al., 2010) e um caso em cada um dos seguintes países: República da Coreia (Lee et al., 2001); Suíça (Frey-Wettstein et al., 2001); Reino Unido (Kitchen et al., 2005); Turquia (Vareil et al., 2005); Índia (Chauhan et al., 2009); Estados Unidos (Reesink et al., 2010); Colômbia (Echeverri et al., 2012); Holanda (Brouwer et al., 2013); Malásia (Anthony et al., 2013) e China (Ruan et al., 2014). As espécies mais frequentemente associadas com os casos transfusionais são *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*. Os doadores implicados neste tipo de transmissão são invariavelmente assintomáticos, semi-imunes, com níveis de parasitemia abaixo do limiar de detecção dos testes disponíveis.

No Brasil, a Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013, publicada no Diário Oficial da União nº 221, de 13 de novembro de 2013, Seção 1, página 106, que redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos (Brasil, 2013b) define uma política distinta para a doação de sangue na Amazônia Legal, endêmica, e o restante do país, considerado não endêmico. *“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. Em áreas endêmicas com antecedentes epidemiológicos de malária, considerar-se-á inapto o candidato que tenha tido malária nos 12 (doze) meses que antecedem a doação; com febre ou*

suspeita de malária nos últimos 30 (trinta) dias; e que tenha se deslocado ou procedente de área de alto risco (IPA maior que 49,9) há menos de 30 (trinta) dias. 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. Em áreas não endêmicas de malária, considerar-se-á apto o candidato: 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; procedente de Municípios localizados em áreas endêmicas, após 12 (doze) meses do deslocamento, sem necessidade de realização de testes de detecção; e que tenha manifestado malária após 12 (doze) meses do tratamento e comprovação de cura. Independentemente da endemicidade da área, será considerado inapto definitivo o candidato que teve infecção por Plasmodium malariae (Febre Quartã). Em casos de surtos de malária, a decisão quanto aos critérios de inaptidão deve ser tomada após avaliação conjunta com a autoridade epidemiológica competente”. Segundo o 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”.

Nas áreas não endêmicas do Brasil, os 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 paciente com malária, devido a falhas de informação por parte do candidato à doação (Kitchen e Chiodini, 2006). Além disso, o escasso conhecimento sobre a malária em áreas sem transmissão ativa e a desinformação com relação à distribuição geográfica da malária podem determinar equívocos na triagem epidemiológica através de questionários (Sáez-Alquézar et al., 1998).

A alta prevalência de infecções assintomáticas relatada por diferentes grupos no Brasil é extremamente preocupante em relação à MTT, pois os portadores assintomáticos são a principal fonte de malária transfusional (Kaur e Basu, 2005). Como nesses casos a densidade de parasitos é muito baixa, a gota espessa não é o método de escolha para a triagem de doadores (Contreras et al., 1999). Como

resultado da persistência assintomática dos parasitos, foi documentada a transmissão 44 anos após a última exposição por *P. malariae*, 5 anos por *P. vivax* e 8 anos por *P. falciparum* (Mungai et al., 2001; Kitchen et al., 2005).

No Estado de São Paulo, nos quatro acidentes transfusionais relatados, portadores assintomáticos com deslocamentos por regiões de Mata Atlântica doaram sangue, resultando em contaminação dos receptores e um óbito por *P. malariae* (Kirchgatter et al., 2005; Costa-Nascimento et al., 2006, resumos; Scurachio et al., 2011), mostrando a necessidade de estudos que possam determinar a prevalência de marcadores específicos para malária em candidatos à doação de hemocomponentes.

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.

1.9 Imunidade na malária

Os mecanismos da imunidade na malária são complexos, espécie e estágio-específicos (Stanisic et al., 2013). Em áreas de transmissão estável, os indivíduos desenvolvem uma imunidade clínica gradual que depende da duração da transmissão, da exposição a variantes antigênicas e da maturação do sistema imune (Schofield e Mueller, 2006). Em adultos, exceto gestantes, observa-se uma imunidade não esterilizante, com parasitemia baixa e ausência de sintomas (Langhorne et al., 2008). Em áreas de transmissão instável, geralmente não se observa a imunidade clínica, todos os grupos etários estão sujeitos à doença clínica, mesmo quando a parasitemia é baixa, podendo ocorrer epidemias.

O desenvolvimento e a manutenção da imunidade clínica protetora requerem infecções repetidas durante a vida do indivíduo, não apenas para a geração de células efectoras e de memória, mas também para sua persistência (Langhorne et al., 2008). Mecanismos efetores da resposta imune inata e adaptativa podem limitar o pico de parasitemia, impedir a patologia severa e reduzir a carga de células parasitadas circulantes. Porém, não eliminam a infecção completamente, levando a parasitemia baixa persistente, que frequentemente está abaixo do nível de detecção da gota espessa, mas que pode persistir por muitos meses ou anos (Stevenson e Riley, 2004).

Na malária não se observa a imunidade esterilizante (Stanisic et al., 2013; Souza, 2014).

A imunidade efetiva parece requerer a participação da resposta humoral e celular, provavelmente, em cooperação. Entretanto, a importância relativa de cada uma delas carece de esclarecimento. Embora as respostas sejam dirigidas principalmente aos estágios eritrocitários do parasito, os esporozoítos e hepatócitos infectados também parecem ser importantes (Beeson et al., 2008). Os possíveis mecanismos efetores da resposta imune a *Plasmodium* encontram-se no quadro 1 (Beeson et al., 2008; Langhorne et al., 2008).

A importância dos anticorpos na imunidade protetora foi reconhecida em estudos de transferência passiva de IgG purificada de adultos imunes para crianças com malária aguda, resultando em diminuição da febre e parasitemia (Cohen et al., 1961). Embora anticorpos de diferentes isotipos possam ser protetores, IgG é o mais importante (Perlmann e Troye-Blomberg, 2002). Entretanto, a natureza da resposta imune inata e adaptativa que promove a aquisição e a especificidade antigênica do IgG protetor, bem como os mecanismos pelos quais outros componentes dos sistemas inato e adaptativo contribuem para a proteção à malária em humanos, ainda permanecem incertos (Langhorne et al., 2008; Tran et al., 2012).

A longevidade da resposta humoral na ausência de infecção é pouco compreendida, pois tem sido observadas respostas de curta e longa duração, sendo as de curta duração mais frequentes em crianças mais jovens. Não se sabe se a curta duração desses anticorpos reflete deficiência na indução e manutenção da resposta das células B, ou aquisição gradual da resposta imune primária contra as múltiplas cepas (Stanisic, 2013).

Estudos populacionais mostram que a imunidade a *P. vivax* é adquirida mais rapidamente do que a *P. falciparum*, independentemente da intensidade de transmissão, resultando em pico de malária por *P. vivax* em grupos etários mais jovens; entretanto os mecanismos são pouco compreendidos (Mueller et al., 2013).

Estágio do parasito	Resposta humoral	Resposta celular
Esporozoítos	Anticorpos anti-esporozoítos neutralizam esporozoítos e/ou bloqueiam a invasão dos hepatócitos	Fagocitose ou citotoxicidade por macrófagos e neutrófilos Células T CD4+ <i>helper</i> de células B
Hepatócitos infectados	Anticorpos parecem ter pouca função	Citotoxicidade por células <i>natural killer</i> (NK), células T <i>natural killer</i> (NKT) e células T $\gamma\delta$ Morte de parasitos por ação de IFN- γ Lise de hepatócitos infectados por ação de células T CD8+
Merozoítos	Anticorpos anti-merozoítos inibem a invasão de eritrócitos e a replicação do parasito Anticorpos opsonizam os merozoítos facilitando a fagocitose por células mononucleares	Fagocitose de merozoítos opsonizados e não-opsonizados Células T CD4+ auxiliam na formação de citocinas pró-inflamatórias Células T CD4+ <i>helper</i> de células B TNF- α e IFN- γ ativam macrófagos a fagocitar e/ou matar merozoítos
Eritrócitos infectados	Anticorpos opsonizam eritrócitos infectados para fagocitose e/ou lise mediada pelo complemento e/ou bloqueio de adesão dos eritrócitos ao endotélio vascular Anticorpos anti-GPI neutralizam as toxinas do parasito e impedem a indução de inflamação excessiva	Fagocitose de eritrócitos infectados opsonizados e não-opsonizados Células T CD4+ auxiliam na formação de citocinas pró-inflamatórias Células T CD4+ <i>helper</i> de células B TNF- α e IFN- γ ativam macrófagos a fagocitar e/ou matar eritrócitos infectados

Quadro 1 – Mecanismos da imunidade efetora a *Plasmodium*

Fonte: Beeson et al., 2008; Langhorne et al., 2008

1.10 Pesquisa de anticorpos na malária

Na malária, os anticorpos específicos são dirigidos contra antígenos dos diferentes estágios do plasmódio. A pesquisa de anticorpos anti-esporozoítos permite determinar as taxas de inoculação de mosquitos e estudar a evolução desses anticorpos correlacionando com proteção e diversidade individual da resposta imune (Revisão em Moraes et al., 2013). Anticorpos anti-gametas aumentam com o tempo de exposição aos gametócitos, têm vida média de aproximadamente três meses e apresentam atividade de redução da transmissão (Bousema et al., 2010).

A pesquisa de anticorpos anti-formas do estágio eritrocitário (assexuado) pode ter diferentes aplicações. Em regiões endêmicas, pode ser útil para medir o grau de endemicidade da doença, delinear as zonas com transmissão, avaliar a eficiência de medidas de controle, complementar métodos malariométricos convencionais

(tendências em longo prazo e mudanças de transmissão) (Brasil, 1998; Fowkes et al., 2010). Em áreas não endêmicas, suas principais indicações estão na triagem de doadores em bancos de sangue, na elucidação de casos clínicos indefinidos, na malária críptica e na detecção de assintomáticos (Warhurst e Williams, 1996).

Indivíduos que residiram em áreas endêmicas e que contraíram malária por repetidas vezes possuem níveis de anticorpos elevados, que podem perdurar por longos períodos de tempo mesmo após a cura. Por isso, a detecção desses anticorpos é um indicador de infecção, embora nem sempre se correlacione com parasitemia, o que dificulta sua utilização no diagnóstico de rotina da malária (Revisão em Moraes et al., 2013).

Os testes para a pesquisa de anticorpos contra os estágios eritrocitários tiveram um grande avanço com o desenvolvimento da cultura *in vitro* de *P. falciparum*, pois até esse momento eram utilizados antígenos obtidos de pacientes infectados ou de animais com infecção por espécies heterólogas. A produção de peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes contra determinantes antigênicos de diferentes estágios da maioria das espécies de *Plasmodium* que infectam o homem abriram um novo campo nos testes para a pesquisa de anticorpos (Revisão em Moraes et al., 2013).

O teste de imunofluorescência indireta (IFI) foi considerado durante muito tempo referência na pesquisa de anticorpos na malária (Sanchez et al., 1987; Ferreira e Sanchez, 1989). Como alternativa à IFI, o teste imunoenzimático (*Enzyme-linked immunosorbent assay* - ELISA), foi utilizado para malária por Voller e Drapper (1982). Podem ser empregados extratos de antígenos plasmodiais somáticos das hemácias infectadas solubilizados com diferentes reagentes (Sanchez et al., 1993; Ávila et al., 1998; Coelho et al., 2007), antígenos recombinantes (Medeiros et al., 2013; Riccio et al., 2013; Coelho et al., 2007) e peptídeos sintéticos de proteínas específicas do estágio eritrocítico (Graves et al., 1992; Nebie et al., 2009).

1.11 Proteína 1 de superfície do merozoíto (MSP1)

Entre os diferentes antígenos recombinantes que têm sido utilizados na pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium*, destaca-se a MSP1, que está presente em

todas as espécies de *Plasmodium* (Holder, 1988; Hirunpetcharat et al., 1997). É o principal antígeno de superfície do estágio sanguíneo e, sendo alvo primário do sistema imune do hospedeiro, os anticorpos que reconhecem a MSP1, normalmente estão presentes nas infecções por *Plasmodium* (Birkenmeyer et al., 2008).

Estudos feitos em *P. falciparum* mostraram que a MSP1 (*Pf*MSP1) é uma glicoproteína com aproximadamente 200 kDa que é sintetizada durante a esquizogonia como uma proteína única presa à membrana plasmática do parasito por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), sendo clivada em quatro fragmentos principais, MSP1₈₃, MSP1₂₈, MSP1₃₈ e MSP1₄₂, que ficam presos na superfície do parasito, pelo fragmento de 42 kDa ligado à porção GPI C-terminal (MSP1₄₂). Quando o merozoíto é liberado, o fragmento MSP1₄₂ ligado à membrana sofre uma clivagem proteolítica secundária em que o fragmento MSP1₃₃ da região N-terminal é liberado junto com o restante do complexo (Blackman e Holder, 1992), enquanto o fragmento MSP1₁₉ da região C-terminal permanece na superfície do merozoíto durante a invasão e é carregado para a nova hemácia invadida (Blackman et al., 1990; 1991; 1994). Os merozoítos de *P. vivax* expressam uma proteína de superfície equivalente à *Pf*MSP1, conhecida como *Pv*MSP1 (Del Portillo et al., 1991). Foi proposto que o seu mecanismo de processamento é semelhante ao da *Pf*MSP1 (Figura 9) (Arévalo-Herrera e Herrera, 2001; Babon et al., 2007).

A partir da determinação da estrutura primária dos genes que codificam *Pf*MSP1 e *Pv*MSP1, várias proteínas recombinantes, baseadas nas sequências que codificam as regiões N ou C-terminais da molécula, foram expressas em diferentes vetores (Chappel e Holder, 1993; Kaslow et al., 1994; Kumar et al., 2000; Morgan et al., 2000; O'Donnell et al., 2001; Cunha et al., 2002; Soares e Rodrigues, 2002; Sachdeva et al. 2004).

Figura 9 – Modelo proposto para MSP1 na superfície de *P. vivax*
 Fonte: Babon et al., 2007

Os genes MSP1 de *P. malariae* e *P. ovale* foram clonados e sequenciados mais recentemente a partir do isolamento das formas infectantes do sangue de doadores de Camarões (Birkenmeyer et al., 2008; 2010). O tamanho desses genes é semelhante ao de outras espécies de *Plasmodium* e esses genes codificam proteínas com domínios interespecie conservados. A porcentagem de identidade entre a sequência de aminoácidos da MSP1 de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* variou entre 44% e 58% (Birkenmeyer et al., 2010).

Estudos em Bancos de Sangue têm utilizado a MSP1 isoladamente ou em combinação com outros antígenos no teste ELISA para investigar a prevalência de anticorpos em doadores de sangue de regiões não endêmicas e endêmicas (Kitchen et al., 2004; Seed et al., 2005a; Seed et al., 2005b; Elghouzzi et al., 2008; Oh et al., 2008; Nam et al., 2010; Grande et al., 2011; Faddy et al., 2013; Freimanis et al., 2013), chegando a conclusões variáveis quanto à utilidade para minimizar o risco de MTT, sem comprometer o suprimento de sangue.

As porções relativamente conservadas da região C-terminal da MSP1 (MSP1₁₉, MSP1₃₃ e MSP1₄₂) possuem epítomos imunodominantes, o que as torna componentes importantes para o desenvolvimento de vacinas (Good, 2005) e testes sorológicos (Birkenmeyer et al., 2008).

1.11.1 MSP1₁₉

MSP1₁₉ parece ser funcionalmente conservada entre as espécies de *Plasmodium* (O'Donnell et al., 2001). Estudos empregando PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉ demonstraram que é a porção mais imunogênica da MSP1 e que os anticorpos específicos estão associados com episódios recentes de malária (Soares et. al., 1999; Morais et. al., 2005; Akpogheneta et al., 2008) e desempenham um importante papel na imunidade à doença (Rosa et al., 2006; Bargieri et al., 2008; 2010; Lazarou et al., 2009), sendo a única região da MSP1 capaz de ter efeito de reforço nas reinfecções (Nogueira et al., 2006) e uma das subunidades mais estudadas como candidata à vacina (Hirunpetcharat et al., 1997; Planson et al., 2013). Altos níveis de IgG1 anti-MSP1₁₉ foram preditores de risco reduzido de sintomas e altas parasitemias por *P. falciparum*, na Papua Nova Guiné (Stanisic et al., 2009). Em relação à longevidade dos anticorpos anti-MSP1₁₉ na ausência de infecção, observam-se respostas de longa (Wipasa et al., 2010) e curta duração, que são mais frequentes em crianças mais jovens (Kinyanjui et al., 2007).

