

MARIA DE LOURDES RÊGO NEVES FARINAS

**Detecção molecular de *Plasmodium* em áreas de malária autóctone
localizadas em bioma de Mata Atlântica do estado de São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

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

São Paulo

2021

MARIA DE LOURDES RÊGO NEVES FARINAS

**Detecção molecular de *Plasmodium* em áreas de malária autóctone
localizadas em bioma de Mata Atlântica do estado de São Paulo**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

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

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 01 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca FMUSP

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Farinas, Maria de Lourdes Rêgo Neves
Detecção molecular de Plasmodium em áreas de
malária autóctone localizadas em bioma de Mata
Atlântica do estado de São Paulo / Maria de Lourdes
Rêgo Neves Farinas. -- São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Maria Fátima Di Santi.

Descritores: 1.Malária 2.Reação em cadeia da
polimerase 3.Técnicas de diagnóstico molecular
4.Plasmodium 5.Plasmodium vivax 6.Plasmodium
malariae 7.Infecções assintomáticas

USP/FM/DBD-297/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico esse trabalho à minha grande companheira de vida, minha mãe, quem sempre embarcou nas minhas loucuras e sonhos. Sem você, nada disso seria realidade.

“Não sei... Se a vida é curta ou longa demais para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido se não tocamos o coração das pessoas”.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e capacitar com forças e perseverança a cada dia para que fosse possível chegar até aqui.

Gratidão a minha Orientadora, Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi, por acreditar em mim e neste trabalho. Por toda a determinação em fazê-lo, por toda a ajuda, empenho, dedicação, compreensão e paciência. E por transmitir conhecimento constante de maneira desprendida. Gratidão por acreditar em mim, principalmente nos momentos em que nem mesmo eu acreditava. Gratidão por ser um divisor de águas em minha vida.

A minha amada mãe, Maria de Lourdes, meu exemplo, minha estrela-guia, minha amiga e companheira de todas as horas, invariavelmente! Gratidão pelo amor incondicional, por todo o apoio e paciência. Gratidão por torcer sempre por nossos sonhos e acreditar no meu potencial.

Ao meu amado pai, Arnaldo Boaventura Farinas (*in memoriam*), aquele que me deu o gene da investigação e da Medicina. Que foi egresso dessa Universidade e quem eu sei que está orgulhoso dessa conquista, mesmo acompanhando de outra dimensão. Gratidão, meu pai!

A minhas amigas e companheiras, Mariana Aschar e Maria de Jesus Costa-Nascimento (Didinha), pelas análises estatísticas, extrações, PCRs, choros e risadas e por toda a força e companheirismo nessa jornada.

A toda a equipe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/IMT-FMUSP, por me receberem, apoiarem e colaborarem direta e indiretamente para a realização deste trabalho: Giselle F. M. C. Lima, Juliana Inoue, Angélica Hristov, Christina R. C. Toniolo e Maria Silvia P. de Paula.

As minhas companheiras de plantão da Unidade Einstein de Guarulhos pelo apoio e força nos momentos finais da dissertação.

Aos professores Dr. José Eduardo Levi, Dra. Telma Suely Okay e Dr. Marcelo Andreetta Corral pelas ricas contribuições na Banca de Qualificação.

Aos moradores das áreas de foco envolvidas nesse estudo. Sem vocês isso não seria possível e, assim, podemos contribuir com a melhoria do diagnóstico e da qualidade de vida de todos.

A secretaria do Programa de Pós-Graduação pelo apoio.

A SUCEN/IMT-FMUSP por todo apoio estrutural.

À agência de financiamento da bolsa de Mestrado: CNPq (processo 133825/2018-3).

À agência de financiamento da bolsa de Mestrado FAPESP, no âmbito do CONVÊNIO FAPESP/CAPES, Processo nº 2018/07890-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, familiares e amigos, a minha mais sincera e terna gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais.....	1
1.2 Definição	2
1.3 Agente Etiológico	2
1.4 Transmissão.....	4
1.5 Ciclo Evolutivo.....	5
1.6 Epidemiologia da Malária no Mundo.....	7
1.6.1 Malária nas Américas	9
1.6.2 Malária no Brasil.....	11
1.7 Resposta imune	15
1.8 Infecção Assintomática por <i>Plasmodium</i>	17
1.9 Diagnóstico	19
1.9.1 Gota Espessa.....	19
1.9.2 Testes Rápidos	20
1.9.3 Diagnóstico Molecular	21
1.9.4 qPCR	22
1.9.5 <i>Nested</i> PCR	25
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1. Geral	31
3.2. Específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Desenho do Estudo.....	32
4.2. Área e população do estudo.....	32
4.3. Caracterização das amostras.....	35
4.4. Fluxograma de trabalho.....	37

4.5. Hemoscopia por gota espessa	39
4.6. Extração de DNA genômico de amostras de sangue total colhidas em EDTA..	39
4.7. Extração de DNA genômico de amostras de sangue total colhidas em DBS	40
4.7.1 Chelex®100	40
4.7.2 InstaGene™	41
4.8 Processamento das amostras por qPCR.....	41
4.9 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com QIAamp DNA Blood Mini Kit, InstaGene™ e Chelex®100	44
4.10. Processamento das amostras por <i>nested</i> PCR	45
4.11. Processamento das amostras por DHFR-TS <i>nested</i> PCR.....	46
4.12. Aspectos Éticos da Pesquisa	47
4.13. Análise Estatística	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Fluxograma dos resultados por método de coleta e técnica utilizada	49
5.2. Positividade geral na GE e por qPCR.....	51
5.3. Percentual de amostras positivas em cada município com relação ao total de positivos	52
5.4. Positividade por município na GE e qPCR	54
5.5. Variação nos valores de <i>C_t</i> s na PCR em tempo real em amostras de Sangue total colhidas em EDTA e DBS	55
5.6 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com QiAgen®	59
5.7 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com InstaGene™	60
5.8 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com Chelex®100	61
5.9. <i>Nested</i> PCR	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A. Charles Louis Alphonse Laveran, responsável pela descoberta do <i>Plasmodium</i> em 1880; B. Ronald Ross, responsável pela descoberta da participação de vetores na transmissão da malária.	1
Figura 2 - <i>Plasmodium</i> em esfregaços sanguíneos visualizados ao microscópio óptico com objetiva de imersão. A: <i>P. falciparum</i> ; B: <i>P. vivax</i> ; C: <i>P. malariae</i> . ..	4
Figura 3 - Fêmea do mosquito <i>Anopheles</i> durante repasto sanguíneo. A: <i>An. darlingi</i> ; B: <i>An. (K) cruzii</i>	5
Figura 4 - Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> no hospedeiro humano e no vetor.	6
Figura 5 - Países com casos indígenas em 2000 e seu status em 2019. Países com zero casos autóctones nos últimos 3 anos consecutivos são considerados como tendo eliminado a malária. Em 2019, China e El Salvador relataram zero casos indígenas pelo terceiro ano consecutivo; República Islâmica do Irã, Malásia e Timor-Leste relataram zero casos indígenas pelo segundo ano.	8
Figura 6 – Porcentagem de casos e óbitos evitados nas regiões da Organização Mundial da Saúde, 2000–2019. AFR: África, SEAR: Sudeste Asiático, EMR: região do Mediterrâneo Oriental, WPR: região do Pacífico Ocidental, AMR: região das Américas.	9
Figura 7 - Situação da malária nas Américas, de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), 2017.	10
Figura 8 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019.	11
Figura 9 - Casos confirmados de malária notificados na região Extra-amazônica, 2018 a 2020.	13
Figura 10 - Proporção e número de casos autóctones de malária da Região Extra-amazônica por UF de infecção, 2018 a 2020.	14
Figura 11 - Mecanismos imunológicos de proteção. Com a inoculação de esporozoítos pelo mosquito inicia-se uma resposta humoral, com anticorpos principalmente contra a proteína de superfície do esporozoíto (CSP), na tentativa de impedir que cheguem ao fígado. Após a invasão dos hepatócitos os parasitos podem ser eliminados por mecanismos imunológicos mediados por células. Na	