Vários estudos mostram correlação positiva entre anticorpos anti-MSP1₁₉ e parasitemia (Branch et al., 1998), malária clínica (Shai et al., 1995), malária na gravidez (Taylor et al., 2004) e indicam que a associação entre os níveis de IgG anti-MSP1₁₉ obtidos por ELISA e proteção à doença pode ser um marcador de imunidade protetora (Wilson et al., 2011). Recentemente, foi proposto que esses anticorpos podem mediar a inibição do crescimento dos parasitos por, pelo menos, três mecanismos: inibição do processamento da MSP1, inibição direta da invasão e inibição do desenvolvimento do parasito após a invasão (Moss et al., 2012). Entretanto, há controvérsias, pois outros relatos sugerem que esses anticorpos não têm papel importante na proteção (Dodoo et al., 1999; Kitua et al., 1999).

A utilidade do emprego dos antígenos recombinantes PvMSP1₁₉ e PfMSP1₁₉ foi relatada em estudos epidemiológicos, para estimar a intensidade e variações na transmissão (Stewart et al., 2009; Oduro et al., 2013), principalmente quando os níveis de parasitemia são baixos (Cook et al., 2010).

Empregando o teste ELISA com PvMSP1₁₉, na pesquisa de anticorpos IgG em pacientes primo-infectados por *P. vivax*, Rodrigues et. al. (2003) e Kudó (2006)

obtiveram sensibilidade de 90,9% e 95,9%, respectivamente. Em estudo realizado no Gabão, Aubouy et al. (2007) encontraram 92,0% e 95,8% de positividade no teste ELISA com *PfMSP1₁₉*, em crianças com malária não grave. Em Sri Lanka, o teste ELISA com *MSP1₁₉* foi positivo 100% dos 47 pacientes com diagnóstico microscópico positivo (Fernando et al., 2013).

A avaliação da *MSP1₁₉* de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* em teste imunoenzimático empregando painel com 24 amostras de pacientes com gota espessa positiva, para uma dessas quatro espécies de plasmódio, mostrou 100% de sensibilidade. Por outro lado, o teste ELISA de referência que utiliza *P. falciparum* e *P. vivax* deixou de detectar dois pacientes com *P. malariae* e três com *P. ovale* (Muerhoff et al., 2008; 2010). Coffey et al. (2008) relataram a utilização desses antígenos na triagem de 212 doadores residentes em Camarões, obtendo uma positividade de 99,53%, contra 96,70% do ELISA comercial, utilizado como referência. Esses estudos demonstram o aumento da eficiência na detecção de anticorpos na malária quando se empregam as espécies de *Plasmodium* que ocorrem na região estudada.

Com base no exposto nos parágrafos anteriores, nossa proposta foi padronizar e validar um teste imunoenzimático ELISA, para pesquisa de anticorpos IgG empregando *MSP1₁₉* de *P. vivax* e aplicá-lo em amostras coletadas em serviços de hemoterapia de áreas não endêmicas para malária. Espera-se fornecer significativa contribuição através dos resultados de soroprevalência obtidos, que podem dar subsídio quanto ao risco potencial de transmissão de malária por via transfusional em regiões não endêmicas, e da disponibilização de teste sorológico sensível e específico como alternativa para a triagem de doadores de Bancos de Sangue em áreas não endêmicas para malária.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Geral

Padronizar e validar teste ELISA, para pesquisa de anticorpos IgG anti-MSP1₁₉ de *P. vivax* e aplicá-lo em amostras coletadas em serviços de hemoterapia de áreas não endêmicas para malária.

Específicos

1. Produzir antígeno recombinante MSP1₁₉ de *P. vivax*.
2. Padronizar o teste imunoenzimático ELISA empregando MSP1₁₉ de *P. vivax*, para pesquisa de anticorpos IgG específicos em amostras de soros caracterizadas.
3. Validar o teste padronizado empregando três lotes do recombinante.
4. Investigar a soroprevalência de anticorpos anti-*Pv*MSP1₁₉ em doadores de sangue de serviços hemoterápicos de áreas não endêmicas para malária.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Para a padronização e validação do teste, foi utilizado um painel de referência com 466 amostras de soro humano, sendo 197 de pacientes com gota espessa positiva para *P. vivax* (primoinfectados e várias malárias); 168 positivas para anticorpos heterólogos ou outras patologias, a saber, mononucleose infecciosa (N=21), fator reumatoide (N=30), fator antinúcleo (N=10), sífilis (N=29), doença de Chagas (N=34), leishmaniose (N=44); 101 amostras de controles sadios, coletadas de indivíduos sem deslocamento para área endêmica e sem relato de malária anterior (Hemocentro de São Paulo). Essas amostras estão estocadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) e fazem parte da Teca de Soros Humanos, sob a responsabilidade da Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez.

Para os ensaios clínicos, foram utilizadas 1.974 amostras de soro humano, cedidas pelo Dr. Silvano Wendel, provenientes de serviços hemoterápicos dos estados de São Paulo (N=1.309) e Rio de Janeiro (N=665), atualmente estocadas no IMT. As amostras foram coletadas após triagem clínica, sempre que o candidato fosse considerado apto à doação e assinasse o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1).

3.2 Aspectos éticos da pesquisa

As amostras de sangue armazenadas foram colhidas em projetos anteriores, todos devidamente aprovados por Comitês de Ética de Pesquisa das Instituições envolvidas. Foram mantidos todos os cuidados necessários em relação aos aspectos éticos da conservação e utilização corretas do material biológico estocado, bem como das informações obtidas a partir dele e garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos originariamente envolvidos.

As 1.974 amostras dos serviços hemoterápicos, que fazem parte das 13.383

amostras de soro cedidas pelo Dr. Silvano Wendel, foram coletadas mediante Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do doador para a realização de pesquisas em Doença de Chagas e pesquisas afins (ANEXO I), como determinado pela Resolução número 347 da CONEP, de 13/01/2005 (Brasil, 2005b).

Em relação as 466 amostras de soro padrão e painéis de referência que estão estocados na Soroteca de Malária do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT, não existe a possibilidade de contato com os indivíduos para obtenção de TCLE para a utilização do material armazenado em nova pesquisa, como determinado pela Resolução 347 (Brasil, 2005b).

Este estudo foi aprovado *ad-referendum* pela CAPPesq em 18/09/2012 como subprojeto do Protocolo de Pesquisa nº 0339/08, intitulado “Estudo retrospectivo para avaliação do risco de malária transfusional em diferentes áreas geográficas do Brasil: avaliação sorológica em amostras de banco de sangue”.

3.3 Padronização da produção da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉

Os experimentos iniciais para a produção da proteína recombinante basearam-se na metodologia descrita por Cunha et al. (2002) e Rodrigues, et al. (2003). A partir dos resultados obtidos, foram feitas alterações e testadas metodologias descritas por outros autores, a fim de se adequar os experimentos considerando os padrões e estrutura do laboratório onde este trabalho foi desenvolvido. Basicamente, as alterações foram relativas às condições de purificação. Quando se empregou imidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), na purificação, o produto obtido encontrava-se em condições nativas (N). Na utilização de ureia, o produto obtido encontrava-se em condições desnaturantes (D).

3.3.1 Protocolo 1 (Cunha et al., 2002; Rodrigues et al., 2003)

A partir do plasmídeo pET14b-Hi6-PvMSP1₁₉, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Irene da Silva Sores (Cunha et al., 2002), foi feita transformação em *E. coli* DH5 α por choque térmico para expansão e estocagem. Em seguida, foi

realizada uma segunda transformação, também por choque térmico, em *E. coli* BL21(DE3), para expressão proteica e subsequente purificação. Colônias isoladas de *E. coli* BL21-(DE3) obtidas após transformação com o plasmídeo pET14b-*PvMSP1*₁₉ foram cultivadas a 37°C em 500 mL de meio LB (Luria Bertani), contendo ampicilina a 100 µg/mL, marcador de seleção do plasmídeo. Quando a densidade óptica (DO) a 600 nm atingiu o intervalo entre 0,6-0,8, a expressão proteica foi induzida com 1 mM de IPTG (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 4 horas, e a cultura foi centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos a 4°C. As bactérias contidas no *pellet* foram lisadas em tampão de sonicação pH 7,0 (NaH₂PO₄ 57,5 mM e NaCl 128,7 mM) contendo 0,4 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1 mM de PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), utilizando disruptor ultrassônico. Após centrifugação, o sobrenadante do lisado de bactérias foi aplicado em coluna contendo resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, Reino Unido), equilibrada com tampão de sonicação sem PMSF (NaH₂PO₄ 57,5 mM, NaCl 128,7 mM). A eluição foi feita com tampão de lavagem pH 6,0 (NaH₂PO₄ 57,5 mM, NaCl 128,7 mM e glicerol 10%) contendo imidazol nas concentrações 0, 30, 100, 200 e 400 mM. As alíquotas coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) a 12%.

3.3.2 Protocolo 2

Neste protocolo, foi utilizada a linhagem de *E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), cujas colônias, após transformação com o plasmídeo pET14b-*PvMSP1*₁₉ por polietilenoglicol (PEG), foram cultivadas a 37°C em 500 mL de meio LB (Luria Bertani), contendo ampicilina a 100 µg/mL, marcador de seleção do plasmídeo e cloranfenicol a 50 µg/mL, marcador de seleção da *E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL. Quando a densidade óptica a 600 nm atingiu o intervalo entre 0,6-0,8, a expressão proteica foi induzida com IPTG 1 mM por 3 horas e a cultura foi centrifugada a 3.000 x g por 20 minutos a 4°C.

O protocolo testado apresentou também as seguintes modificações em relação

ao anterior:

- a) A lise das bactérias foi realizada em tampão Tris-HCl 20 mM contendo imidazol 10 mM, 0,4 mg/mL de lisozima e PMSF 1 mM;
- b) Para equilíbrio da coluna, utilizou-se Tris-HCl 10 mM e as proteínas foram eluídas em tampão Tris-HCl 20 mM contendo 30, 100, 200 e 500 mM de imidazol.

As alíquotas coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 12%.

3.3.3 Protocolo 3 (*ProBond™ Purification System*)

Este protocolo seguiu as mesmas condições de transformação e indução proteica do **item 3.3.2**. Para lise e purificação, utilizou-se o kit *ProBond™ Purification System* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), testando as condições nativas e desnaturantes descritas.

- a) Condições Nativas: para lise celular, a cultura de 500 mL foi centrifugada a 3.000 x g por 5 minutos e ressuspendida em tampão contendo NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM. Após sonicação em disruptor ultrassônico, a cultura foi novamente centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante utilizado para a purificação da proteína recombinante. Para a purificação, utilizou-se o mesmo tampão de lise, variando as concentrações de imidazol entre 10 mM (*Native Binding Buffer*), 20 mM (*Native Wash Buffer*) e 250 mM (*Native Elution Buffer*), todos em pH 8,0. As alíquotas coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 15%;
- b) Condições Desnaturantes: para lise celular, os 500 mL de cultura foram centrifugados a 3.000 x g por 5 minutos e o *pellet* celular ressuspendido em tampão contendo cloridrato de guanidina 6 M, NaH₂PO₄ 20 mM e NaCl 500 mM. Após sonicação em disruptor ultrassônico, a cultura foi novamente centrifugada a 3.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para purificação. Para purificação proteica, utilizou-se tampão contendo ureia 8 M, NaH₂PO₄ 20 mM e NaCl 500 mM, variando o pH das soluções entre 7,8 (*Denaturing Binding Buffer*), 6,0 e 5,3 (*Denaturing Wash Buffer*) e 4,0

(*Denaturing Elution Buffer*). As alíquotas coletadas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 12%.

3.3.4 Protocolo 4

Este protocolo seguiu as condições de transformação e indução proteica descritas no **item 3.3.1**. A metodologia de lise e purificação baseou-se no protocolo do kit *ProBond™ Purification System* para condições desnaturantes, sendo os tampões de lise e purificação preparados *in house* devido ao elevado custo do kit. As bactérias foram lisadas em tampão contendo guanidina 6M empregando disruptor ultrassônico e o sobrenadante utilizado para purificação foi purificado em coluna *Ni Sepharose 6 Fast Flow*. Para lavagens e eluição proteica, utilizou-se ureia 8M.

As alíquotas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 12% e as que continham a fração de 19 kDa foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 10mM e 0,1% de Triton X-100.

3.3.5 Protocolo 5

Este protocolo seguiu as condições de transformação e indução proteica descritas no **item 3.3.2** e a metodologia de lise e purificação descrita em **3.3.4**.

As alíquotas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 12% e as que continham a fração de 19 kDa foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 10mM e 0,1% de Triton X-100.

3.3.6 Protocolo 6

Neste protocolo foram utilizadas as condições de transformação e indução proteica descritas no **item 3.3.2** e a metodologia de purificação descrita em **3.3.4**, aplicando-se modificações. Resumidamente, *E. coli* BL21-*CodonPlus®* (DE3)-RIL transformada com o plasmídeo pET14b-*P_vMSP1₁₉* foi cultivada a 37°C em 500 mL de meio LB (Luria Bertani), contendo ampicilina a 100 µg/mL, marcador de seleção do plasmídeo e cloranfenicol a 50 µg/mL, marcador de seleção da *E. coli* BL21-

CodonPlus® (DE3)-RIL. Quando a densidade óptica a 600 nm atingiu o intervalo entre 1,0-1,3, a expressão proteica foi induzida com 1 mM de IPTG por 3 horas e a cultura foi centrifugada a 3.000 x g por 20 minutos a 4°C. As bactérias foram lisadas em tampão de sonicação pH 8,0 (NaH₂PO₄ H₂O 100 mM, Tris-HCl 10 mM e ureia 8 M) utilizando disruptor ultrassônico. Após centrifugação a 4.000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante do lisado de bactérias foi aplicado em coluna contendo a resina *Ni Sepharose 6 FastFlow*. A partir daí, utilizou-se a metodologia descrita para purificação do kit *ProBond™ Purification System*, com as soluções preparadas *in house*.

As alíquotas foram analisadas em gel SDS-PAGE a 12% e as que continham a fração de 19 kDa foram dialisadas contra tampão Tris-HCl 10 mM e 0,1% Triton X-100.

A tabela 3 mostra as principais diferenças entre os protocolos empregados para a obtenção da proteína recombinante His6-*PvMSP1*₁₉.

Tabela 3 – Principais diferenças entre os protocolos utilizados na obtenção da proteína recombinante His6-*PvMSP1*₁₉

Protocolo	Linhagem de <i>E.coli</i>	Condição de Purificação	DO
1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Nativa	0,6 – 0,8
2	<i>E. coli</i> BL21- <i>CodonPlus</i> ® (DE3)-RIL	Nativa	0,6 – 0,8
3	<i>E. coli</i> BL21- <i>CodonPlus</i> ® (DE3)-RIL	Nativa e Desnaturante	0,6 – 0,8
4	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Desnaturante	0,6 – 0,8
5	<i>E. coli</i> BL21- <i>CodonPlus</i> ® (DE3)-RIL	Desnaturante	0,6 – 0,8
6	<i>E. coli</i> BL21- <i>CodonPlus</i> ® (DE3)-RIL	Desnaturante	1,0 – 1,3

DO - densidade óptica a 600 nm

3.4 Avaliação do antígeno recombinante His₆-PvMSP1₁₉

3.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para a confirmação da expressão da proteína de interesse, assim como a verificação das condições de purificação através do perfil eletroforético das bandas, todas as alíquotas coletadas foram analisadas por SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970).

Para determinar em quais condições a proteína de interesse era melhor visualizada, considerando o peso molecular de 19 kDa empregou-se gel em concentrações de 10, 12 e 15%.

3.4.2 Dosagem do conteúdo proteico

As concentrações proteicas foram determinadas através do método BCA (Bicinchoninic Acid) *Protein Assay Kit* (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4.3 Immunoblotting

Através de reações de *immunoblotting*, foi avaliada a reatividade das alíquotas obtidas frente a soros humanos padrão positivos e negativos para *P. vivax* empregando a metodologia descrita por Towbin et al. (1979). Para transferência, empregou-se membrana de nitrocelulose *ProBond*TM (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Os padrões positivos e negativos foram diluídos a 1/100 em solução salina tamponada com fosfatos (SSTF) 0,01 M, pH 7,2 contendo leite desnatado (Molico, Nestlé, Vevey, Vaud, Suíça) a 2%, e incubados por 2 h à temperatura ambiente (TA). Empregou-se conjugado anti-IgG humano marcado com peroxidase A-0170 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído a 1/2.000, incubado 1 h à TA. A reação foi revelada com diaminobenzina (DAB. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1 min à TA.