fase sanguínea, a resposta imune envolve a eliminação dos parasitos na passagem pelo baço e a resposta via anticorpos contra proteínas envolvidas na invasão das hemácias pelos merozoítos.....	17
Figura 12 - Padrão semiquantitativo de parasitemia em cruces em diagnóstico de malária por gota espessa, em 100 campos microscópicos (A) e fórmula para diagnóstico quantitativo de parasitemia sanguínea adotados no Brasil (B).	19
Figura 13 - Ciclos da PCR para amplificação de DNA genômico.....	22
Figura 14 - Sistema <i>TaqMan</i> [®] utilizado em qPCR.....	24
Figura 15 - Sistema SYBR Green [®] utilizado em qPCR.	25
Figura 16 - Esquematização da <i>nested</i> PCR para amplificação de DNA genômico.....	26
Figura 17 - <i>Primers</i> da <i>nested</i> PCR para amplificação de fragmentos de gene ribossomal. A: amplificação gênero-específica. B: amplificação espécie-específica para <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> e <i>P. ovale</i>	27
Figura 18 - Alinhamento de aminoácidos (DHFR-TS) na região de ligação das espécies de <i>Plasmodium</i> que infectam humanos e sequência de <i>primers</i> para as duas reações de <i>nested</i> PCR gênero-específico e para as cinco reações espécie-específicas para detecção de <i>P. falciparum</i> (PF); <i>P. vivax</i> (PV); <i>P. malariae</i> (PM); <i>P. ovale</i> (PO); <i>P. knowlesi</i> (PK).	28
Figura 19 - Mapa do estado de São Paulo, apresentando a cobertura de Mata Atlântica remanescente, 2020.	33
Figura 20 - Mapa do estado de São Paulo apresentando as Regiões Imediatas, onde se inserem os municípios estudados.	34
Figura 21 - Atividade de Busca Ativa realizada no município de Salesópolis, SP, em fevereiro de 2019.	36
Figura 22 - Ilustração de amostras de sangue total coletadas em papel filtro Whatman [®] FTA [®]	37
Figura 23 - Fluxo de processamento das 955 amostras de sangue ensaiadas por gota espessa, qPCR e <i>nested</i> PCR.	38
Figura 24 - Esquema de extração de DNA genômico de amostras de sangue total colhidas em EDTA.	40
Figura 25 - Esquematização do ensaio de qPCR (Lima et al, 2011), com os <i>primers</i> M60 e M61 e a sonda M62 marcada com FAM [™] e TAMRA [™] para	

amplificação de sequências da unidade ribossomal menor (ssrRNA) de <i>Plasmodium</i>	42
Figura 26 - Fluxograma mostrando o total de amostras analisado por método de coleta e técnicas utilizadas.....	50
Figura 27 - Distribuição de amostras positivas (em %) em cada município estudado, com relação ao total de amostras positivas (n=134) por qualquer uma das técnicas (GE ou qPCR).	53
Figura 28 - Curvas dos valores médios de <i>C_{ts}</i> nas amostras de sangue total colhidas em EDTA. A: ampliações em duplicata; B: ampliações em simplicata.	56
Figura 29 - Curvas dos valores de <i>C_{ts}</i> nas amostras de sangue total colhidas em DBS. A: ampliações em simplicata; B e C: média das ampliações em duplicata.	58
Figura 30 - Curvas de amplificação das diluições seriadas de controle positivo de sangue extraído por QIAamp DNA Blood Mini Kit.	59
Figura 31 - Curvas de amplificação das diluições seriadas de controle positivo de sangue extraído por InstaGene™.....	60
Figura 32 - Curvas de amplificação das diluições seriadas de controle positivo de sangue extraído por Chelex®100.....	61
Figura 33 - Resultados de eletroforese pós amplificação. A: <i>P. vivax</i> (DHFR-TS); B: <i>P. malariae</i> (ssrRNA).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> gênero-específicos para <i>Plasmodium</i> e sonda FAM™ e TAMRA™ para qPCR.	42
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> gênero-específico e espécie-específico usados nas reações de <i>nested</i> PCR.....	45
Tabela 3 - Número de amostras positivas e negativas para sangue total e papel filtro (DBS) comparando as técnicas utilizadas.	51
Tabela 4 - Número de amostras, percentual e positividade entre as técnicas por município.....	54
Tabela 5 - Resultados de <i>nested</i> PCR realizados em amostras positivas na qPCR.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Biomarcadores utilizados nos testes rápidos para diagnóstico de malária...20	
Quadro 2 - Resultados de qPCR com e sem adição de controle interno em amostras com diferentes parasitemias.....	43
Quadro 3 - Condições de ciclagem da DHFR-TS <i>nested</i> PCR.....	47

LISTA DE SIGLAS

CSP	<i>Circumsporozoite Surface Protein</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DBS	<i>Dried Blood Spot</i>
DHFR	Dihidrofolato redutase
<i>et al.</i>	e colaboradores
HRP-II	<i>Histidine Rich Protein II</i>
LoD	<i>Limit of detection</i>
PAHO	Pan-Americana Health Organization
PNCM	Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pLDH	Lactato desidrogenase de <i>Plasmodium</i>
PRP	Receptores de reconhecimento de padrões
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SIVEP	Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
ssrRNA	<i>small subunit of ribosomal RNA</i>
TS	Timidilato sintase
WHO	World Health Organization