3.4.4 Teste imunoenzimático ELISA-His6-PvMSP1₁₉

Foi utilizada a metodologia padronizada para His₆-PvMSP1₁₉ (Kudó, 2006), para pesquisa de anticorpos IgG, substituindo a solução cromógena ortofelinenodiamina (OPD) por tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por não ser carcinogênico como o OPD e por ser estável como reagente líquido. Testaram-se tempos de incubação do cromógeno de 5 e 10 minutos e tempos de lavagem das placas de 5 minutos e rápidas. Para a determinação do *cut-off* ou limiar de reatividade (LR) para cada um dos lotes do antígeno recombinante, foram construídas curvas *ROC* (*receiver operating characteristic*) a partir das absorbâncias das amostras de pacientes com *P. vivax* e de controles sadios (Greiner et al., 2000, Martinez et al., 2003). Para cada amostra foi calculado o índice de reatividade (IR), conforme expressão abaixo, sendo consideradas reagentes as amostras que apresentaram $IR \geq 1$.

$$RI = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{cut} - \text{off}}$$

3.5 Obtenção dos lotes da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ para validação e ensaios clínicos

Para a validação do teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉ e aplicação em ensaios clínicos, foram produzidos quatro lotes do antígeno recombinante, seguindo a metodologia descrita no **protocolo 6**. Após a produção, os lotes foram avaliados e processados como descrito abaixo:

- a) SDS-PAGE para análise do perfil eletroforético das alíquotas coletadas na purificação;
- b) As alíquotas que apresentaram banda correspondente à da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com a massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa, foram unidas em alíquota única, de acordo com o pH do tampão (pH 4,0 e 5,3);
- c) Diálise das alíquotas obtidas em pH 4,0 e 5,3 contra tampão Tris-HCl 10mM e 0,1% de Triton X-100 por 24 horas;

- d) Dosagem proteica das alíquotas;
- e) Filtração das alíquotas eluídas com tampão pH 4,0 e 5,3 em tubos para centrifuga Amicon® Ultra – 15 (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), para concentração proteica;
- f) Dosagem proteica dos lotes de proteína recombinante obtidos;
- g) SDS-PAGE para análise do perfil eletroforético dos lotes de proteína recombinante obtidos aplicando diferentes quantidades de proteína no gel. Foram preparados quatro géis. Gel A: 16 µg de proteína por poço. Gel B: 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 µg de proteína por poço. Gel C: 6,4 µg da proteína por poço. Gel D: 0,2 µg da proteína por poço;
- h) *Immunoblotting* para avaliação da reatividade dos lotes obtidos frente a soros padrão positivos e negativos. Os quatro lotes eluídos em pH 4,0 e 5,3 foram testados em três reações. Reação 1: empregando 16 µg de proteína por poço. Reação 2: utilizando 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4 µg de proteína por poço. Reação 3: aplicando 0,2 µg da proteína por poço;
- i) Aplicação em teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉, utilizando 12 amostras positivas e nove negativas para *P. vivax* pertencentes ao painel de referência já mencionado, com o intuito de testar o perfil de reatividade dos antígenos obtidos.

Dos quatro lotes produzidos, três lotes foram empregados na validação do teste ELISA e um nos ensaios clínicos.

3.6 Validação do teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉

3.6.1 Testes analíticos

Os três lotes empregados na validação foram avaliados através de testes analíticos, utilizando o painel de referência já descrito, em relação aos seguintes parâmetros (Ferreira e Ávila, 2001; Meneghisse, 2007):

- a) Sensibilidade – ensaio de 197 amostras de pacientes com gota positiva para *P. vivax*, de diferentes procedências;
- b) Especificidade – ensaio de 101 amostras de controles sadios;
- c) Reação cruzada – ensaio de 168 amostras de soro positivas para anticorpos heterólogos ou outras patologias, a saber, mononucleose infecciosa (N=21), fator reumatoide (N=30), fator antinúcleo (N=10), sífilis (N=29), doença de Chagas (N=34), leishmaniose (N=44);
- d) Repetitividade – para cada lote produzido, foram ensaiadas, em uma mesma placa, 30 replicatas de uma mesma amostra de soro positivo para *P. vivax* e 30 replicatas de uma amostra de soro negativo, utilizando o mesmo conjunto de pipetas e o mesmo operador durante todo o teste. Foi calculado o coeficiente de variação (CV);

$$CV = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{média}}$$

- e) Reprodutibilidade – para cada lote produzido, foram ensaiadas, por dia em uma mesma placa, 10 replicatas de uma mesma amostra de soro positivo e 10 replicatas de uma amostra de soro negativo para *P. vivax*. Esse ensaio foi repetido em cinco dias diferentes, variando os operadores e as pipetas das reações. Também foi calculado o CV;
- f) Outros parâmetros

- Índice de Youden (J)

$$\text{sensibilidade} + \text{especificidade} - 100$$

- Acurácia

$$\frac{(\text{verdadeiros positivos} + \text{verdadeiros negativos})}{\text{total de amostras}} \times 100$$

- Likelihood ratio do resultado positivo

$$\frac{\text{sensibilidade}}{100 - \text{especificidade}}$$

- *Likelihood ratio* do resultado negativo

$$\frac{100 - \text{sensibilidade}}{\text{especificidade}}$$

- Eficiência

$$\frac{\text{sensibilidade} + \text{especificidade}}{2}$$

3.6.2 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade foram desenvolvidos seguindo metodologia descrita por Meneghisse (2007). Para cada lote do recombinante produzido, empregou-se controle positivo, controle negativo e painel de 12 amostras positivas (incluindo amostras de alta, média e baixa reatividade) e nove negativas. Em cada ensaio foram utilizadas como condições controle o antígeno armazenado a 4°C. Realizou-se análise de regressão linear para monitorar a reatividade das amostras no decorrer do tempo.

A análise da estabilidade dos antígenos foi realizada verificando se há decaimento de reatividade das alíquotas mantidas a 37°C, TA, -20°C e placas pré-sensibilizadas, comparando com o controle armazenado a 4°C. Para tanto, compararam-se as inclinações das retas de regressão obtidas na condição teste e na condição controle. Se houver perda da estabilidade, espera-se queda na reatividade das amostras testadas com o antígeno, que será expressa pela inclinação da reta significativamente diferente de zero ($P < 0,05$). A manutenção da estabilidade implica na inclinação da reta não ser significativamente diferente de zero ($P > 0,05$), ou seja, a reatividade se manteve durante o período de tempo estudado.

3.6.2.1 Estabilidade acelerada

O antígeno foi alíquotado e incubado no dia zero a 37°C em estufa com temperatura controlada, em microtubos vedados. Realizaram-se testes nos dias 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28 e 32. Nos três lotes foram ensaiadas, em uma mesma placa, controle

negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras positivas e nove amostras negativas para *P. vivax*, em duplicata, para o antígeno na condição teste e na condição controle.

3.6.2.2 Estabilidade à temperatura ambiente (TA)

O antígeno foi aliquoteado no dia zero e mantido à temperatura ambiente (19 a 27°C) em microtubos vedados. Realizaram-se testes nos dias 0, 15, 30, 45 e 60. Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas, em uma mesma placa, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras positivas e nove amostras negativas para *P. vivax*, em duplicata, para o antígeno na condição teste e na condição controle.

3.6.2.3 Estabilidade de longa duração (tempo real)

Para avaliação das condições de armazenamento, o antígeno foi aliquoteado no dia zero e congelado em freezer com temperatura controlada a -20°C, em microtubos vedados, e cada alíquota foi descongelada apenas no momento do uso. Realizaram-se testes nos dias 0, 30 e 60. Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas, em uma mesma placa, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras positivas e nove amostras negativas para *P. vivax*, em duplicata, para o antígeno na condição teste e na condição controle.

3.6.2.4 Estabilidade das placas pré-sensibilizadas

Para este estudo, foram utilizados dois lotes do antígeno recombinante produzido. No dia zero, cada uma das placas foi sensibilizada com os antígenos dos dois lotes testados. As placas foram divididas em dois blocos, sendo um deles mantido em freezer com temperatura controlada a -20°C e outro mantido em temperatura controlada a 4°C, sendo que cada placa foi retirada da condição de armazenamento apenas no momento do uso. No dia anterior ao teste, uma placa controle, com o antígeno mantido a 4°C era sensibilizada nas mesmas condições das

placas pré-sensibilizadas. Realizaram-se testes nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30. Em todas as apresentações dos lotes pilotos foram ensaiadas, em uma mesma placa, controle negativo em triplicata, controle positivo em duplicata, 12 amostras positivas e nove amostras negativas para *P. vivax*, em duplicata, para o antígeno na condição teste e na condição controle.

3.7 Ensaios clínicos

O teste ELISA-*PvMSP1₁₉* validado foi empregado no estudo de 1.974 amostras oriundas de 21 serviços hemoterápicos do Estado de São Paulo (N=1.309) e de 11 do Estado do Rio de Janeiro (N=665). As amostras foram ensaiadas em duplicata e em cada placa, também foram aplicadas amostras controle positivas e negativas para *P. vivax*, que fazem parte do painel de referência já citado. Após análise, as amostras consideradas positivas, duvidosas (zona cinza) e as que apresentaram valor discrepante entre as duplicatas foram repetidas pelo teste ELISA-*PvMSP1₁₉*.

3.8 Análise estatística

Os resultados foram analisados e tratados utilizando os seguintes softwares:

- a) *GraphPad Prism 5* – construção das Curvas *ROC*, cálculos de sensibilidade, especificidade, intervalos de confiança de 95% de probabilidade, *likelihood ratio*, construção de gráficos, regressão linear para estudo da estabilidade;
- b) *Sigma Stat 3.5* – comparação das positivities (teste exato de Fisher ou χ^2), concordância (McNemar's);
- c) *Microsoft Office Excel 2010* – confecção de planilhas de dados, construção de gráficos e tabelas, cálculo do coeficiente de variação.

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

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise da padronização da produção da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉

4.1.1 Protocolo 1

Seguindo este protocolo, dois lotes da proteína recombinante foram produzidos empregando *E. coli* BL21-(DE3) e condições nativas de purificação, sendo os produtos obtidos nos lotes 1 e 2 denominados **N1** e **N2**, respectivamente. Nas figuras 10 A e 10 B, observa-se o perfil eletroforético em SDS-PAGE dos dois lotes e a presença de bandas correspondentes à proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa.

Figura 10 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em dois lotes (N1 e N2). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15% (A) e 12% (B), corados com *Coomassie Blue* R-250

A – **1-5** - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições nativas com 200 mM de imidazol (**N1**)

B – **1-6** - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições nativas com 200 mM de imidazol; **7-9** - eluição em condições nativas com 400 mM de imidazol (**N2**)

Esperava-se que a proteína fosse eluída em tampão com 400 mM de imidazol, porém o produto **N1** (figura 10 A, canaletas 1-5) foi obtido por eluição em 200 mM de imidazol e apresentou concentração proteica de 176 µg/mL, após diálise. O

produto **N2** (figura 10 B, canaletas 7-9) foi obtido com eluição em 400 mM de imidazol e apresentou concentração proteica de 608 µg/mL, sem diálise.

4.1.2 Protocolo 2

Por este protocolo obteve-se o produto **N3** (*E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL e condições nativas de purificação), cujo perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12% encontra-se na figura 11. Observa-se a presença de bandas com a massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa, nas canaletas 1-7. A eluição da proteína ocorreu em tampão com 200 mM de imidazol e a concentração proteica foi 131 µg/mL.

Figura 11 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em um lote (**N3**). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corado com *Coomassie Blue* R-250
1-7 - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições nativas com 200 mM de imidazol

4.1.3 Protocolo 3

Esta metodologia foi empregada na tentativa aumentar o rendimento da produção proteica. Foram produzidos dois lotes, utilizando *E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL, cujos perfis eletroforéticos estão representados na figura 12, sendo um deles com lise e purificação em condições nativas (canaletas 1-2) e o outro em condições desnaturantes (canaletas 3-5). No lote obtido por purificação em condições nativas (**N4**), a concentração proteica foi de 355 µg/mL e no produzido em condições desnaturantes (**D1**), foi de 795 µg/mL.

Figura 12 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em dois lotes sendo um em condições nativas (**N4**) e um em condições desnaturantes(**D1**). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15%, corado com *Coomassie Blue* R-250

1-2 – eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ condições nativas (**N4**); **3-5** – eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ condições desnaturantes, pH 4,0 (**D1**)

4.1.4 Protocolo 4

Empregando *E. coli* BL21-(DE3) e condições desnaturantes, com soluções de lise e purificação preparadas *in house*, a concentração proteica do produto **D2** foi de 1.289 µg/mL. Nas canaletas 5-8 da figura 13, observa-se a presença de bandas correspondentes à proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com a massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa.

Figura 13 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em condições desnaturantes (**D2**). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corado com *Coomassie Blue* R-250

1 - *pellet* pós-lise; **2** – sobrenadante pós-lise; **3** – lavagem tampão pH 7,8; **4** - lavagem tampão pH 6,0; **5-9** – eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 4,0 (**D2**)

4.1.5 Protocolo 5

Com o protocolo 5, utilizando *E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL e soluções de lise e purificação preparadas *in house*, produziram-se dois lotes com concentração proteica de 1.737 µg/mL (**D3**) e 8.995 µg/mL (**D4**). Analisando o perfil eletroforético das proteínas em SDS-PAGE (figura 14), observa-se a presença de bandas correspondentes à proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa, nas canaletas 3-8 da figura 14 A e 1-9 da 14 B.

Figura 14 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em dois lotes em condições desnaturantes (**D3** e **D4**). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15% (A) e 12% (B), corados com *Coomassie Blue* R-250

A – 1 - células não induzidas; 2 – *pellet* pós-lise; 3-8 - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 4,0 (**D3**)

B – 1-9 - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 4,0 (**D4**)

4.1.6 Protocolo 6

Analisando o perfil eletroforético das proteínas na SDS-PAGE (figura 15), observam-se bandas correspondentes à proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com a massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa, obtidas por eluição em tampão pH 4,0 e 5,3 e ausência de bandas de massa molecular não correspondentes à da proteína de interesse. As frações eluídas em pH 4,0 e 5,3 apresentaram concentrações proteicas de 400,5 µg/mL (**D5**) e 134 µg/mL (**D6**), respectivamente.

Figura 15 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em dois lotes em condições desnaturantes (**D5** e **D6**). Perfil eletroforético em SDS-PAGE a12%, corados com *Coomassie Blue* R-250

A – **1-5** - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 4,0; **6-9** - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 5,3 (**D5**)

B – **1-3** - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 5,3; **4-9** - eluição da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em condições desnaturantes, pH 6,0

4.1.7 Análise da reatividade das proteínas recombinantes His₆-PvMSP1₁₉ por reação de *Immunoblotting*

Os resultados da reatividade dos antígenos obtidos frente a soros padrão positivos e negativos estão na figura 16. Tanto em condições nativas (**N3**) quanto desnaturantes (**D1**, **D3**, **D5**) de purificação, empregando *E. coli* BL21-*CodonPlus*®(DE3)-RIL, observa-se a presença de outras bandas reativas além do His₆-PvMSP1₁₉ (figura 16 A). Por outro lado, quando utilizada *E. coli* BL21-DE3, observa-se banda única em **N2** e menor reatividade de outras bandas (**D2**). O recombinante **N1**, dialisado após a purificação não reagiu com a amostra positiva. **D4** não está demonstrado devido à contaminação do antígeno. Todos os recombinantes não apresentaram reatividade frente ao padrão negativo utilizado (figura 16 B). Os resultados do lote produzido utilizando o protocolo 6 estão no item **4.2.1.2**.

Figura 16 – *Immunoblotting* da His₆-PvMSP1₁₉ produzida em condições nativas e desnaturantes frente a padrão positivo (A) e negativo (B)

N1 e **N2** – protocolo 1, condições nativas; **N3** – protocolo 2, condições nativas; **D1** – protocolo 3, condições desnaturantes; **D2** – protocolo 4, condições desnaturantes; **D3** e **D5** – protocolo 5, condições desnaturantes

4.1.8 Teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉

A tabela 4 apresenta os resultados do teste ELISA empregando o recombinante His₆-PvMSP1₁₉ obtido conforme os protocolos 1 a 5, para a pesquisa de anticorpos IgG. Não houve diferença em relação à reatividade frente às amostras do painel positivo (χ^2 , $P=1,000$) e negativo (χ^2 , $P=0,735$).

Tabela 4 – Comparação entre os antígenos obtidos utilizando diferentes metodologias de indução e purificação

Antígeno	Número de amostras		Sensibilidade %	Especificidade %	IR amostras positivas		IR amostras negativas	
	Positivas	Negativas			Média	Mediana	Média	Mediana
N1	42	45	97,62	97,78	8,61	9,79	0,37	0,32
N2	42	45	97,62	100,0	20,32	22,87	0,34	0,34
N3	42	45	97,62	97,78	15,13	17,02	0,21	0,14
N4	5	5	NC	NC	6,22	6,05	0,42	0,30
D1	5	5	NC	NC	10,61	11,31	0,02	0,02
D2	42	45	97,62	97,78	10,3	11,79	0,44	0,39
D3	5	4	NC	NC	23,46	25,10	0,33	0,03
D4	42	44	97,62	100,0	9,68	10,53	0,14	0,12

N1 e N2 – protocolo 1, condições nativas; N3 – protocolo 2, condições nativas; N4 e D1 – protocolo 3, condições nativas e desnaturantes, respectivamente; D2 – protocolo 4, condições desnaturantes; D3 e D4 – protocolo 5, condições desnaturantes
NC – não calculado. IR – índice de reatividade

4.2 Análise dos lotes obtidos da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉

Foram produzidos quatro lotes (A, B, C, D) da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, sendo três deles (B, C, D) aplicados na validação do teste e o lote A aplicado nos testes de ensaios clínicos.