Farinas MLRN. *Detecção molecular de Plasmodium em áreas de malária autóctone localizadas em bioma de Mata Atlântica do estado de São Paulo* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A malária é uma das doenças tropicais mais relevantes no mundo e é um grande desafio para a ciência e para os programas de controle. É uma doença infecciosa febril, aguda e de evolução rápida, transmitida ao homem através da picada do mosquito *Anopheles* infectado por *Plasmodium*. A maioria dos casos no Brasil ocorre na Região Amazônica. Porém na Região Extra-Amazônica, considerada como área não endêmica, a doença tem impacto na vigilância epidemiológica devido aos casos importados e à possibilidade de ocorrência de surtos. Nesta região a malária tem relevância pela ocorrência de casos autóctones com baixa parasitemia e sintomatologia pouco exuberante. O estado de São Paulo historicamente apresenta transmissão de malária em regiões localizadas em Bioma de Mata Atlântica. O número de casos reportado pelos órgãos de vigilância pode ser subdimensionado, visto que o diagnóstico é realizado pelo teste de referência, a gota espessa, cuja sensibilidade varia muito em função da experiência do observador e da parasitemia sanguínea. Por sua alta sensibilidade, os testes moleculares têm se destacado frente às divergências no diagnóstico microscópico em casos de infecções mistas e infecções assintomáticas com baixas parasitemias. O objetivo deste estudo foi aplicar protocolos de PCR (qPCR e *nested* PCR) em amostras de sangue de habitantes onde ocorreram focos de malária autóctone do estado de São Paulo. Foram analisadas 955 amostras processadas por gota espessa e qPCR. Os resultados apresentam uma diferença na positividade entre a microscopia (6,9%) e a qPCR (22,9%) estatisticamente significativa nas amostras de sangue total colhidas em EDTA. A utilização de protocolos moleculares na população habitante das áreas adjacentes aos casos autóctones permitirá a detecção de assintomáticos portando *Plasmodium*, servindo de fonte para transmissão de novos casos. Os resultados contribuem para o aprimoramento das ações de vigilância e controle em eventos de autoctonia.

Descritores: Malária; Reação em cadeia da polimerase; Técnicas de diagnóstico molecular; *Plasmodium*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium malariae*; Infecções assintomáticas.

Farinas MLRN. *Molecular detection of Plasmodium in autochthonous malaria areas located in Atlantic Forest biome of the state of Sao Paulo* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Malaria is one of the most relevant tropical diseases in the world and is a major challenge for science and control programs. It is a febrile, acute infectious disease and can lead to severe cases. It is transmitted to humans through the bite of the *Plasmodium* infected *Anopheles* mosquito. Most cases in Brazil occur in the Amazon Region. However, in the Extra-Amazon Region, considered as a non-endemic area, the disease has an impact on epidemiological surveillance due to imported cases and the possibility of outbreaks. In this region, malaria is relevant due to the occurrence of autochthonous cases with low parasitemia and mild symptoms. The State of Sao Paulo has historically presented malaria transmission in regions located in the Atlantic Forest biome. The number of cases reported by the surveillance agencies can be underreported, since the diagnosis is based on the reference test, the thick blood smear, whose sensitivity varies significantly depending on the examiner's experience and blood parasitemia. Molecular tests have high sensitivity and are useful for confirming the microscopic diagnosis by detecting mixed infections and asymptomatic individuals with low parasitemias. The aim of this study was to use PCR (qPCR and nested PCR) protocols in blood samples from inhabitants from autochthonous malaria areas in the State of Sao Paulo. We processed 955 samples by thick blood smear and qPCR. Results point to a difference statistically significant in positivity between microscopy (6.9%) and qPCR (22.9%) in the whole blood samples collected in EDTA. The use of molecular protocols in the population living in areas adjacent to autochthonous cases will allow the detection of asymptomatic patients with *Plasmodium*, that act as a source for the transmission of new cases. The results will contribute to the improvement of surveillance and control activities in malaria outbreaks.

Descriptors: Malaria; Polimerase chain reaction; Molecular diagnostic techniques; *Plasmodium*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium malariae*; Asymptomatic infections.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

A malária é umas das doenças mais antigas e sua história se confunde com a história da evolução humana, havendo relatos de que na Antiguidade a malária estaria associada à morte de primatas que deram origem ao *Homo sapiens* (França et al., 2008).

Acredita-se que a África seja a civilização precursora da doença, porém há documentos históricos que associam a malária a outros grupos étnicos, como os das primeiras civilizações da China, Egito, Grécia, Índia e Mesopotâmia (Cox, 2010).

Os estudos de Charles Louis Alphonse Laveran (Figura 1 A) levaram à descoberta do *Plasmodium* em 1880. A participação de vetores na transmissão foi proposta por Ronald Ross (Figura 1 B) em 1897, que identificou o parasito se desenvolvendo na parede do estômago de um mosquito do gênero *Anopheles*. O ciclo completo da malária humana foi descrito por Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava entre 1898 e 1900 (Matos, 2000; Mascarini, 2003; Cox, 2010).

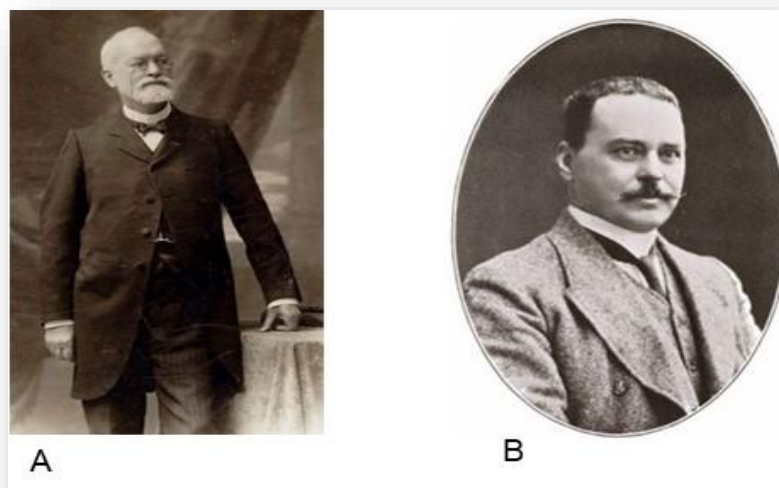


Figura 1 - A. Charles Louis Alphonse Laveran, responsável pela descoberta do *Plasmodium* em 1880; B. Ronald Ross, responsável pela descoberta da participação de vetores na transmissão da malária.

FONTE: A. http://iftm-hp.org/gallery_2.html

B. <https://sites.google.com/site/scousesciencealliance/scientist-of-the-month/ross>

1.2 Definição

A malária é uma doença infecciosa febril, aguda e de evolução rápida, transmitida ao homem pela picada de fêmeas do mosquito *Anopheles* infectadas por protozoários do gênero *Plasmodium*, que pertencem a família Plasmodiidae, filo Apicomplexa. O ciclo biológico se alterna entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado (Moraes et al., 2013; Batista-dos-Santos et al., 2018).

1.3 Agente Etiológico

As espécies de *Plasmodium* que podem parasitar o homem são cinco: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Segurado e Di Santi, 2017). *P. falciparum*, a espécie mais prevalente no continente africano (WHO, 2020), pode causar quadros graves se o diagnóstico e tratamento não forem realizados rapidamente. Alguns aspectos de sua biologia são responsáveis por este desfecho, como a preferência por hemácias jovens e maduras, atingindo assim altas parasitemias em curto espaço de tempo. Além disso, apresenta um fenômeno denominado cito aderência ou sequestro, onde o parasito desenvolve seu ciclo assexuado sanguíneo aderido à parede dos vasos de órgãos internos, comprometendo o fluxo sanguíneo na microcirculação. Quanto à morfologia, os trofozoítos possuem núcleo saliente com citoplasma delicado e granulações de Maurer de difícil visualização ao microscópio óptico. Esquizontes são encontrados na corrente circulatória somente em infecções graves. Gametócitos são observados mais tardiamente ou após tratamento das formas assexuadas (Segurado e Di Santi, 2017).

P. vivax é a espécie mais disseminada no mundo e predominante nas Américas (WHO, 2020). A preferência por invadir reticulócitos aliada à rápida resposta imune justificam as parasitemias baixas, raramente levando a casos graves. Morfologicamente todas as formas do ciclo assexuado e sexuado sanguíneo podem ser observadas na corrente circulatória. Episódios de recaída podem ocorrer devido aos hipnozoítos, formas dormentes no fígado que se reativam semanas ou meses após o tratamento (Olliaro et al., 2016). Embora classicamente a infecção das hemácias seja ligada a indivíduos com genótipo sanguíneo Duffy positivo, Olliaro e colaboradores (2016) mostraram que *P. vivax* pode infectar indivíduos Duffy negativos, em estudos conduzidos em

Madagascar, Quênia e Brasil.

P. ovale é descrito no continente africano e algumas regiões do continente asiático (Collins e Jeffery, 2005). Possui semelhanças com *P. vivax* como o caráter benigno, a morfologia e a capacidade de apresentar hipnozoítos, (Chavatte et al., 2015).

P. malariae tem ampla distribuição em áreas tropicais e subtropicais (Grande et al., 2019). Os merozoítos de *P. malariae* tem predileção por hemácias senescentes, causando quadros clínicos leves. Todas as formas assexuadas e sexuadas do ciclo sanguíneo podem ser visualizadas na corrente circulatória periférica (Segurado e Di Santi, 2017).

P. knowlesi, que acreditava-se infectar apenas primatas não humanos, foi descrito mais recentemente em humanos, com relatos de casos principalmente em países do Sudeste Asiático. Assim como o *P. falciparum*, o *P. knowlesi* é responsável pelos quadros mais graves e fatais de malária, devido à capacidade de atingir altas parasitemias pouco tempo após o início dos sintomas (Kantele e Jokiranta, 2011).

Alguns estudos sugerem que outra espécie de *Plasmodium* pode infectar o homem. *P. simium*, descrito em primatas, tem semelhança morfológica e genética com *P. vivax*. Descrito em humanos em 1966 por Deane e colaboradores com base na morfologia, foi detectado em humanos em foco de malária autóctone em região de Mata Atlântica no Rio de Janeiro. Neste estudo a distinção entre *P. simium* e *P. vivax* foi proposta com base em dois polimorfismos (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) no genoma mitocondrial (Brasil et al., 2017). A semelhança genética entre *P. vivax* e *P. simium* e entre *P. malariae* e *P. brasilianum* reforça a possibilidade de uma zoonose, com símios atuando como reservatórios na transmissão do ciclo envolvendo humanos. No entanto, apesar da baixa frequência dos casos, é importante determinar se a malária em áreas de baixa endemicidade poderia ser mantida por portadores humanos assintomáticos (Alencar et al, 2017).

No Sudeste do Brasil há notificação importante de casos autóctones, predominantemente em áreas de Mata Atlântica. Em sua maioria são diagnosticados como *P. vivax* e os casos sintomáticos são observados em visitantes dessas áreas muito mais que em residentes. Estas áreas são

abundantes em bromélias, *habitat* natural para oviposição de fêmeas do subgênero *Kerteszia*, especialmente *Anopheles* (*Kerteszia*) *cruzii* e *Anopheles* (*Kerteszia*) *bellator*, principais vetores da denominada “malária das bromélias”. Estes mosquitos podem picar primatas não humanos e humanos corroborando a hipótese de transmissão zoonótica nessas áreas, onde primatas não-humanos podem atuar como reservatórios de *Plasmodium* capazes de infectar humanos (Alvarenga et al, 2018).

No Brasil são descritos *P. falciparum* (Figura 2A), *P. vivax* (Figura 2B) e *P. malariae* (Figura 2C) (Di Santi e Boulos, 1999).

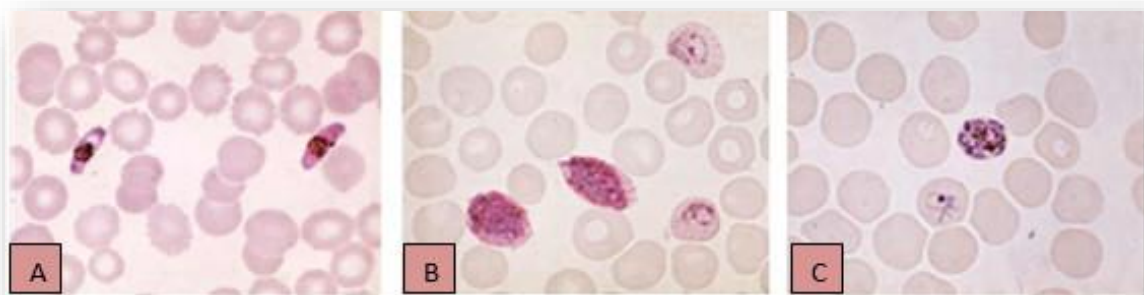


Figura 2 - *Plasmodium* em esfregaços sanguíneos visualizados ao microscópio óptico com objetiva de imersão. A: *P. falciparum*; B: *P. vivax*; C: *P. malariae*.