A eluição de cada um dos quatro lotes ocorreu frente a tampão pH 5,3 e pH 4,0, obtendo-se as frações A1 e A2, B1 e B2, C1 e C2, D1 e D2. As condições de eluição e os resultados de concentração proteica das frações de cada lote estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 – Condições de eluição e concentração proteica dos lotes produzidos para validação do teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉

Lote	Fração	Tampão de eluição pH	Concentração proteica (µg/mL)
A	A1	5,3	903,57
	A2	4,0	915,13
B	B1	5,3	678,26
	B2	4,0	685,08
C	C1	5,3	842,12
	C2	4,0	764,92
D	D1	5,3	823,21
	D2	4,0	815,86

4.2.1 Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ em SDS-PAGE

O perfil eletroforético dos quatro lotes produzidos pode ser observado na figura 17, onde estão as frações que apresentaram bandas correspondentes à proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com a massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa, unidas em uma só alíquota, respeitando as condições de eluição (tampão pH 4,0 e pH 5,3).

Em 17 A, canaletas 1 a 8, observa-se o perfil eletroforético dos antígenos A1 a D2, aplicando 16 µg de antígeno por canaleta no gel. Em 17 B, canaletas 1 a 6,

observa-se o perfil eletroforético aplicando o antígeno A2, em quantidades decrescentes, razão 2, partindo-se de 6,4 μ g até 0,2 μ g por canaleta. Em 17 C, canaletas 1 a 9, observa-se o perfil eletroforético dos antígenos A1 a D2, aplicando-se 0,2 μ g de cada antígeno.

Figura 17 – Análise do perfil eletroforético da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ produzida em quatro lotes em condições desnaturantes. Perfil eletroforético em SDS-PAGE a 12%, corado com *Coomassie Blue* R-250

A – Perfil eletroforético dos quatro lotes produzidos, com 16 μ g proteína, por poço. **1** - lote A1, eluição em tampão pH 5,3; **2** - lote A2, eluição em tampão pH 4,0; **3** - lote B1, eluição em tampão pH 5,3; **4** - lote B2, eluição em tampão pH 4,0; **5** - lote C1, eluição em tampão pH 5,3; **6** - lote C2, eluição em tampão pH 4,0; **7** - lote D1, eluição em tampão pH 5,3; **8** - lote D2, eluição em tampão pH 4,0

B – Perfil eletroforético do lote A2. **1-6** – 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 μ g de proteína, respectivamente

C – Perfil eletroforético dos quatro lotes produzidos, com 0,2 μ g da proteína, por poço, distribuídos nas canaletas **1-8** como descrito em A

Tanto nas frações eluídas em pH 4,0, quanto em pH 5,3 pode-se observar a presença de outras bandas além da banda de interesse, quando se utilizou 16 μ g de

proteína/poço (Figura 17 A). Nas frações eluídas em pH 4,0, essas bandas de massa molecular acima de 19 kDa foram de menor intensidade, quando comparadas às presentes nas frações eluídas em pH 5,3. Por esse motivo e por ser a alíquota com maior volume, escolheu-se a fração A2 (pH 4,0) para verificar a presença das bandas de maior massa molecular quando se utilizavam quantidades menores de proteína até 0,2 µg/poço, que é a empregada no teste ELISA. Empregando 6,4 µg/poço aquelas bandas já não foram observadas. Com 0,2 µg/poço a banda de interesse ainda pôde ser observada nas oito frações estudadas.

4.2.2 Análise da reatividade das proteínas recombinantes His₆-PvMSP1₁₉ por reação de *Immunoblotting*

Os resultados da reatividade das frações de cada lote produzido, obtida frente a soros padrão positivo e negativo estão na figura 18. Em 18 A, utilizando 16 µg da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, é possível observar a presença da banda de interesse (aproximadamente 19 kDa) em todos os lotes porém, nos eluídos em tampão pH 4,0 observa-se reatividade de outras bandas além de His₆-PvMSP1₁₉. Nas frações eluídas em pH 5,3, observou-se reatividade do soro positivo apenas com a banda de interesse; as bandas de maior massa molecular observadas no SDS-PAGE não foram reconhecidas. Já as bandas observadas no gel com as frações eluídas em pH 4,0 foram reconhecidas pela amostra de soro positivo, com menor intensidade. Todos os lotes da proteína recombinante não foram reconhecidos com o padrão negativo utilizado (figura 18 B).

A figura 19 mostra a reatividade utilizando o lote A2 com 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 µg da proteína recombinante por poço.

Na figura 20 A, observam-se os resultados da reatividade das frações de cada lote aplicando 0,2 µg do antígeno e em 20 B, a reatividade dos mesmos com o padrão negativo utilizado.

Figura 18 – *Immunoblotting* dos quatro lotes produzidos de His₆-PvMSP1₁₉ frente a padrão positivo e negativo

A-B – Perfil de reatividade dos quatro lotes produzidos, com 16 µg da proteína, por poço, frente a padrão positivo (A) e negativo (B). **1** - lote A1, eluído em tampão pH 5,3; **2** - lote A2, eluído em tampão pH 4,0; **3** - lote B1, eluído em tampão pH 5,3; **4** - lote B2, eluído em tampão pH 4,0; **5** - lote C1, eluído em tampão pH 5,3; **6** - lote C2, eluído em tampão pH 4,0; **7** - lote D1, eluído em tampão pH 5,3; **8** - lote D2, eluído em tampão pH 4,0

Figura 19 – Perfil de reatividade em *Immunoblotting* do lote A2 da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉ frente a padrão positivo

1-6 - 6,4; 3,2; 1,6; 0,8; 0,4 e 0,2 µg de proteína, por poço, respectivamente

Figura 20 – *Immunoblotting* dos quatro lotes produzidos de His6-PvMSP1₁₉ frente a padrão positivo e negativo

A-B – Perfil de reatividade dos quatro lotes produzidos, com 0,2 µg da proteína, por poço, frente a padrão positivo (A) e negativo (B). **1** - lote A1, eluído em tampão pH 5,3; **2** - lote A2, eluído em tampão pH 4,0; **3** - lote B1, eluído em tampão pH 5,3; **4** - lote B2, eluído em tampão pH 4,0; **5** - lote C1, eluído em tampão pH 5,3; **6** - lote C2, eluído em tampão pH 4,0; **7** - lote D1, eluído em tampão pH 5,3; **8** - lote D2, eluído em tampão pH 4,0

4.2.3 Teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉

Na tabela 6, estão os resultados dos lotes produzidos frente a amostras positivas (12) de alta, média e baixa reatividade e negativas (9). Como se pode observar na tabela, as frações A1, B1, C1 e D1 apresentaram sensibilidade e especificidade máximas, enquanto as frações A2 e C2 foram menos sensíveis. Por esse motivo, os lotes obtidos em pH 5,3 foram escolhidos para validação e ensaios clínicos.

Tabela 6 – Reatividade dos lotes de antígeno His₆-PvMSP1₁₉ frente a 12 amostras positivas e nove negativas

Antígeno	Sensibilidade %	Especificidade %	IR Amostras positivas		IR Amostras negativas	
			Média	Mediana	Média	Mediana
A1	100,0	100,0	10,59	7,83	0,26	0,15
A2	91,67	100,0	9,00	6,08	0,16	0,09
B1	100,0	100,0	10,20	7,59	0,24	0,10
B2	100,0	100,0	9,14	6,25	0,28	0,16
C1	100,0	100,0	10,26	6,71	0,20	0,20
C2	91,67	100,0	8,09	4,51	0,16	0,13
D1	100,0	100,0	10,58	7,35	0,21	0,15
D2	100,0	100,0	12,60	9,92	0,20	0,13

N1e N2 – protocolo 1, condições nativas; N3 – protocolo 2, condições nativas; N4 e D1 – protocolo 3, condições nativas e desnaturantes, respectivamente; D2 – protocolo 4, condições desnaturantes; D3 e D4 – protocolo 5, condições desnaturantes
NC – não calculado. IR – índice de reatividade

4.3 Validação do teste ELISA-His₆-PvMSP1₁₉

A seguir, são apresentados os resultados da validação do teste ELISA para pesquisa de anticorpos IgG empregando os lotes B1, C1 e D1.

4.3.1 Testes analíticos

4.3.1.1 Sensibilidade e Especificidade

- **Amostras com gota positiva para *P. vivax* e controles sadios**

A partir desses valores de absorbância das 197 amostras positivas e 101 negativas testadas com os lotes de antígeno B1, C1 e D1 foram construídas curvas ROC, para determinar o *cut-off* em cada lote. A figura 21 mostra as curvas obtidas.

O teste ELISA apresentou sensibilidade 96,95% e especificidade 100,0%, com os três lotes empregados, embora com *cut-off* diferente. A tabela 7 mostra os

parâmetros de desempenho do teste ELISA com os três lotes. A distribuição dos índices de reatividade de 197 amostras de pacientes com malária e 101 controles sadios com cada um dos lotes está na figura 22.

Figura 21 – Curvas ROC obtidas a partir dos valores de absorbância do teste ELISA na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 197 amostras de pacientes com gota positiva para *P. vivax* e 101 de controles sadios, empregando os lotes B1, C1 e D1

Tabela 7 – Desempenho dos lotes de antígeno recombinante frente a 197 amostras de pacientes com gota positiva para *P. vivax* e 101 de controles sadios

Ag	Cut-off	S% (IC 95%)	E% (IC 95%)	J	A	LR +	LR -	E
B1	0,100	96,95 (93,49-98,87)	100,0 (96,41- 100,0)	96,95	97,99%	I	0,03	98,47%
C1	0,100	96,95 (93,49-98,87)	100,0 (96,41- 100,0)	96,95	97,99%	I	0,03	98,47%
D1	0,090	96,95 (93,49-98,87)	100,0 (96,41- 100,0)	96,95	97,99%	I	0,03	98,47%

Ag – antígeno; S% - sensibilidade; E% - especificidade; IC 95% - intervalo de confiança de 95% de probabilidade; J – índice de Youden; A – acurácia; LR + – *likelihood ratio* positivo; LR - – *likelihood ratio* negativo; E – eficiência; I – infinito

Figura 22 – Distribuição dos índices de reatividade de 197 amostras de pacientes com malária (D) e 101 controles sadios (S) no teste ELISA, empregando os lotes de antígeno recombinante B1, C1 e D, na pesquisa de anticorpos IgG

- **Amostras com gota positiva para *P. vivax*, de controles sadios e com outras doenças**

A partir dos valores de absorbância das 197 amostras positivas, 101 negativas e 168 de outras doenças, testadas com os lotes de antígeno B1, C1 e D1 foram construídas curvas ROC, para determinar o *cut-off* em cada lote. A figura 23 mostra as curvas obtidas.

O teste ELISA apresentou sensibilidade 96,95% nos três lotes testados e especificidade de 99,26% nos lotes B1 e C1 e 98,51% no lote D1. A tabela 8 mostra os parâmetros de desempenho do teste ELISA com os três lotes. A distribuição dos índices de reatividade de 197 amostras de pacientes com malária, 101 controles e 168 de outras doenças com cada um dos lotes está figura 24.

Figura 23 – Curvas ROC obtidas a partir dos valores de absorbância do teste ELISA na pesquisa de anticorpos IgG, ensaiando 197 amostras de pacientes com gota positiva para *P. vivax*, 101 de controles sadios e 168 de outras doenças, empregando os lotes B1, C1 e D1.

Tabela 8 – Desempenho dos lotes de antígeno recombinante frente a 197 amostras de pacientes com gota positiva para *P. vivax*, 101 de controles sadios e 168 de outras doenças

Ag	Cut-off	S% (IC 95%)	E% (IC 95%)	J	A	LR +	LR -	E
B1	0,120	96,95 (93,49-98,87)	99,26 (97,34-99,91)	96,91	98,28%	130,4	0,03	98,10%
C1	0,105	96,95 (93,49-98,87)	99,26 (97,34-99,91)	96,91	98,28%	130,4	0,03	98,10%
D1	0,110	95,43 (91,50-97,89)	99,26 (97,34-99,91)	94,69	97,64%	128,2	0,05	97,34%

Ag – antígeno; S% - sensibilidade; E% - especificidade; IC 95% - intervalo de confiança de 95% de probabilidade; J – índice de Youden; A – acurácia; LR + – *likelihood ratio* positivo; LR - – *likelihood ratio* negativo; E – eficiência; I – infinito

Figura 24 – Distribuição dos índices de reatividade de 197 amostras de pacientes com malária (D) e 101 controles sadios + 168 amostras de outras doenças (S+OD) no teste ELISA, empregando os lotes de antígeno recombinante B1, C1 e D, na pesquisa de anticorpos IgG

4.3.1.2 Reação Cruzada

A reatividade cruzada das amostras de pacientes com outras doenças dependeu do *cut-off* considerado, como pode ser visto na tabela 9. Empregando o *cut-off* obtido considerando-se as amostras de outras doenças, obteve-se menor reatividade cruzada (2/168) nos três lotes. Porém, observa-se que a sensibilidade do lote D1 diminuiu (95,43%) (tabelas 7 e 8).

Por outro lado, com o *cut-off* calculado a partir de amostras de pacientes com malária e doadores de sangue, houve um aumento na reatividade cruzada no lote B1 (3/168) e no D1 (4/168), mas a sensibilidade dos três lotes permaneceu igual (96,95%) (tabelas 7 e 8).

Tabela 9 – Número de amostras de pacientes com outras doenças reagentes pelo teste ELISA empregando os lotes B1, C1 e D1, considerando diferentes valores de *cut-off*

Ag	<i>Cut-off</i>	FR - N=30	DC - N=34	L - N=44	S - N=29	MI - N=21	FAN - N=10
B1	0,100	1	2	0	0	0	0
	0,120	0	2	0	0	0	0
C1	0,100	0	2	0	0	0	0
	0,105	0	2	0	0	0	0
D1	0,090	2	2	0	0	0	0
	0,110	0	2	0	0	0	0

Ag – antígeno; FR – fator reumatoide; DC – doença de Chagas; L – leishmaniose; S – sífilis; MI – mononucleose infecciosa; FAN – fator antinúcleo

4.3.1.3 Repetitividade

A figura 25 mostra a distribuição dos índices de reatividade da amostra positiva para *P. vivax* e amostra negativa e a tabela 10 traz os coeficientes de variação para a amostra positiva aplicadas no estudo de repetitividade do teste ELISA, empregando os lotes de antígeno recombinante B1, C1 e D1, na pesquisa de anticorpos IgG.

Figura 25 – Distribuição dos índices de reatividade de amostra positiva para *P. vivax* e negativa, em estudo de repetitividade

Tabela 10 – Coeficiente de variação (CV) da amostra positiva no estudo de repetitividade e medianas dos índices de reatividade das amostras positiva e negativa

		Lote B1	Lote C1	Lote D1
Amostra positiva	CV	3,8%	3,3%	1,4%
	Mediana	19,48	19,83	22,19
Amostra negativa	Mediana	0,03	0,04	0,05

A amostra positiva reagente em todas as replicatas e o coeficiente de variação do índice de reatividade foi bem menor que 20% (Meneghisse, 2007) para todos os lotes. A mediana dos IR da amostra positiva obtidos com o lote D1 foi significativamente maior que a dos lotes B1 e C1 (Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$; método de Dunn, $P < 0,05$).

A amostra negativa apresentou resultados negativos em todas as replicatas, porém, como os IR foram baixos, variando entre 0,00 e 0,017 para os três lotes do antígeno, o coeficiente de variação não foi calculado. Não houve diferença entre as medianas dos IR da amostra negativa (Kruskal-Wallis, $P = 0,547$) nos três lotes.

4.3.1.4 Reprodutibilidade

A figura 26 mostra a distribuição dos índices de reatividade da amostra positiva para *P. vivax* e amostra negativa. A tabela 11 traz os coeficientes de variação para a amostra positiva aplicadas no estudo de reprodutibilidade do teste ELISA, feito em cinco dias diferentes alterando os operadores e as pipetas das reações, empregando os lotes de antígeno recombinante B1, C1 e D1, na pesquisa de anticorpos IgG.

Figura 26 – Distribuição dos índices de reatividade de amostra positiva para *P. vivax* e negativa, em estudo de reprodutibilidade

A amostra positiva apresentou reatividade em todas as replicatas e o coeficiente de variação do índice de reatividade foi bem menor que 25% (Meneghisse, 2007) para todos os lotes. A mediana dos IR da amostra positiva obtidos com o lote C1 foi significativamente menor que a dos lotes B1 e D1 (Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$; método de Dunn, $P < 0,05$).