FONTE: <http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo2/8.html>; <http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo2/47.jpg>; <http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo2/42.jpg>

1.4 Transmissão

A forma natural de transmissão da malária é através do repasto sanguíneo da fêmea de *Anopheles* infectada. *Anopheles darlingi* (Figura 3 A) é o vetor primário na América do Sul. No Brasil é o principal vetor de *P. falciparum* e *P. vivax* na Região Amazônica (Laporta et al., 2015). Na Região Extra-amazônica o sub-gênero *Kerteszia* (Figura 3 B) está diretamente ligado aos casos de malária, principalmente em regiões cobertas por Mata Atlântica (Sallum et al., 2008).

A malária também pode ser transmitida através de transfusão sanguínea, transplante de órgãos, compartilhamento de seringas entre usuários de drogas injetáveis ou por via congênita. Estas são consideradas formas de transmissão induzida ou acidental da doença (Brasil, 2009).

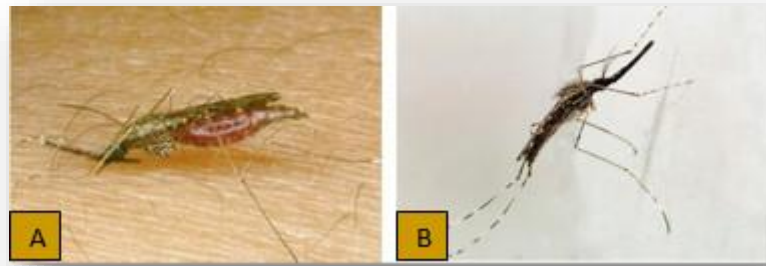


Figura 3 - Fêmea do mosquito *Anopheles* durante repasto sanguíneo. A: *An. darlingi*; B: *An. (K.) cruzii*.

FONTE: <http://www.icb.usp.br/~marcelcp/Imagens/f-zzz18.jpg>, Pina-Costa et al, 2014.

1.5 Ciclo Evolutivo

O ciclo biológico do *Plasmodium* é dividido em fase assexuada no hospedeiro vertebrado (homem) e sexuada no vetor. Inicia-se com a picada da fêmea infectada, que inocula esporozoítos presentes em suas glândulas salivares. Estes rapidamente ganham a corrente sanguínea e alcançam os hepatócitos, onde sofrem sua primeira fase de reprodução assexuada originando milhares de merozoítos, processo chamado de esquizogonia hepática ou exoeritrocítica. Os merozoítos formam vesículas chamadas merossomos, que ao se romperem liberam os parasitos em sua nova forma para a corrente sanguínea, que invadem eritrócitos, sendo então denominados trofozoítos (Prudêncio et al., 2006; Cox, 2010). Estes evoluem para esquizontes, que liberam novos merozoítos. A duração desta fase reprodutiva eritrocitária varia de acordo com a espécie do parasito. Quando os eritrócitos infectados se rompem liberando merozoítos para a corrente sanguínea, ocorrem as manifestações clínicas da malária, como os picos febris e calafrios. Nem sempre estes ciclos são sincrônicos, o que pode acarretar febre diária. A maior parte desses trofozoítos dá continuidade ao ciclo formando novos esquizontes. No entanto, a outra parte se diferencia em forma sexuada feminina (macrogametócitos) e masculina (microgametócitos), que são ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles* durante o repasto. Já dentro do intestino da fêmea do mosquito, os gametócitos passam por divisão celular onde cada um produz oito novos microgametas flagelados, que através de um processo de fertilização com os macrogametas formam os oocinetos. Estes atravessam a parede do intestino do mosquito dando origem aos oocistos, que em pouco tempo eclodem liberando esporozoítos.

Estes migram para as glândulas salivares, prontos para serem inoculados em um novo hospedeiro vertebrado através da picada, dando continuidade ao ciclo biológico do *Plasmodium* e à transmissão e disseminação da malária, como apresentado na Figura 4 (França et al., 2008).

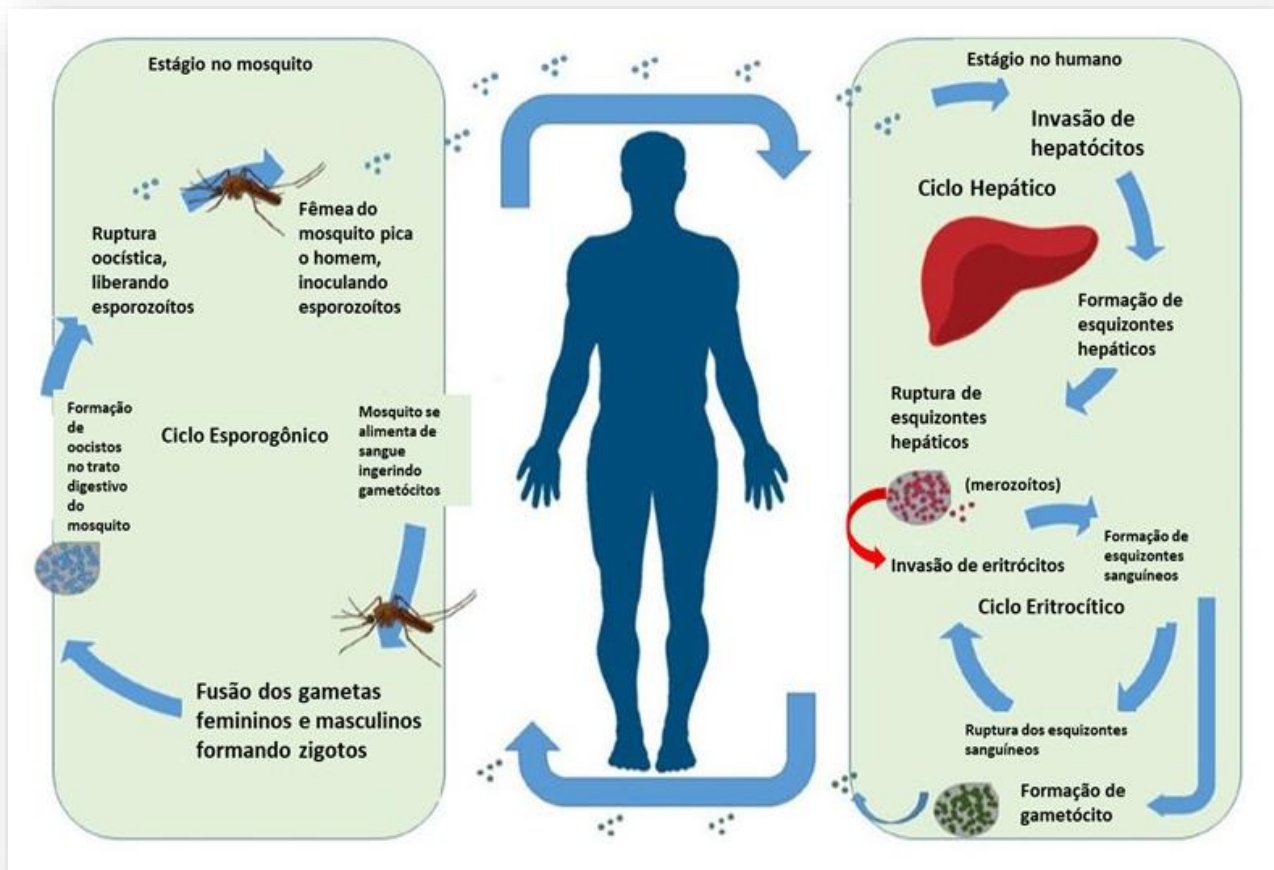


Figura 4 - Ciclo de vida do *Plasmodium* no hospedeiro humano e no vetor.

FONTE: Garrido-Cardenas et al, 2019

As manifestações clínicas clássicas da malária são febre alta, calafrios, sudorese e cefaleia e tem relação direta com o ciclo evolutivo e características biológicas de cada espécie. Em quadros de malária grave podem surgir cefaleia forte, hipertermia, vômitos, sonolência e convulsões, insuficiência renal aguda, edema pulmonar agudo, hipoglicemia, disfunção hepática, hemoglobinúria e choque, podendo evoluir para o óbito (Lima, 2011). A febre ocorre quando há o rompimento de esquizontes, com consequente liberação de merozoítos e pirógenos endógenos na circulação sistêmica (Segurado e Di Santi, 2017). *P. falciparum* é caracterizado por um ciclo febril que se repete a cada 36-48 horas;

P. vivax possui um ciclo febril a cada 48 horas, assim como *P. ovale*; *P. malariae* promove eventos de febre a cada 72 horas e *P. knowlesi* produz febre diária, em função de seu ciclo esquizogônico rápido de 24 horas. Esta característica tem como consequência o rápido agravamento e alta letalidade em infecções causadas por *P. knowlesi* (Collins e Jeffery, 2005; Kantele e Jokiranta, 2011; Schalkwyk et al., 2017).

1.6 Epidemiologia da Malária no Mundo

De acordo com o *World Malaria Report 2020*, 229 milhões de casos de malária ocorreram no mundo em 2019 em 87 países endêmicos. Em 2015, havia 218 milhões de casos estimados de malária e a proporção de casos devido a *P. vivax* reduziu de cerca de 7% em 2000 para 3% em 2019. A Região Africana concentrou 94% dos casos de malária, seguida pela Região Sudeste da Ásia, com 3% dos casos e a Região do Mediterrâneo Oriental com 2%. *P. falciparum* é o mais prevalente na Região Africana responsável por 99,7% dos casos, bem como nas regiões do Sudeste Asiático (62,8%), Mediterrâneo Oriental (69%) e Pacífico Ocidental (71,9%). *P. vivax* é predominante na Região das Américas, representando 74,1% casos de malária. Com relação à letalidade, em 2019 foram estimados 409.000 óbitos mundialmente (WHO, 2020). Apesar dos avanços obtidos, o número de casos e óbitos está estabilizado, exigindo novos esforços para a diminuição da carga da malária em nível mundial. A situação epidemiológica da malária é apresentada nas Figuras 5 e 6.

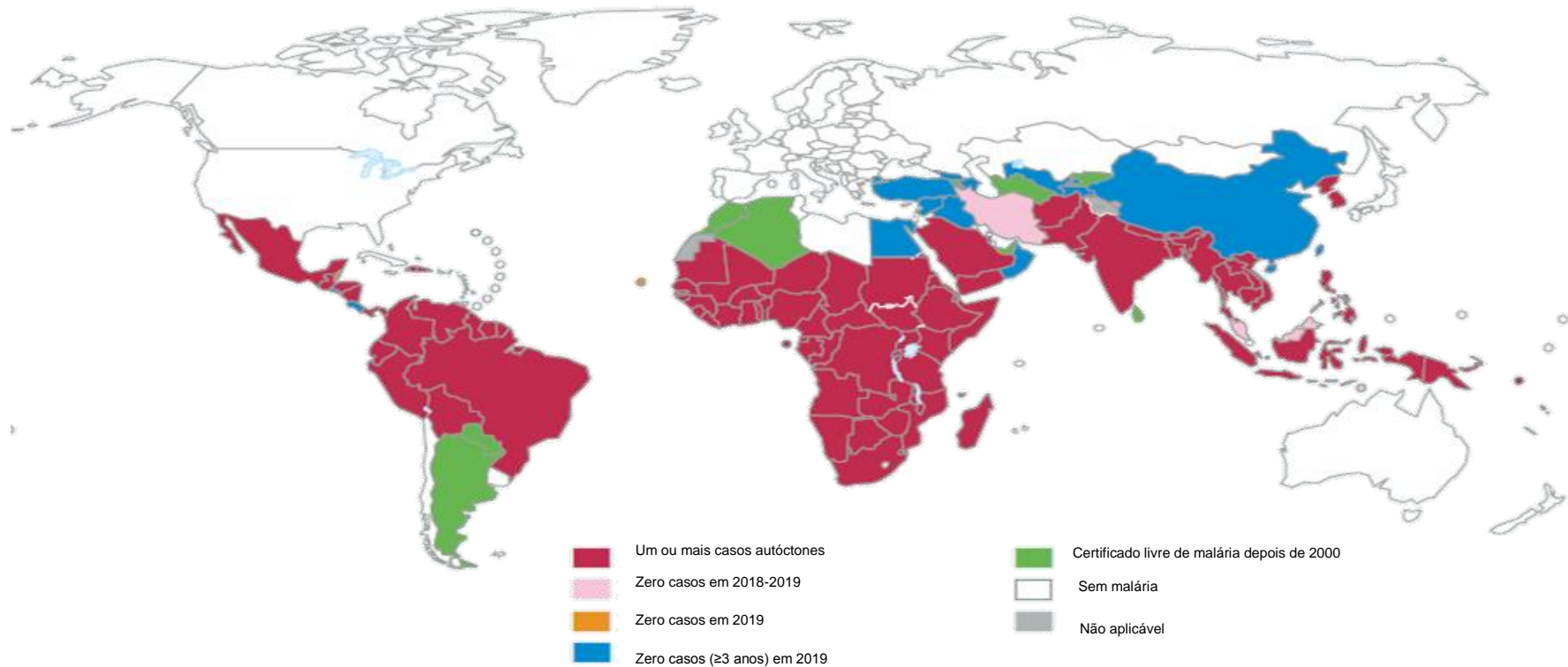


Figura 5 - Países com casos autóctones em 2000 e seu status em 2019. Países com zero casos autóctones nos últimos 3 anos consecutivos são considerados como tendo eliminado a malária. Em 2019, China e El Salvador relataram zero casos indígenas pelo terceiro ano consecutivo; República Islâmica do Irã, Malásia e Timor-Leste relataram zero casos indígenas pelo segundo ano.