A amostra negativa apresentou resultados negativos em todas as replicatas, porém, como os IR foram baixos, variando entre 0,0 e 0,6 para os três lotes do antígeno, o coeficiente de variação não foi calculado. A dos IR da amostra negativa obtidos com o lote D1 foi significativamente maior que a dos lotes B1 e C1 (Kruskal-Wallis, $P = 0,008$; método de Dunn, $P < 0,05$).

Tabela 11 – Coeficiente de variação (CV) da amostra positiva no estudo de reprodutibilidade e medianas dos índices de reatividade das amostras positiva e negativa

		Lote B1	Lote C1	Lote D1
Amostra positiva	CV	8,0%	10,3%	10,6%
	Mediana	18,78	17,12	18,16
Amostra negativa	Mediana	0,07	0,05	0,10

4.3.1.5 Estabilidade

- **Estabilidade acelerada**

Das 24 amostras testadas, apenas uma teve queda significativa na reatividade, a partir do 16º dia, com o lote B1 (regressão linear, $P = 0,0327$). A figura 27 traz os gráficos de regressão linear mostrando a estabilidade acelerada para os lotes B1, C1 e D1.

Figura 27 – Estabilidade acelerada dos lotes B1, C1, D1

Gráficos de regressão linear: 1 – amostra positiva alta (B1); 2 – amostra positiva baixa (B1); 3 – amostra positiva alta (C1); 4 – amostra positiva baixa (C1); 5 – amostra positiva alta (D1); 6 – amostra positiva baixa (D1)

* - inclinação do gráfico da amostra positiva baixa ensaiada com o antígeno mantido a 37°C apresentou inclinação significativamente $\neq 0$ ($p = 0,0327$)

• Estabilidade à temperatura ambiente

Nenhuma das 24 amostras testadas teve queda significativa na reatividade com os três lotes. A figura 28 traz os gráficos de regressão linear mostrando a estabilidade à temperatura ambiente para os lotes B1, C1 e D1.

Figura 28 – Estabilidade à temperatura ambiente dos lotes B1, C1, D1

Gráficos de regressão linear: 1 – amostra positiva alta (B1); 2 – amostra positiva baixa (B1); 3 – amostra positiva alta (C1); 4 – amostra positiva baixa (C1); 5 – amostra positiva alta (D1); 6 – amostra positiva baixa (D1)

• Estabilidade a -20°C

Como a estabilidade do antígeno a -20°C foi avaliada nos tempos inicial, 30 e 60 dias (três pontos) não foi feita a regressão linear. O antígeno conservado a -20°C manteve a estabilidade durante o período estudado. A figura 29 traz os gráficos mostrando a reatividade das amostras para os lotes B1, C1 e D1.

Figura 29 – Estabilidade a -20°C dos lotes B1, C1, D1

Gráficos de correlação: 1 – amostra positiva alta (B1); 2 – amostra positiva baixa (B1); 3 – amostra positiva alta (C1); 4 – amostra positiva baixa (C1); 5 – amostra positiva alta (D1); 6 – amostra positiva baixa (D1)

- **Estabilidade placas pré-sensibilizadas**

Nenhuma das 24 amostras testadas teve queda significativa na reatividade com os três lotes. A figura 30 traz os gráficos de regressão linear mostrando a estabilidade das placas mantidas a -20°C e 4°C para os lotes C1 e D1.

Figura 30 – Estabilidade das placas pré-sensibilizadas com lotes C1 e D1, mantidas a -20°C e 4°C

Gráficos de correlação: 1 – amostra positiva alta (B1); 2 – amostra positiva baixa (B1); 3 – amostra positiva alta (C1); 4 – amostra positiva baixa (C1); 5 – amostra positiva alta (D1); 6 – amostra positiva baixa (D1)

4.4 Ensaios clínicos

Entre as 1.309 amostras do Estado de São Paulo, 1,15% (N=15) apresentaram $IR \geq 1,0$ e entre as 665 do Estado do Rio de Janeiro, 1,65% (N=11). O índice de reatividade (IR) das amostras positivas variou de 8,98 a 1,16 (São Paulo) e de 13,03 a 1,08 (Rio de Janeiro) (Figura 31).

As 26 amostras reagentes são provenientes de seis municípios do Estado de São Paulo e quatro do Estado do Rio de Janeiro, conforme relatado na tabela 12.

Figura 31 – Distribuição dos índices de reatividade de 1.974 amostras de Serviços Hemoterápicos, sendo 1.309 do Estado de São Paulo e 665 do Estado do Rio de Janeiro

Tabela 12 – Positividade do teste ELISA-*PvMSP1₁₉* para anticorpos IgG em amostras de Serviços Hemoterápicos de São Paulo e Rio de Janeiro

Estado	Município	Total	Amostras Positivas	Positividade
São Paulo	Pariquera Açu	39	9	23,1%
	Presidente Prudente	21	1	4,8%
	Sertãozinho	30	1	3,3%
	Votuporanga	39	1	2,6%
	Fernandópolis	210	2	1,0%
	Taubaté	249	1	0,4%
Rio de Janeiro	Petrópolis	40	2	5,0%
	Campos dos Goytacazes	88	3	3,4%
	Rio de Janeiro	305	5	1,6%
	Niterói	163	1	0,6%

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os métodos laboratoriais são ferramentas úteis tanto para o diagnóstico individual, quanto para estudos populacionais. Com relação à malária, técnicas microscópicas, moleculares e imunológicas podem ser utilizadas no diagnóstico e acompanhamento de cura. No entanto, é necessária a adequação da metodologia para cada finalidade. A gota espessa, considerada padrão-ouro no diagnóstico da malária, quando utilizada em áreas não endêmicas pode ter seu resultado comprometido frente a dificuldades como as baixas parasitemias encontradas nessas regiões, o tempo necessário para a leitura de uma lâmina negativa, a experiência do profissional envolvido e a disponibilidade de equipamento adequado. Os testes rápidos para detecção de proteínas específicas de *Plasmodium* apresentam sensibilidade e especificidade variáveis, dependendo do nível de parasitemia do paciente, da espécie de *Plasmodium*, da proteína pesquisada e do fabricante do teste. Além disso, não diferenciam entre *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale* (WHO, 2014). O diagnóstico molecular por PCR é um método sensível e específico para a detecção espécie-específica de *Plasmodium* (Snounou et al, 1993; Lima, 2011), porém, seu custo operacional elevado pode dificultar sua implementação, principalmente em estudos epidemiológicos e triagem de doadores de sangue.

Os métodos sorológicos são considerados complementares no diagnóstico da malária, tendo sua principal aplicação em estudos soroepidemiológicos, triagem de doadores de sangue em áreas onde a malária não é endêmica e na elucidação do diagnóstico. O teste imunoenzimático ELISA, devido a suas características de alta sensibilidade e especificidade e possibilidade de automação vêm substituindo cada vez mais a imunofluorescência indireta na pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium*.

O avanço nos métodos de análise das estruturas de *Plasmodium* levou à identificação de antígenos que podem ser produzidos em larga escala empregando tecnologia recombinante, o que também aumenta a especificidade dos testes na pesquisa de anticorpos (Sanchez, 2013). Nesse sentido, decidiu-se utilizar a fração 19 da Proteína 1 de Superfície do Merozoíto (MSP1₁₉) de *P. vivax*, tendo como base os

resultados de Soares e colaboradores (1997, 1999b), que empregaram a proteína recombinante em estudos imuno-epidemiológicos e observaram sua alta imunogenicidade durante infecção natural em seres humanos e seu reconhecimento por anticorpos de grande parte de indivíduos brasileiros recentemente expostos a *P. vivax*. Esses resultados foram, posteriormente, confirmados em estudos realizados na Coréia do Sul, onde mais de 90% dos indivíduos infectados por *P. vivax* apresentaram anticorpos específicos para PvMSP1₁₉ (Park et al., 2001). O limitado polimorfismo do gene que codifica a PvMSP1₁₉ em diferentes regiões do mundo foi outra importante observação, pois não restringe seu reconhecimento por anticorpos humanos (Pasay et al., 1995; Soares et al., 1999c). Além disso, modelos empregando métodos sorológicos com MSP1₁₉ foram propostos para estimar a intensidade de transmissão, avaliar os efeitos das medidas de controle e identificar áreas em que um esforço adicional necessário (Corran et al., 2007). Esses resultados sugerem a possibilidade de se utilizar ELISA empregando a proteína recombinante PvMSP1₁₉ para aplicação na triagem de doadores de sangue.

Na primeira etapa deste estudo, padronizou-se a produção da proteína recombinante His₆-PvMSP1₁₉, partindo do plasmídeo pET14b-PvMSP1₁₉, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Irene da Silva Soares. Com base na metodologia descrita por Cunha et al. (2002), procurou-se otimizar a produção do antígeno recombinante, avaliando diferentes formas de purificação que possibilitassem a obtenção de antígeno puro e com bom rendimento, nas condições disponíveis no Laboratório.

A utilização do vetor pET justifica-se pelo fato de possibilitar altos níveis de expressão de uma forma relativamente simples de produção e purificação de proteínas. Utilizando o gene da região C-terminal de PvMSP1₁₉, clonado em diferentes vetores de expressão e transformados em *E. coli*, Cunha et al. (2002) verificaram que, entre as proteínas obtidas, PvMSP1₁₉ expressa pelo vetor pET-(His₆-MSP1₁₉) foi melhor reconhecida por anticorpos de indivíduos naturalmente expostos a *P. vivax* e induziu altos títulos de anticorpos em camundongos imunizados. As proteínas recombinantes geradas a partir do vetor pET foram solúveis em tampão aquoso, na ausência de detergentes. Quando geradas como

proteínas de fusão com GST ou MBP sua solubilidade só era possível na presença de detergentes como Triton X-100 e CHAPS, respectivamente. A falta de solubilidade dessas proteínas era, provavelmente, devida à proteína de fusão, pois o recombinante His₆-MSP1₁₉ gerado era altamente solúvel.

Utilizando o protocolo descrito por Cunha et.al. (2002) – **Protocolo 1** – a purificação da proteína de interesse não foi reprodutível, pois em cada lote produzido a eluição se verificou em concentração de imidazol diferente. Além disso, obteve-se produto com outras proteínas, além daquela com o massa molecular esperada de 19 kDa, como se observou no perfil eletroforético dos dois lotes produzidos.

Os outros cinco protocolos foram testados com a finalidade de aumentar o rendimento, a pureza e a reprodutibilidade do antígeno produzido. Deste modo, no **Protocolo 2**, empregou-se a linhagem bacteriana, *E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL, que contém cópias extras de genes que codificam RNA transportadores que permitem a expressão de proteínas recombinantes heterólogas em *E. coli* de modo mais eficiente e em níveis mais elevados que as cepas BL21 convencionais. O baixo rendimento obtido pode ter sido ocasionado pela metodologia de purificação utilizada.

O emprego do *kit ProBond*™ *Purification System* (Invitrogen) para lise e purificação, em condições nativas e desnaturantes – **Protocolo 3** – permitiu aumentar o rendimento da produção proteica, principalmente utilizando agentes desnaturantes como guanidina e ureia. O preparo *in house* das soluções descritas no *kit* para lise e purificação em condições desnaturantes – **Protocolos 4 e 5** – forneceu alto rendimento, mostrando reprodutibilidade em relação aos resultados obtidos com a utilização do *kit*. Entretanto, o perfil eletroforético dos produtos obtidos com as metodologias testadas apresentava a banda 19 kDa e outras bandas de maior massa molecular.

O **Protocolo 6** foi desenhado com base nas observações dos resultados das demais metodologias testadas, visando à obtenção do antígeno mais puro sem necessidade de realizar outros processos de purificação. A escolha da linhagem bacteriana *E. coli* BL21-*CodonPlus*® (DE3)-RIL levou em consideração suas

vantagens genéticas já mencionadas e demonstrou resultados satisfatórios quando foram analisados os perfis eletroforéticos e a reação de *immunoblotting* empregando a proteína recombinante produzida. Duas modificações foram fundamentais para otimizar a produção da proteína recombinante, aumento do crescimento bacteriano e adição do tampão de eluição de pH 5,3. O crescimento bacteriano até obtenção de densidade óptica a 600 nm de 1,0-1,3 proporcionou maior eficiência na expressão proteica, quando comparada com a densidade óptica de 0,6-0,8, descrita na literatura (Cunha et al., 2002). Deste modo, obteve-se o antígeno recombinante His₆-PvMSP1₁₉, com massa molecular de aproximadamente 19 kDa, observada por análise do perfil eletroforético, que demonstra concordância com a literatura.

A utilização de uma proteína recombinante obtida por processo de desnaturação apresentou maior facilidade de obtenção/purificação e não interferiu na finalidade diagnóstica e desempenho do teste, pois a ureia foi removida por diálise. Além disso, como a proteína é utilizada como antígeno, suas atividades funcionais não são necessárias. O teste ELISA empregando os antígenos recombinantes produzidos através das diferentes metodologias demonstrou que não há diferenças quanto à sensibilidade e especificidade do teste utilizando os antígenos obtidos por condições nativas ou desnaturantes.

Os lotes de antígenos que continham outras proteínas além da fração de 19 kDa apresentaram desempenho semelhante no teste ELISA em termos de sensibilidade e especificidade, entretanto no *immunoblotting*, embora com as amostras de controles negativos não tenha sido visualizada nenhuma banda, as amostras de pacientes apresentaram reatividade também com outras frações.

Rodrigues e colaboradores (2003) avaliaram a capacidade de detecção sorológica e a utilidade do teste ELISA empregando proteínas recombinantes de *P. vivax*, produzidas em condições nativas, incluindo His₆-PvMSP1₁₉, obtendo sensibilidade de 93,5% em indivíduos naturalmente infectados e especificidade de 97,7%, em soros de indivíduos saudáveis e com outras doenças infecciosas. Esses dados corroboram os obtidos no presente estudo onde se obteve sensibilidade de 97,62% e especificidade variando entre 97,78% e 100,0% tanto para os antígenos recombinantes produzidos em condições nativas quanto para os desnaturantes. No

mesmo estudo, Rodrigues e colaboradores (2003) concluem que um teste ELISA utilizando uma proteína recombinante *PvMSP1₁₉* pode ser utilizado como base para o desenvolvimento de um ensaio sorológico para a detecção de malária por *P. vivax* na população brasileira.

Os três lotes do antígeno recombinante His₆-*PvMSP1₁₉* empregados na validação do teste ELISA, quando testados frente a maior número de amostras de pacientes com malária por *P. vivax*, apresentaram sensibilidade igual entre si (96,95%), próxima à obtida na padronização da produção (97,62%) e superior à obtida por Kudó (2006) (95,63%), que empregou antígeno em condições nativas. O percentual de 3,05% de falsos negativos detectado na população de amostras positivas estudada pode ser devido ao tempo decorrido a partir do início da infecção, pois nos indivíduos primoinfectados os anticorpos apresentam um grande aumento após uma a duas semanas do aparecimento dos sintomas (Seed et al., 2005b; Akpogheneta et al., 2008), podendo estar em níveis abaixo do limiar de detecção do teste antes desse período. A especificidade obtida em soros de indivíduos saudáveis foi 100,0%, tal como relatado por Kudó (2006). Quando se consideraram também os soros de indivíduos com outras doenças infecciosas, a especificidade foi 99,26%, superior à encontrada por Rodrigues et al. (2003) (97,7%) e Kudó (2006) (99,5%).

Em relação à reatividade cruzada, neste estudo, obtiveram-se falsos resultados positivos com doença de Chagas (5,88%) e fator reumatoide (6,67%), quando se utilizou o *cut-off* obtido considerando amostras de indivíduos saudáveis e de pacientes com malária por *P. vivax*. De modo semelhante, Rodrigues et al. (2003) encontraram reatividade cruzada com doença de Chagas, mas não com fator reumatoide, talvez devido ao menor número de amostras utilizadas (10), em relação a este estudo (30).

Além de sensibilidade e especificidade elevadas, outras características são importantes para que um teste sorológico seja aplicado com segurança. No estudo da repetitividade e da reprodutibilidade, a amostra positiva ensaiada no teste ELISA com os três lotes empregados na validação apresentou coeficiente de variação (CV) dentro do valor preconizado de >20% (repetitividade) e >25% (reprodutibilidade) (Meneghisse, 2007). Em relação à amostra negativa ensaiada, cujo valor de

densidade óptica é muito baixo, não foi possível calcular o CV, pois quanto menor a concentração do analito, no caso anticorpos anti-MSP1₁₉, maior será a imprecisão do teste e maior o CV nas repetições (Crowther, 2001). Deste modo, foi estabelecido que todos os valores da amostra negativa deveriam estar abaixo do *cut-off* do teste.

Os estudos de estabilidade do antígeno produzido apresentaram resultados satisfatórios em todos os parâmetros testados. Nas temperaturas de armazenamento do antígeno, 4°C e -20°C, os três lotes ensaiados se mostraram estáveis durante o período avaliado (60 dias), o mesmo ocorrendo à temperatura ambiente. Partindo do princípio de que 7 dias de estabilidade acelerada correspondem a 12 meses de estabilidade em condições normais de armazenamento (Meneghisse, 2007), a manutenção da estabilidade dos três lotes ensaiados a 37°C até o 16º dia, indica que os mesmos teriam validade de pelo menos 27 meses. Entretanto, não há legislações, tanto brasileiras quanto internacionais, que indiquem essa correlação (Meneghisse, 2007). O estudo de estabilidade à temperatura ambiente (TA), preconizado pela norma ABNT NBR 14.864 como teste de resistência do produto, simulando seu transporte e manuseio, mostrou resultados satisfatórios até o 60º dia (último dia testado). Os resultados de estabilidade obtidos com placas pré-sensibilizadas mostraram estabilidade por 30 dias (último período testado) a -20°C e a 4°C, facilitando a realização do teste e permitindo o fornecimento de placas sensibilizadas para outros laboratórios.

Como parte do controle de qualidade para a utilização do antígeno, é aconselhável que sejam realizados testes de estabilidade acelerada e em tempo real de cada lote produzido, e caso haja perda da estabilidade, deve-se investigar as causas (Meneghisse, 2007).

Para os ensaios clínicos, foram selecionadas amostras de Banco de Sangue dos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, não endêmicos para malária, onde ocorrem casos de malária importados tanto da área endêmica do Brasil, quanto de outros países e casos autóctones, que podem ser decorrentes de surtos ou da transmissão continuada em regiões de Mata Atlântica.

Os ensaios clínicos realizados neste estudo, empregando 1.309 amostras de Banco de Sangue do Estado de São Paulo, revelaram que 60% das amostras, com

sorologia positiva, eram de doadores de Pariquera-Açu e 7% de Taubaté, municípios localizados na região leste do estado, onde *An. (K.) cruzii* é o principal vetor (Duarte et al., 2013) e ocorre transmissão persistente. Os outros 33%, eram de municípios localizados nas regiões noroeste (Fernandópolis e Votuporanga), oeste (Presidente Prudente) e nordeste do estado (Sertãozinho), onde se encontram vetores do subgênero *Nyssorhynchus* e ocorrem surtos esporádicos. Estes dados são corroborados pelo estudo de Couto et al. (2010) que analisou os 821 casos autóctones de malária registrados no estado entre 1980 e 2007, sendo 91,6% na região leste com influência do bioma Mata Atlântica e 80,7% com baixas parasitemias. A região do bioma Mata Atlântica, apresentou maior número de infecções assintomáticas (10,4% x 1,5%) e por *P. vivax* (98,7% x 80,9%), comparada com o restante do estado (Couto et al., 2010), indicando menor risco de MTT, onde há maior proporção de sintomáticos.

Entre as 665 amostras de Bancos de Sangue do Estado do Rio de Janeiro, 45% das amostras positivas eram do município do Rio de Janeiro, bairro da Tijuca, onde está a Floresta da Tijuca, área de reflorestamento; 27% de Campos dos Goytacazes e outros 27% eram dos municípios de Petrópolis e Niterói, onde o bioma Mata Atlântica é encontrado no Parque Natural Municipal de Petrópolis e na Serra dos Órgãos (Petrópolis) e no Parque Estadual da Serra da Tiririca (Niterói). Estes resultados condizem com as informações de que, nesse estado, casos autóctones têm ocorrido em regiões turísticas montanhosas e perto da Mata Atlântica, onde as bromélias são abundantes e o vetor incriminado é *An. (K.) cruzii* (Oliveira-Ferreira et al., 2010; Brasil et al., 2013; Pina-Costa et al., 2014). Entre 2006-2008, três casos diagnosticados como *P. vivax*, pela GE e PCR, com sintomas leves e parasitemia baixa, eram de localidades situadas entre os municípios de Nova Friburgo e Guapimirim na "Serra dos Órgãos", na região da Mata Atlântica (Revisão em Oliveira-Ferreira et al., 2010). Além disso, dos 35 casos autóctones ocorridos no estado entre 2002 e 2010, sete foram no Município do Rio de Janeiro, um em Campos dos Goytacazes e um em Petrópolis (Miguel et al., 2014).

A ocorrência de malária autóctone no bioma Mata Atlântica e a proximidade de moradores ou visitantes propicia a infecção por *Plasmodium* de indivíduos que

podem permanecer assintomáticos por longos períodos, com baixas parasitemias e que, por não saber que estão infectados, candidatam-se à doação e podem ser considerados aptos, pois não são submetidos a testes laboratoriais, por não serem provenientes de região endêmica (Amazônia). Além disso, o caráter esporádico dos casos de MTT, aliado à ausência de sintomas e às baixas parasitemias, dificulta a detecção dos doadores infectados, de modo que a triagem epidemiológica realizada pelos serviços de hemoterapia pode não ser suficiente para impedir a transmissão (SUCEN 30 anos, 2006).

Na MTT, dependendo do número de parasitos do inóculo, os sintomas de malária podem demorar dias ou semanas para aparecerem (Seed et al., 2005a), o que pode levar ao óbito ou complicações sérias pela demora no tratamento. Além disso, baixas parasitemias podem não ser detectadas mesmo em métodos moleculares, pois são necessários 10 parasitos em uma bolsa para infectar um receptor.

Deste modo, as infecções assintomáticas na área de Mata Atlântica são um grande desafio em relação ao risco de MTT, como pode ser comprovado pelos acidentes transfusionais em que a partir de doador assintomático que havia visitado Iguape (região de costa de SP) dois anos antes da doação, originaram-se dois acidentes transfusionais devido à contaminação do sangue por *P. malariae*: um dos receptores, esplenectomizado veio a óbito e outro também diagnosticado com *P. malariae* permaneceu assintomático (Kirchgatter et al. 2005). Doadores assintomáticos infectados em Juititaba e Juquiá (região de Mata Atlântica) também foram responsáveis por MTT (Di Santi et al. 2005; Scuracchio et al. 2011). Além disso, a triagem de amostras de 56 candidatos à doação, assintomáticos e residentes em Juititaba, encontrou 53.6% de positividade pelo ELISA com *PvMSP1*₁₉, sendo dois casos positivos pela gota espessa, dos quais um foi positivo por PCR para *P. malariae* (Lima et al., 2014. Informação verbal). Nenhuma das 56 bolsas foi utilizada pelo banco de sangue. No Rio de Janeiro, dois casos de *P. malariae* foram relacionados com transfusões de sangue após a cirurgia ortopédica em clínica privada, porém o banco de sangue não identificou os doadores infectados da Mata Atlântica (Revisão em Pina-Costa et al., 2014).

É importante ressaltar que as amostras deste estudo foram colhidas entre 2002 e 2003 e obtidas de doadores já avaliados pela anamnese, conforme o padrão estipulado em cada serviço, desde que os mesmos fossem considerados aptos a doar. Cada serviço participante utilizou os seus próprios critérios de seleção de doadores com o intuito de diminuir o viés de seleção e representar uma estrutura mais próxima da rotina diária dos serviços (Wendel, 2005). Em relação à regulamentação nos Bancos de Sangue, na época dessas doações vigoravam, até dezembro de 2002, a Portaria 1.376 de 19/11/1993 do Ministério da Saúde e, a partir de dezembro de 2002, a RDC 343 de 13/12/2002 da ANVISA, que preconizavam para áreas não endêmicas, a exclusão de candidatos que, nos últimos 6 meses, tivessem estado em área endêmica com transmissão ativa e os que, nos últimos 3 anos, tivessem tido malária. Deveriam ser excluídos, definitivamente, candidatos que tivessem tido infecção por *P. malariae*. Em regiões endêmicas sem transmissão ativa, porém vulneráveis recomendavam o exame sorológico. A Portaria 1.376 de 19/11/1993, ainda definia que nas áreas endêmicas, sem transmissão, porém vulneráveis (entendendo-se, nesse caso, a existência de vetores que podem iniciar um foco malárico), deveriam ser excluídos candidatos que nos últimos 6 meses tivessem estado em áreas endêmicas com transmissão ativa ou que tivessem tido malária nos últimos 12 anos. Para áreas não endêmicas, a RDC 343 acrescentou a exclusão de candidatos que tivessem residido em áreas endêmicas nos últimos 3 anos.

A Portaria 2.712, atualmente em vigor, em relação às áreas não endêmicas, reduziu para até 30 dias o período em que o candidato é considerado inapto à doação de sangue, caso tenha se deslocado, ou seja, procedente de municípios localizados em áreas endêmicas. Após esse período e até 12 meses do deslocamento, torna-se apto, sendo necessária a realização de testes de detecção do plasmódio ou de antígenos plasmodiais. Após 12 meses, não há necessidade de realização de testes de detecção. Entretanto, a eliminação dos parasitos em indivíduos semi-imunes varia, sendo *P. falciparum* geralmente eliminado em 2 anos, *P. vivax* e *P. ovale*, dentro de 3 anos e *P. malariae* podendo persistir por décadas. *P. malariae* e *P. vivax* são as espécies mais frequentemente associadas com MTT (Seed et al., 2005b). Como resultado da persistência assintomática dos parasitos, foram relatados casos de MTT em que houve transmissão por *P. malariae*, 44 anos depois da saída da área

endêmica (Mungai et al., 2001), por *P. falciparum*, após 8 anos (Kitchen et al., 2005) e por *P. vivax*, após 5 anos (Mungai et al., 2001). Em conjunto, esses relatos indicam que o período de 12 meses preconizado na regulamentação brasileira pode não ser suficiente para dispensar o candidato da realização de exame laboratorial para malária. Além disso, a legislação vigente não contempla áreas de baixa endemicidade em que ocorrem casos autóctones com transmissão continuada, como é o caso das regiões de Mata Atlântica.

Com a finalidade de tornar as transfusões cada vez mais seguras, embora não isentas de risco, várias estratégias são utilizadas para reduzir o risco de transmissão dos agentes infecciosos, como triagem clínica baseada em fatores de risco, uso de marcadores sorológicos e moleculares e de substâncias que inviabilizam os agentes (Allain et al., 2009).

Nas infecções por *Plasmodium*, os anticorpos são produzidos por praticamente todos os indivíduos, estando, geralmente, em título elevado durante a parasitemia. Além disso, como os doadores implicados em MTT são invariavelmente semi-imunes, o emprego de um teste sorológico sensível poderia excluir os doadores positivos. Porém, devido à persistência desses anticorpos, por períodos variáveis, mesmo após o clareamento da parasitemia, doadores curados também poderiam ser excluídos. O impacto dessa perda dependeria da prevalência de doadores soropositivos e da especificidade do teste empregado (Seed et al., 2005a). Entretanto, devido às baixas parasitemias observadas nos doadores implicados em MTT, sua detecção mesmo por métodos sensíveis de pesquisa de antígeno ou PCR pode não ser garantida e, em muitos casos é pouco provável, pois a estima-se que um a 10 parasitos por unidade de sangue seja suficiente para transmitir a infecção (Seed et al., 2005b; Pereira et al., 2011). A alta infectividade de inóculos pequenos na MTT pode ser explicada, pela ausência de esporozoítos e da fase hepática que, na infecção natural, desencadeiam resposta imune que colabora no controle da parasitemia, o que não ocorre na MTT, pois as hemácias infectadas são inoculadas diretamente (Pereira et al., 2011).

Como exemplo, o emprego de teste imunoenzimático para a pesquisa de anticorpos permitiu aos bancos de sangue da Austrália reduzir o período de restrição

para componentes celulares, de doadores com risco declarado de malária, de 12-36 meses para 6 meses (Seed et al., 2005b), e a partir de 2005 para 4 meses (Seed et al., 2010). Essa estratégia que combina ELISA comercial, com antígenos recombinantes de *P. falciparum* e *P. vivax*, e restrição para componentes celulares de quatro meses, mostrou ser eficaz e segura, não tendo sido registrados casos de MTT, desde 1991 (Seed et al., 2010).

Em regiões não endêmicas ou de baixa endemicidade, os testes sorológicos podem ser úteis na detecção de doadores assintomáticos, embora a triagem sorológica universal nem sempre apresente uma boa relação custo-benefício. Uma triagem direcionada a doadores de risco com base em questionário, pode aumentar a relação custo-efetividade da sorologia (Seed et al., 2005b). Segundo Kitchen et al. (2014) áreas não endêmicas que não utilizam a pesquisa de anticorpos para malária na triagem de doadores devem considerar cuidadosamente a coleta de doações de indivíduos previamente residentes em países endêmicos pois a exclusão temporária é insuficiente. Entretanto, é de grande importância salientar que testes imunoenzimáticos empregando antígenos nativos e recombinantes, embora sensíveis e específicos na detecção de anticorpos circulantes, nem sempre se correlacionam com parasitemia (Slinger et al., 2001; Kitchen e Chiodini, 2006), pois os anticorpos podem persistir por períodos variáveis após o clareamento da parasitemia (Seed et al., 2005a; Clark et al., 2012). Entre os indivíduos positivos para anticorpos anti-*PvMSP1₁₉* durante episódio de malária, 44,4% tornavam-se negativos e 44,4% diminuam os títulos, no período de dois meses após o tratamento (Soares et al., 1999d).

Com base nos resultados obtidos e nas características da malária que ocorre no bioma Mata Atlântica, percebe-se que os bancos de sangue de áreas não endêmicas se deparam com o desafio de identificar os candidatos a doadores que representem risco e encaminhá-los para realização de testes laboratoriais para malária. Propõe-se, portanto que, em relação aos candidatos procedentes de áreas endêmicas, além de seguir a Portaria 2.712, sejam introduzidos critérios de seleção, para doadores procedentes de áreas consideradas não endêmicas, que contemplem a região geográfica e antecedente, identificando candidatos que tenham entrado em

contato com a Mata Atlântica, seja por residência, turismo, trabalho, etc. Esses seriam submetidos a testes laboratoriais de triagem e confirmação. O teste ELISA validado neste estudo mostrou ser sensível e específico e, portanto aplicável à triagem de amostras de banco de sangue em áreas não endêmicas.

Para complementação do estudo, propõe-se a produção do antígeno recombinante MSP1₁₉ de *P. malariae* e *P. falciparum* e a realização das demais amostras de banco de sangue de que se dispõe. A comparação com os resultados obtidos em estudo com amostras de sangue dos mesmos doadores, submetidas a metodologias moleculares, fornecerão subsídios complementares para recomendar o teste ELISA como teste de triagem.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- a) A partir do plasmídeo pET14b-*PvMSP1*₁₉, foi padronizada a produção da proteína recombinante His₆-*PvMSP1*₁₉, por processo de desnaturação, obtendo-se antígeno puro, com bom rendimento e alta estabilidade;
- b) Utilizando-se o antígeno His₆-*PvMSP1*₁₉, padronizou-se e validou-se teste imunoenzimático ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*P. vivax* que apresentou sensibilidade, especificidade e eficiência adequados para a triagem sorológica;
- c) Na validação do teste, obteve-se reprodutibilidade e repetitividade compatíveis aos valores desejáveis para a finalidade de triagem sorológica;
- d) Nos ensaios com amostras de Bancos de Sangue, a maior prevalência de reagentes nos Municípios em contato com o bioma Mata Atlântica (SP e RJ) estão de acordo com a ocorrência de casos de malária autóctones e assintomáticos nessas regiões e sugerem a necessidade de estratégias adicionais para a triagem de doadores que tenham tido algum contato com essas áreas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Akpogheneta OJ, Duah NO, Tetteh KKA, Dunyo S, Lanar DE, Pinder M, et al. Duration of naturally acquired antibody responses to blood stage *Plasmodium falciparum* is age dependent and antigen specific. *Infect Immun*. 2008;76:1748-55.
- Allain JP, Stramer SL, Carneiro-Proietti AB, Martins ML, Lopes da Silva SN, Ribeiro M, et al. Transfusion-transmitted infectious diseases. *Biol*. 2009;37:71-7.
- 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.
- Alves FP, Gil LH, Marrelli MT, Ribolla PE, Camargo EP, Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium spp.* as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 2005;42:777-9.
- Aly AS, Vaughan AM, Kappe SH. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu Rev Microbiol*. 2009;63:195-221.
- Andrade AL, Martelli CM, Oliveira RM, Arias JR, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infect Dis*. 1995;20:475.
- 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. *Malar J*. 2013;4:12-308.
- Arévalo-Herrera M, Herrera, S. *Plasmodium vivax* malaria vaccine development. *Mol Immunol*. 2001;38:443-55.
- Aubouy A, Migot-Nabias F, Deloron P. Correlations between treatment outcome and both anti-MSP119 antibody response and erythrocyte-related genetic factors in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Genet Evol*. 2007;7:147-54.
- Ávila SLM, Tozetto-Mendoza TR, Arruk VG, Ferreira AW. Standardization of procedures of *Plasmodium falciparum* antigen preparation for serologic tests. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998;40:309-16.