FONTE: WHO. *World Malaria Report*, 2020

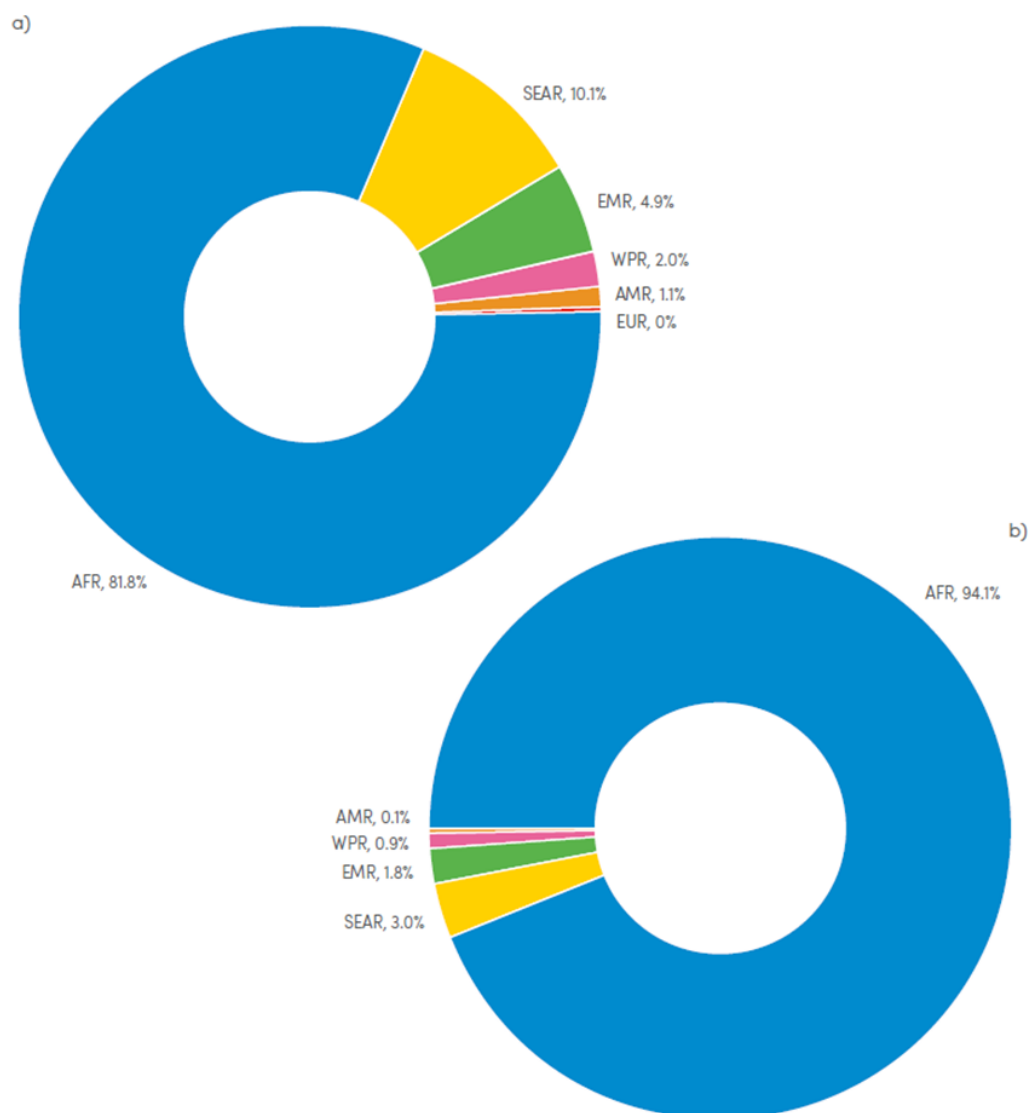


Figura 6 – Porcentagem de casos (a) e óbitos (b) evitados nas regiões da Organização Mundial da Saúde, 2000–2019. AFR: África, SEAR: Sudeste Asiático, EMR: região do Mediterrâneo Oriental, WPR: região do Pacífico Ocidental, AMR: região das Américas.

FONTE: WHO. *World Malaria Report*, 2020

1.6.1 Malária nas Américas

Nas Américas, cerca de 138 milhões de pessoas estão em áreas de risco para malária em 19 países, com quase 80% dos casos atribuídos a *P. vivax*. Brasil, Colômbia e República Bolivariana da Venezuela são responsáveis por 80% dos casos (Brasil, 2020). Segundo o *World Malaria Report* (WHO, 2020) houve uma redução de 40% no número de casos de malária na região das Américas (de 1,5 milhões para 0,9 milhões) e de 57% na incidência de casos.

Porém, o progresso observado na região nos últimos anos foi prejudicado pelo grande aumento no número de casos de malária na Venezuela, que saltou de 35.500 casos em 2000, para mais de 467.000 em 2019. De 2019 para 2020 houve redução no total de casos no Brasil, Colômbia, Guiana, Peru, Equador, Guatemala e México. Porém, Haiti, Nicarágua, Panamá, República Dominicana, Honduras, Costa Rica e Suriname reportaram aumento no número de casos. Paraguai e Argentina receberam certificados de países livres de malária pela Organização Pan-Americana da Saúde e OMS (PAHO/WHO, 2020).

Quanto às mortes, as Américas tiveram uma redução de 39% no número de casos (de 909 para 551) e na taxa de mortalidade de 50% (de 0,8 para 0,4). Mais de 70% das mortes por malária em 2019 nesta região ocorreram na Venezuela (WHO, 2020).