Babon JJ, Morgan WD, Kelly G, Eccleston JF, Feeney J, Holder AA. Structural studies on *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;153:31-40.

Bargieri DY, Rosa DS, Braga CJM, Carvalho BO, Costa FTM, Espíndola NM, et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. *Vaccine*. 2008;26:6132–42.

Bargieri DY, Leite JA, Lopes SCP, Sbrogio-Almeida ME, Braga CJM, Ferreira LCS, et al. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of *Salmonella typhimurium*. *Vaccine*. 2010;28:2818-26.

Barker RH Jr, Banchongaksorn T, Courval JM, Suwonkerd W, Rimwungtragoon K, Wirth DF. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;46:416-26.

Beeson JG, Osier FH, Engwerda CR. Recent insights into humoral and cellular immune responses against malaria. *Trends Parasitol*. 2008;24:578-84.

Birkenmeyer L, Muerhoff S, Dawson G, Desai S. Isolation and characterization of the MSP1 gene from *Plasmodium malariae* and *ovale*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:(6 Suppl.):282-83.

Birkenmeyer L, Muerhoff AS, Dawson GJ, Desai SM. Isolation and Characterization of the MSP1 Genes from *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:996-1003.

Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med*. 1990;172:379-82.

Blackman MJ, Ling IT, Nicholls SC, Holder AA. Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;49:29-34.

Blackman MJ, Holder AA. Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1) by a calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSP1. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;50:307.

Blackman MJ, Scott-Finnigan TJ, Shai S, Holder AA. Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein. *J Exp Med.* 1994;180:389-93.

Bousema T, Roeffen W, Meijerink H, Mwerinde H, Mwakalinga S, van Gemert GJ, et al. The dynamics of naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens *Pfs230* & *Pfs48/45* in a low endemic area in Tanzania. *PLoS One.* 2010;29:5(11):e14144.

Boyle MJ, Richards JS, Gilson PR, Chai W, Beeson JG. Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Blood.* 2010;3:115(22):4559-68.

Branch OH, Udhayakumar V, Hightower AW, Oloo AJ, Hawley WA, Nahlen BL, et al. A longitudinal investigation of IgG and IgM antibody responses to the merozoite surface protein-1 19-kiloDalton domain of *Plasmodium falciparum* in pregnant women and infants: associations with febrile illness, parasitemia, and anemia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58:211-19.

Brasil. Fundação Serviços de Saúde Pública (FSESP). Divisão de Epidemiologia. *Boletim Epidemiológico.* 1983;10;11:93-5.

Brasil. Ministério da Saúde. FNS: Publicações Técnicas e Científicas. In: *Guia de Vigilância Epidemiológica - Malária.* 4.ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 1998;5:284-94.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Publicações Técnicas e Científicas. *Evolução temporal das doenças de notificação compulsória de 1980 a 1998. Boletim Epidemiológico.* Brasília: Ministério da Saúde, 1999. [acessado em 8 de março de 2014].p17-18. (Edição Especial). Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epi_edicao_especial.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Projetos, Programas e Relatórios 2.^a edição revista e ampliada: *Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na Amazônia Legal – PIACM.* 2.ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e parasitárias: Guia de Bolso. Secretaria de Vigilância em Saúde. 6.ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2005a.

Brasil. Diretoria Colegiada. Resolução - CNS nº 347, de 13 de janeiro de 2005. Aprova as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisa que envolva armazenamento de materiais ou uso de materiais armazenados em pesquisas anteriores. Diário Oficial da União, Brasília, 10 mar. 2005b.

Brasil. Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2010.

Brasil P, Costa AP, Longo CL, da Silva S, Ferreira-da-Cruz MF, Daniel-Ribeiro CT. Malaria, a difficult diagnosis in a febrile patient with sub-microscopic parasitaemia and polyclonal lymphocyte activation outside the endemic region, in Brazil. Malar J. 2013;7:12-402.

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Situação Epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2011. [Internet]. Brasília (DF). Ministério da Saúde, 2013a. [citado 2014 Fev 18]. 44:1. Disponível em: http://www.epi.uff.br/wp-content/uploads/2013/08/boletim_1_de_2013_malaria.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.712, de 12 de novembro de 2013. “Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos”. Diário Oficial da União, Brasília, 13nov. 2013b. Seção 1:106.

Brasil. Boletim *on line* da Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. 2013c. [acessado em 17 de fevereiro de 2014]. Disponível em: http://public.tableausoftware.com/profile/jurossi#!/vizhome/RotinaExtra/1_Serie_an_o

Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Notificação de casos: Resumo Epidemiológico Nacional Mensal. [Internet]. Brasília (DF). Ministério da Saúde, 2014. [citado 2014 Ago 20]. Disponível em: <http://dw.saude.gov.br/gsid/servlet/mstrWeb?evt=2048001&documentID=AC2B0F5041CEEC8C671FA39D5337A697&server=srvbipdf03&project=DMMalaria&uid=convidado&pwd=datusus&hiddensections=header,path,dockTop,dockLeft,footer>.

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;5:12-439.

Bruce-Chwatt LJ. *Essential Malariology*. London: William Heinemann Medical Books Ltd; 1980.

Camargo EP. A malária encenada no grande teatro social. *Estud Av. São Paulo.* 1995;9(24):211-28.

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 Publ.* 1985;1:250-2.

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 Publ.* 1988;4:276-92.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Division of Parasitic Diseases. Malaria. Parasites. 2012. [acessado em 7 de junho de 2014]. Disponível em <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/parasites.html>.

Chappel JA, Holder AA. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;60:303-12.

Clark EH, Silva CJ, Weiss GE, Li S, Padilla C, Crompton PD, et al. *Plasmodium falciparum* malaria in the Peruvian Amazon, a region of low transmission, is associated with immunologic memory. *Infect Immun.* 2012;80:1583-92.

Cochrane AH, Nardin EH, De Arruda M, Maracic M, Clavijo P, Collins WE, et al. Widespread reactivity of human sera with a variant repeat of the circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43:446-51.

Coelho JS, Soares IS, Lemos EA, Jimenez MC, Kudó ME, Moraes SL, et al. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;58:223-30.

Coffey R, Birkenmeyer L, Dille B, Haller A, Mbanya D, Kaptue L, et al. Seroprevalence of *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *malariae* and *ovale* antibodies among blood donors from Cameroon. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79:(6 Suppl.):283.

Cohen S, McGregor IA, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961;25:192:733-7.

Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:579-92.

Contreras CE, Pance A, Marcano N, Gonzles N, Bianco N. Detection of Specific Antibodies to *Plasmodium falciparum* in Blood Bank Donors from Malaria Endemic and Non-endemic Areas of Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:948-53.

Cook J, Reid H, Iavro J, Kuwahata M, Taleo G, Clements A, et al. Using serological measures to monitor changes in malaria transmission in Vanuatu. *Malar J*. 2010;9:169.

Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol*. 2007;23:575-82.

Costa AP, Bressan CS, Pedro RS, Valls-de-Souza R, Silva Sd, Souza PR, et al. Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43:571-74.

Costa-Nascimento MJ, Toniolo CRC, Lima GFMC, Arajo RAS, Kirchgatter K, Wunderlich G, et al. Malria autctone em regio de Mata Atlntica do Estado de So Paulo: benignidade ou risco oculto? In: III Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, 2006. Sociedade Paulista Parasitologia; Ubatuba. Resumos.

Coura JR, Surez-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 RD, Latorre Mdo R, Di Santi SM, Natal D. Autochthonous malaria notified in the State of So Paulo: clinical and epidemiological characteristics from 1980 to 2007. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43:52-8.

Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15:595-612.

Cox-Singh J, Davis TME, Lee K-S, Shamsul SSG, Matusop A, Ratnam S, et al. *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clin Infect Dis*. 2008;46:165-71.

Crowther JR. The ELISA Guidebook. 2.ed. Humana Press; 2001. Methods in Molecular Biology. Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases. p.301-45.

Cunha MG, Rodrigues MM, Soares IS. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉, expressed in distinct bacterial vectors. *Vaccine*. 2002;20:385-96.

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.

Deane LM. Simian malaria in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1992;87:1-20.

Değirmenci A, Döşkaya M, Caner A, Nergis S, Gül K, Aydınok Y, et al. Action plan to regain unnecessary deferred blood donors due to malaria risk in Turkey. *Transfus Apher Sci*. 2012;46:269-75.

Del Portillo HA, Longacre S, Khouri E, Davi PH. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:4030-34.

Di Santi SM, Boulos M. Protozoários - Malária. In: Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia humana e seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Atheneu; 1999. p.375.

Di Santi SM, Carvalho ME, Costa MJ, Kirchgatter K, Pereira BF, Toniolo C et al. Malária transfusional causada por *Plasmodium malariae* transmitido por doador assintomático infectado na mata atlântica do Estado de São Paulo. *Rev Soc Brasil Med Trop*. 2005;38:333.

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.

Dodoo D, Theander TG, Kurtzhals JA, Koram K, Riley E, Akanmori BD, et al. Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria. *Infect Immun*. 1999;67:2131-7.

Duarte AM, Malafronte RS, Cerutti C Jr, Curado I, Paiva BR, Maeda AY, et al. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008;107:179-85.

Duarte AM, Pereira DM, de Paula MB, Fernandes A, Urbinatti PR, Ribeiro AF, et al. Natural infection in anopheline species and its implications for autochthonous malaria in the Atlantic Forest in Brazil. *Parasit Vectors*. 2013;7:6:58.

Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW, McFadden GI, et al. Phenotypic variation of *Plasmodium falciparum* merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes. *EMBO J*. 2003;22:1047-57.

Echeverri D, Barreto DK, Osorio L, Cortés A, Martínez E. A case report of transfusion-transmitted *Plasmodium vivax* malaria from an asymptomatic donor to a premature newborn. *Biomedica*. 2012;32(1 Suppl):8-12.

Elghouzzi MH, Senegas A, Steinmetz T, Guntz P, Barlet V, Assal A, et al. Multicentric evaluation of the DiaMed enzyme-linked immunosorbent assay malaria antibody test for screening of blood donors for malaria. *Vox Sang*. 2008;94:33-40.

Faddy HM, Seed CR, Faddy MJ, Flower RL, Harley RJ. Malaria antibody persistence correlates with duration of exposure. *Vox Sang*. 2013;104:292-8.

Fandeur T, Volney B, Peneau C, Thoisy B. Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum*/*P. malariae* malaria. *Parasitology*. 2000;120:11-21.

Fernando SD, Navaratne CJ, Galappaththy GN, Abeyasinghe RR, Silva N, Wickermasinghe R. The importance of accuracy in diagnosis of positive malaria cases in a country progressing towards malaria elimination. *J Glob Infect Dis*. 2013;5:127-30.

Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. São Paulo: Guanabara Koogan; 2001. Sorologia: Importância e Parâmetros.

Ferreira AW, Sanchez MCA. Malária humana: Padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos epidemiológicos. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1989;31:526.

Fowkes FJ, Richards JS, Simpson JA, Beeson JG. The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: A systematic review and meta-analysis. PLoS Med. 2010;19:7(1):e1000218

Freimanis G, Sedegah M, Owusu-Ofori S, Kumar S, Allain JP. Investigating the prevalence of transfusion transmission of *Plasmodium* within a hyperendemic blood donation system. Transfusion. 2013;53(7):1429-41.

Frey-Wettstein M, Maier A, Markwalder K, Münch U. A case of transfusion transmitted malaria in Switzerland. Swiss Med Wkly. 2001;2;131(21-22):320.

Garraud O, Assal A, Pelletier B, Danic B, Kerleguer A, David B et al. Overview of revised measures to prevent malaria transmission by blood transfusion in France. Vox Sang. 2008;95:226–31.

Good MF. Vaccine-induced immunity to malaria parasites and the need for novel strategies. Trends Parasitol. 2005;21:29-34.

Grande R, Petrini G, Silvani I, Simoneschi B, Marconi M, Torresani E. Immunological testing for malaria and blood donor deferral: the experience of the Ca' Granda Polyclinic Hospital in Milan. Blood Transfusion. 2011;9:162-6.

Grant DB, Perinpanayagam MS, Shute PG, Zeitlin RA. A case of malignant tertian (*Plasmodium falciparum*) malaria after blood-transfusion. Lancet. 1960;2:249-70.

Graves PM, Boreham R, Robert G, Fray L, Xu LJ, Huang YM, et al. Antibody detection ELISAS for malaria diagnosis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1992;23:752-61.

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.

Hadley TJ. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. Annu Rev Microbiol. 1986;40:451-77.

Harbach RE. The Phylogeny and Classification of *Anopheles*. In: Manguin S. *Anopheles* mosquitoes - New insights into malaria vectors. ISBN: 978-953-51-1188-7. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/the-phylogeny-and-classification-of-anopheles>.

Harrison G. Mosquitoes, Malaria and Man: a History of the Hostilities since 1880. Med Hist 1978;23:360.

Hirunpetcharat C, Tian J-H, Kaslow DC, Van Rooijen N, Kumar S, Berzofsky JA, et al. Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton Carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1₁₉) of *Plasmodium yoelli* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: Correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4⁺ cells. *J Immunol.* 1997;159:3400-11.

Holder AA. The precursor to major merozoite surface antigens: structure and role in immunity. *Prog Allergy.* 1988;41:72-97.

Hutton EL, Shute PG. The risk of transmitting malaria by blood transfusion. *J Trop Med Hyg.* 1939;42:309-12.

Iyer J, Gruner AC, Renia L, Snounou G, Preiser PR. Invasion of host cells by malaria parasites: a tale of two protein families. *Mol Microbiol.* 2007;65:231–49.

Jones AS, Ferreira Neto JA. Symptomless *Plasmodium vivax* parasitaemias and malaria eradication in Santa Catarina State, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. trop.* 1971;5:21-35.

Kanunfre KA. Desempenho de metodologia molecular no diagnóstico da malária em amostras de sangue de indivíduos de área endêmica do Brasil [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

Karunaweera ND, Wijesekera SK, Wanasekera D, Mendis KN, Carter R. The paroxysm of *Plasmodium vivax* malaria. *Trends Parasitol.* 2003;19:188-93.

Kaslow DC, Hui GSN, Kumar S. Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein (MSP1₁₉) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;63:283-9.

Kaur P, Basu S. Transfusion-transmitted infections: Existing and emerging pathogens. *J Postgrad Med.* 2005;51:146-51.

Kerlin DH, Gatton ML. Preferential invasion by *Plasmodium* merozoites and the self-regulation of parasite burden. *PLoS One.* 2013; 8(2):e57434.

Kinyanjui SM, Conway DJ, Lanar DE, Marsh K. IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J.* 2007;6:82.

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 AD, Lowe PHJ, Lalloo K, Chiodini PL. Evaluation of a malarial antibody assay for use in the screening of blood and tissue products for clinical use. *Vox Sang*. 2004;87:150–5.

Kitchen A, Mijovic A, Hewitt P. Transfusional transmitted malaria: current donor selection guidelines are not sufficient. *Vox Sang*. 2005;88:200-1.

Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang*. 2006;90:77-84.

Kitchen AD, Chiodini PL, Tossell J. Detection of malarial DNA in blood donors-evidence of persistent infection. *Vox Sang*. 2014;107:123-31.

Kitua AY, Urassa H, Wechsler M, Smith T, Vounatsou P, Weiss NA, et al. Antibodies against *Plasmodium falciparum* vaccine candidates in infants in an area of intense and perennial transmission: relationships with clinical malaria and with entomological inoculation rates. *Parasite Immunol*. 1999;21:307-17.

Knell AJ. *Malaria*. Oxford: University Press;1991.

Krotoski WA. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog. Clin. Parasitol*. 1989;1:1-19.

Kudó ME. Níveis e avidéz de anticorpos IgG específicos para a porção de 19kDa da região C-terminal da proteína-1 de superfície de merozoítos de *P. vivax* (MSP1₁₉) em grupos populacionais expostos à malária [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2006.

Kumar S, Collins W, Egan A, Yadava A, Garraud O, Blackman M, et al. Immunogenicity and efficacy in *Aotus* monkeys of four recombinant *Plasmodium falciparum* vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-Kilodalton C terminus of Merozoite Surface Protein 1. *Infect Immun*. 2000;68:2215–23.

Ladeia-Andrade S. Aspectos Epidemiológicos da Malária no Parque Nacional do Jaú, Amazonas, Brasil [tese]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, 2005.

Ladislau JLB, Leal MC, Tauil PL. Avaliação do Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária na região da Amazônia Legal, Brasil, no contexto da descentralização. *Epidemiol Serv Saúde*. 2006;15:9–20.

Laemmli UK, 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4*. *Nature*. 227:680-5.

Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas AM, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunol*. 2008;9:725-32.

Lazarou M, Patiño JA, Jennings RM, McIntosh RS, Shi J, Howell S, et al. Inhibition of erythrocyte invasion and *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 processing by human immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG3 antibodies. *Infect Immun*. 2009;77:5659-67.

Lee YH, Lee HK, Choi KH, Hah JO, Lim SY. Transfusion-induced malaria in a child after open heart surgery in Korea. *J Korean Med Sci*. 2001;16:789-91.

Li J, Collins WE, Wirtz RA, Rathore D, Lal A, McCutchan TF. Geographic subdivision of the range of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Emerg Infect Dis*. 2001;2:35-42.

Lima GF, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MC, Segurado AA, Hristov AD, et al. 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 Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106:691-700.

Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva *ROC* para testes diagnósticos. *Cad Saúde Colet*. 2003;11:7-31.

Medeiros MM, Fotoran WL, dalla Martha RC, Katsuragawa TH, Pereira da Silva LH, Wunderlich G. Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens MSP5, MSP9 and EBA175 is associated to clinical protection in the Brazilian Amazon. *BMC Infect Dis*. 2013;28;13:608.

Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;64(1-2 Suppl):97-106.

Meneghisse CS. Boas práticas de fabricação e o processo de validação no desenvolvimento e produção de kit imunodiagnóstico [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo;2007.

Miguel RB, Peiter PC, Albuquerque H, Coura JR, Moza PG, Costa AP, et al. Malaria in the state of Rio de Janeiro, Brazil, an Atlantic Forest area: an assessment using the health surveillance service. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:634-40.

Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol*. 1994;47:740-2.

Moody A. Rapid Diagnostic Test for Parasites. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15: 66-78.

Moraes SL, Di Santi SM, Sanchez MCA. Malária. In: Ferreira AW, Moraes SL. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.24:284-97.

Morais CG, Soares IS, Carvalho LH, Fontes CJF, Krettly AU, Braga EM. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. *Parasitol Res*. 2005;95:420-6.

Morgan WD, Kragt A, Feeney J. Expression of deuterium-isotope-labelled protein in the yeast *Pichia pastoris* for NMR studies. *J Biomol NMR*. 2000;17:337–47.

Moss DK, Remarque EJ, Faber BW, Cavanagh DR, Arnot DE, Thomas AW, et al. *Plasmodium falciparum* 19-Kilodalton Merozoite Surface Protein 1 (MSP1)-Specific Antibodies That Interfere with Parasite Growth In Vitro Can Inhibit MSP1 Processing, Merozoite Invasion, and Intracellular Parasite Development. *Infect Immun*. 2012;80:1280–87.

Mueller I, Galinski MR, Tsuboi T, Arevalo-Herrera M, Collins WE, King CL. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. *Adv Parasitol*. 2013;81:77-131.

Muerhoff AS, Birkenmeyer LG, Coffey R, Dille BJ, Barnwell JW, Collins WE et al. Detection of *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, and *P. malariae* merozoite surface protein 1-p19 antibodies in human malaria patients and experimentally infected nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:1631-8.

Muerhoff S, Birkenmeyer L, Coffey R, Dille B, Haller A, Dawson G, et al. Utility of MSP1-19 recombinant antigens for detection of antibodies to *Plasmodium falciparum*, *ovale*, *malariae* e *vivax*. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:(6 Suppl.):283.

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.

Nam MH, Kim JS, Cho CH, Han ET, Lee WJ, Lee HK, et al. Evaluation of *Plasmodium vivax* ELISA for the blood screen. *Trop Med Int Health*. 2010;15:1436-41.

National Center for Biotechnology Information. Taxonomy browser. Bethesda : NCBI; 2014. [cited 2014 Mar 5]. Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=418103>

Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Tiono AB, Konate AT, Gansane A, et al. Humoral and cell-mediated immunity to MSP3 peptides in adults immunized with MSP3 in malaria endemic area, Burkina Faso. *Parasite Immunol*. 2009;31:474-80.

Neghina R, Neghina AM, Marincu I, Iacobiciu I. Malaria, a journey in time: in search of the lost myths and forgotten stories. *Am J Med Sci*. 2010;340:492-8.

Neves A, Urbinatti PR, Malafronte RS, Fernandes A, Paganini WS, Natal D. Malaria outside the Amazon region: natural *Plasmodium* infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil. *Acta Trop*. 2013;125:102-6.

Nogueira PA, Alves FP, Fernandez-Becerra C, Pein O, Santos NR, Silva LHP da, et al. A Reduced Risk of Infection with *Plasmodium vivax* and Clinical Protection against Malaria Are Associated with Antibodies against the N Terminus but Not the C Terminus of Merozoite Surface Protein. *Infect Immun*. 2006;74:2726-33.

Noubouossie D, Tagny CT, Same-Ekobo A, Mbanya D. Asymptomatic carriage of malaria parasites in blood donors in Yaoundé. *Transfus Med*. 2012;22:63-7.

O'Donnell RA, Koning-Ward TF, Burt RA, Bockarie M, Reeder JC, Cowman AF, et al. Antibodies against Merozoite Surface Protein (MSP)-1₁₉ are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *J Exp Med*. 2001;193:1403-12.

Oduro AR, Conway DJ, Schellenberg D, Satoguina J, Greenwood BM, Bojang KA. Seroepidemiological and parasitological evaluation of the heterogeneity of malaria infection in the Gambia. *Malar J*. 2013;12:222.

Oh JS, Kim JS, Lee CH, Nam DH, Kim SH, Park DW, et al. Evaluation of a malaria antibody enzyme immunoassay for use in blood screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008;103:75-8.

Oliveira JPA, Zicker F, Pang L. High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clin Infect Dis*. 1995;20:15.

Oliveira-Ferreira J, Lacerda MV, Brasil P, Ladislau JL, Tauil PL, Daniel-Ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;30;9:115.

Owusu-Agyei S, Smith T, Beck HP, Amenga-Etego L, Felger I. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic inhabitants of a holoendemic malarious area in northern Ghana. *Trop Med Intern Health*. 2002;7:421-8.

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;15;51(10):1192-8.

Padley DJ, Heath AB, Sutherland C, Chiodini PL, Baylis SA and the Collaborative Study Group. Establishment of the 1st World Health Organization International Standard for *Plasmodium falciparum* DNA for nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays. *Malar J*. 2008;7:139.

Park JW, Moon SH, Yeom JS, Lim KJ, Sohn MJ, Jung WC, et al. Naturally acquired antibody responses to the C-terminal region of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* in Korea. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8:14-20.

Pasay MC, Cheng Q, Rzepczyk C, Saul A. Dimorphism of the C terminus of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1995;70:217-9.

Pereira BI, Nazareth C, Malcata L, Aves H, Fernández JR, Sargento C, et al. Infecções Parasitárias Transmitidas por Transusão de Sangue Qual o Risco nos Países Não Endêmicos? *Acta Med Port*. 2011;24:897-906.

Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the immune system in humans. *Chem Immunol*. 2002;80:229-42.

Persson KE, McCallum FJ, Reiling L, Lister NA, Stubbs J, Cowman AF, et al. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest*. 2008;118:342-51.

Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, et al. Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:618-33.

Pinotti M. The biological basis for the campaign against the malaria vectors of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1951;44:663-82.

Planson AG, Guijarro JI, Chaffotte AF. New Insights for Native Production of MSP1₁₉, the Disulfide-Rich C-Terminal Fragment from *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 1. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57086.

Prudêncio M, Rodriguez A, Mota MM. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4:849-56.

Reesink HW, Panzer S, Wendel S, Levi JE, Ullum H, Ekblom-Kullberg S, et al. The use of malaria antibody tests in the prevention of transfusion-transmitted malaria. *Vox Sang*. 2010;98:468-78.

Retief F, Cilliers L. Periodic pyrexia and malaria in antiquity. *S Afr Med J*. 2006;96:684, 686-8.

Riccio EK, Totino PR, Pratt-Riccio LR, Ennes-Vidal V, Soares IS, Rodrigues MM, et al. Cellular and humoral immune responses against the *Plasmodium vivax* MSP-1₁₉ malaria vaccine candidate in individuals living in an endemic area in north-eastern Amazon region of Brazil. *Malar J*. 2013;16;12:326.

Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira Jr OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* using recombinant of the merozoite surface protein-1. *Malaria J*. 2003;2:39-45.

Roll Back Malaria Partnership. The global malaria action plan for a malaria-free world. Geneva : World Health Organization; 2008. [cited 2014 Aug 23] Available from: <http://www.rbm.who.int/gmap/gmap.pdf>

Rosa DS, Iwai LK, Tzelepis F, Bargieri DY, Medeiros MA, Soares IS, et al. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). *Microbes Infect*. 2006;8:2130-7.

Ross R. An improved method for microscopical diagnosis of intermittent fevers. *Lancet*. 1903;1:86-7.

Ruan W, Lei YL, Yao LN, Zhang LL, Liu XH, Xiang XQ, et al. Tracing investigation and diagnosis of one transfusion-transmitted malaria case in Zhejiang Province. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2014;32:54-7.

Sachdeva S, Ahmad G, Malhotra P, Mukherjee P, Chauhan VS. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 19- and 42-Kilodalton Fragments Expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 2004;72:5775–82.

Sáez-Alquézar A, Ramos AMSV, Di Santi SM, Branquinho MS, Kirchgatter K, Cordeiro IAC, et al. Controle da malária transfusional em região endêmica e não-endêmica no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998;31:27-34.

Sanchez MCA, Ávila SLM, Quartier VP, Ferreira AW. Malaria serology: performance of six *Plasmodium falciparum* antigen extracts and of three ways of determining serum titers in IgG and IgM-ELISA. *Rev Inst Med trop. São Paulo*. 1993;35:495-502.

Sanchez MCA, Quartier VP, Di Santi SM, Boulos M, Ferreira AW. Otimização do teste de imunofluorescência indireta na sorologia da malária humana. In: XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - IV Congresso da Sociedade Brasileira de Infectologia, 1987. *Rev Soc Bras Med Trop Curitiba* 1987;20:69-70.

Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Moraes SL. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2013.4:284-97

São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Distribuição do nº de casos confirmados autóctones de malária, segundo município provável de infecção - ESP - 2012 a 2014. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, 2014. [acessado em 3 de agosto de 2014]. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/dados/malaria_cautoctone.pdf.

Schofield L, Mueller I. Clinical immunity to malaria. *Curr Mol Med*. 2006;6:205-21.

Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, et al. Transfusion transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53:55-9.

Seed CR, Cheng A, Davis TM, Bolton WV, Keller AJ, Kitchen A, et al. The efficacy of a malarial antibody enzyme immunoassay for establishing the reinstatement status of blood donors potentially exposed to malaria. *Vox Sang*. 2005a;88:98-106.

Seed CR, Kitchen A, Davis TM. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfus Med Rev.* 2005b;19:229-40.

Seed CR, Kee G, Wong T, Law M, Ismay S. Assessing the safety and efficacy of a test-based, targeted donor screening strategy to minimize transfusion transmitted malaria. *Vox Sang.* 2010;98:182-92.

Shai S, Blackman MJ, Holder AA. Epitopes in the 19kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1 (PfMSP-1(19) recognized by human antibodies. *Parasite Immunol.* 1995;17:269-75.

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.

Slinger R, Giulivi A, Bodie-Collins M, Hindieh F, John RS, Sher G, et al. Transfusion-transmitted malaria in Canada. *CMAJ.* 2001;164:377–9.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58:283-92.

Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun.* 1997;65:1606-14.

Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of the naturally acquired antibody responses to the N-and C-terminal regions of *P. vivax* MSP1. *Am J Trop Med Hyg.* 1999a;60:357-63.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop.* 1999b;15;72:13-24.

Soares IS, Barnwell JW, Ferreira MU, Gomes Da Cunha M, Laurino JP, Castilho BA, et al. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. *Mol Med.* 1999c;5:459-70.

Soares IS, Oliveira SG, Souza JM, Rodrigues MM. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. *Acta Trop.* 1999d;15;72:13-24.

Soares IS, Rodrigues MM. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. *Parasitol.* 2002;124:237-46.

Souza JB. Protective immunity against malaria after vaccination. *Parasite Immunol.* 2014;36:131-9.

Stanisic DI, Richards JS, McCallum FJ, Michon P, King CL, Schoepflin S, et al. Immunoglobulin G Subclass-Specific Responses against *Plasmodium falciparum* Merozoite Antigens Are Associated with Control of Parasitemia and Protection from Symptomatic Illness. *Infect. Immun.* 2009;77:1165–74.

Stanisic DI, Barry AE, Good MF. Escaping the immune system: How the malaria parasite makes vaccine development a challenge. *Trends Parasitol.* 2013;29:612-22.

Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nature Rev Immunol.* 2004;4:169-80.

Stewart L, Gosling R, Griffin J, Gesase S, Campo J, Hashim R, et al. Rapid assessment of malaria transmission using age-specific sero-conversion rates. *PLoS One.* 2009;29;4(6):e6083.

Suárez-Mutis MC, Coura JR. Evaluation of the thick smear in a field condition in a malaria endemic area in the Middle Region of Rio Negro, Amazon. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:495-7.

Tadei WP, Dutary-Thatcher B. Malaria vectors in the Brazilian amazon: *Anopheles* of the subgenus *Nyssorhynchus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2000;42:87-94.

Taylor DW, Zhou A, Marsillio LE, Thuita LW, Leke EB, Branch O, et al. Antibodies that inhibit binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A and to the C terminus of merozoite surface protein 1 correlate with reduced placental malaria in Cameroonian women. *Infect Immun.* 2004;72:1603-07.

Tagny CT, Mbanya D, Garraud O, Lefrère JJ. Blood safety: malaria and blood donation in Africa. *Transfus Clin Biol.* 2007;14:481-6.

Tazi L, Ayala FJ. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. Infect Genet Evol. 2011;11:209-21.

Towbin N, Satehelin T, Bordon J. Eletroforetic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. Proc Nat Sci (USA). 1979;76:43650-54.

Tran TM, Samal B, Kirkness E, Crompton PD. Systems immunology of human malaria. Trends Parasitol. 2012;28:248-57.

Vareil MO, Tandonnet O, Chemoul A, Bogreau H, Saint-Léger M, Micheau M, et al. Unusual transmission of *Plasmodium falciparum*, Bordeaux, France, 2009. Emerg Infect Dis. 2011;17:248-50.

Vaughan AM, Aly AS, Kappe SH. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. Cell Host Microbe. 2008;11;4:209-18.

Veltri AC, Bezerra IO, Moza PG, Porto SS, Hoelz MPC, Araújo LD, et al. Malária autóctone na localidade de Lumiar - município de Nova Friburgo - Estado do Rio de Janeiro de 2007 a 2010 [abstract]. Rev Soc Bras Med Trop. 2011;44:s89.

Voller A, Draper CC. Immunodiagnosis and seroepidemiology of malaria. Br Med Bull. 1982;38:173-7.

Warhurst DC, Williams JE. Laboratory diagnosis of malaria – APC Broadsheet n° 148, July 1996. J Clin Pathol. 1996;49:533-8.

Wendel S. Risco residual da transmissão da infecção por *Trypanosoma cruzi* por via transfusional no Brasil. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: 2005.

White NJ. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. Clin Infect Dis. 2008;46:172-3.

WHO. Comité de expertos de la OMS en paludismo. Org. mund. Salud Ser. Inf. Técn. Ginebra. 1971;467:1-59.

WHO. World Health Organization, Malaria Control in Countries where Time-limited Eradication is Impracticable at Present: Technical Report Series. Geneva. 1974;(537):1-66.

WHO. World Health Organization World Malaria Report 2010. . [acessado em 3 de agosto de 2014]. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/the-phylogeny-and-classification-of-anopheles>.

WHO. World Health Organization World Malaria Report 2013. [acessado em 4 de agosto de 2014]. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/anopheles-mosquitoes-new-insights-into-malaria-vectors/the-phylogeny-and-classification-of-anopheles>.

WHO. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance - Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 5 (2013). [acessado em 19 de março de 2014]. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241507554/en/>.

Wilson DW, Fowkes FJI, Gilson PR, Elliott SR, Tavul L, Michon P, et al. Quantifying the Importance of MSP1-19 as a Target of Growth-Inhibitory and Protective Antibodies against *Plasmodium falciparum* in Humans. PLoS ONE. 2011;6(11):e27705.

Wipasa J, Suphavitai C, Okell LC, Cook J, Corran PH, Thaikla K, et al. Long-Lived Antibody and B Cell Memory Responses to the Human Malaria Parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. PLoS Pathog. 2010;6(2):e1000770.

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.

Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa ME, Neves DV, Wunderlich G, et al. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. J Med Primatol. 2011;40:392-400.

Zavortink T J. Mosquito studies (Diptera: Culicidae) XXIX. A review of the subgenus *Kerteszia* of *Anopheles*. Contrib Am Entomol Inst. 1973; 9:1-54.

ANEXOS

ANEXO I

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: ____/____/____