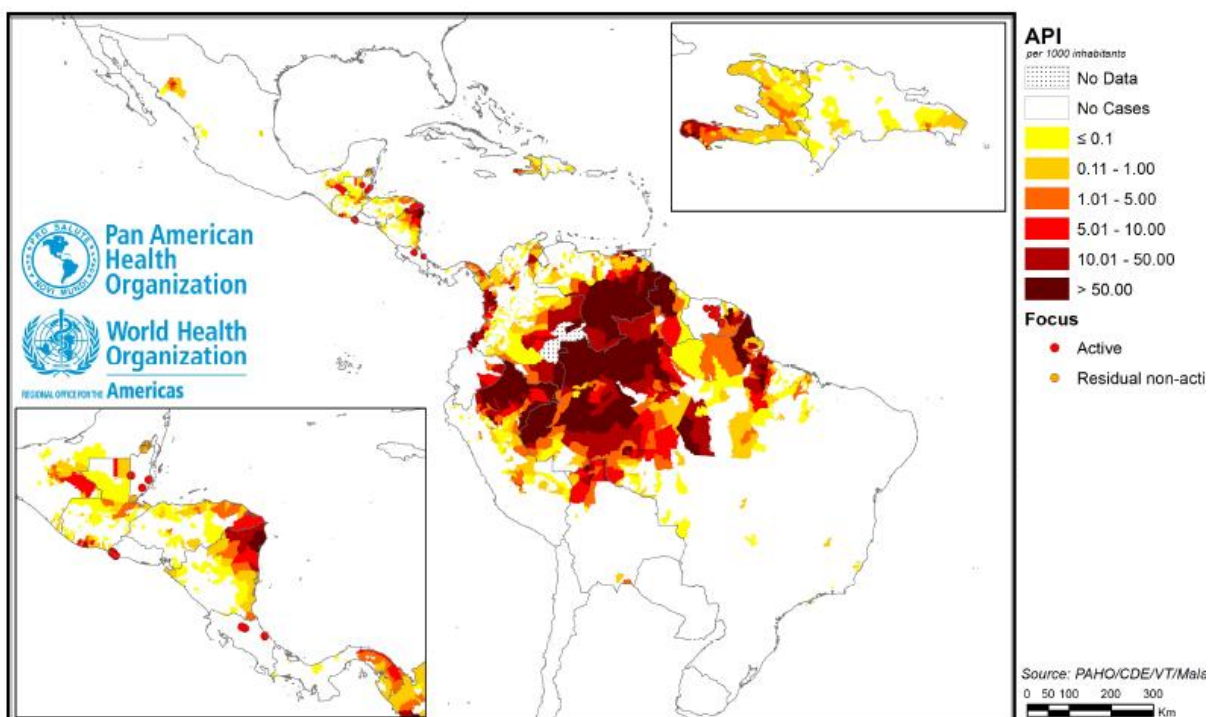


Figura 7- Situação da malária nas Américas, de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), 2017.

FONTE: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=datos-estadisticos-mapas-8110&alias=48336-situation-of-malaria-in-the-region-of-the-americas-2017-1&Itemid=270&lang=es

1.6.2 Malária no Brasil

1.6.2.1 Malária na Região Amazônica

A Amazônia Legal abrange 13,4% da população total do país e 59% do território nacional com nove estados, quais sejam, Pará, Maranhão, Acre, Mato Grosso, Roraima, Amazonas, Rondônia, Amapá e Tocantins (Pina-Costa et al, 2014). No Brasil, 99% dos casos de malária se concentram na Região Amazônica. Em 2019 o Brasil notificou 157.454 casos de malária (Figura 8), 19,1% a menos que no ano anterior. *P. vivax* foi responsável por 89,3% dos casos, enquanto *P. falciparum* e infecções mistas participaram com 10,7% (Brasil, 2020). *P. malariae* é uma espécie subnotificada devido à semelhança morfológica com *P. vivax*.

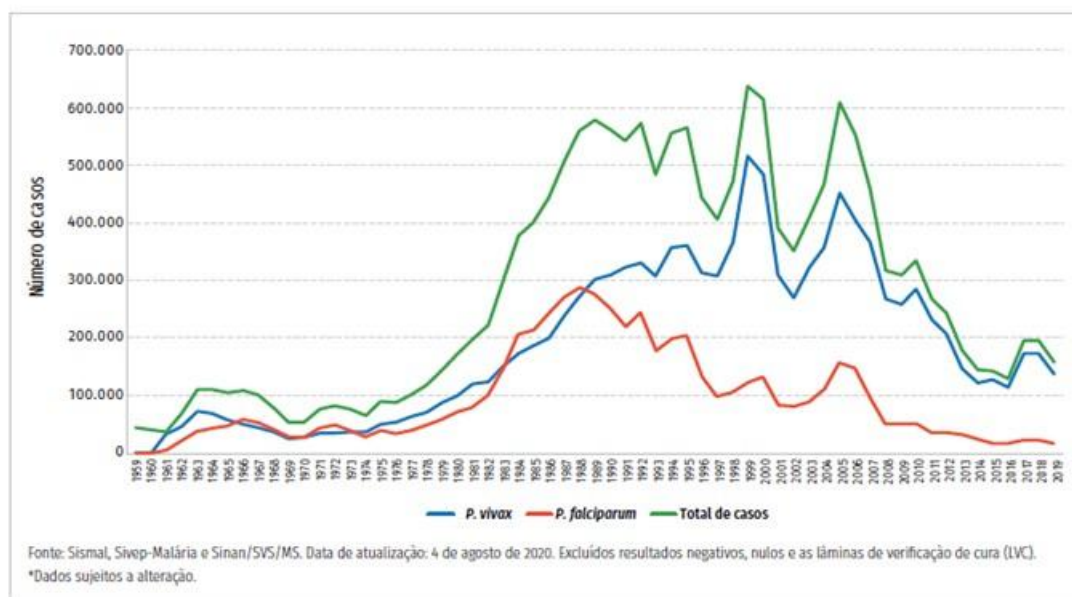


Figura 8 - Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2019. FONTE: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Boletim Epidemiológico. Número Especial, nov. 2020.

1.6.2.2 Malária na Região Extra-amazônica

Segundo Pina-Costa e colaboradores (2014), os estados que formam a Região Extra-amazônica são 18: Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do

Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo e partes do Maranhão, Mato Grosso e Tocantins.

O processo de transmissão sofre influência do deslocamento de pessoas para regiões endêmicas, que podem se infectar e causar surtos da doença ao regressarem para seus locais de origem. Isso é fator de alerta para a vigilância epidemiológica, pois esse trânsito contribui para o avanço da doença em áreas não endêmicas. Segundo dados do Ministério da Saúde, o número de casos detectados na Região Extra-amazônica apresentou uma tendência de queda a partir de 2018, com uma diminuição de 27% em 2019 (Brasil, 2021). Em 2020 houve uma redução de 44% no número de casos notificados na Região Extra-amazônica (Figura 9), tendo como provável causa a pandemia de COVID-19, que restringiu os deslocamentos. Nesta região os casos autóctones ocorrem em sua maioria em Bioma de Mata Atlântica, que se estende pela costa brasileira do RN ao RS, ocupando 17 estados. Da área original, de 1.300.000 km², restaram somente 7- 8% deste total. Nesta região vivem 62% dos habitantes da população brasileira. As temperaturas altas, clima úmido, com média anual de chuva de 900 mm e a presença de bromélias, fazem deste ecossistema um local ideal para a proliferação do *Anopheles*. Somam-se a essas características, as maciças alterações humanas no meio ambiente, que provocam alterações na dinâmica populacional desses mosquitos, trazendo inúmeras consequências negativas para as populações adjacentes a essas áreas. O deslocamento de vetores entre as populações contribui para disseminação de casos de malária, ampliando a disponibilidade de indivíduos que atuam como reservatórios (Pina-Costa et al., 2014). O estado de São Paulo tem 5.431.220 hectares remanescentes.

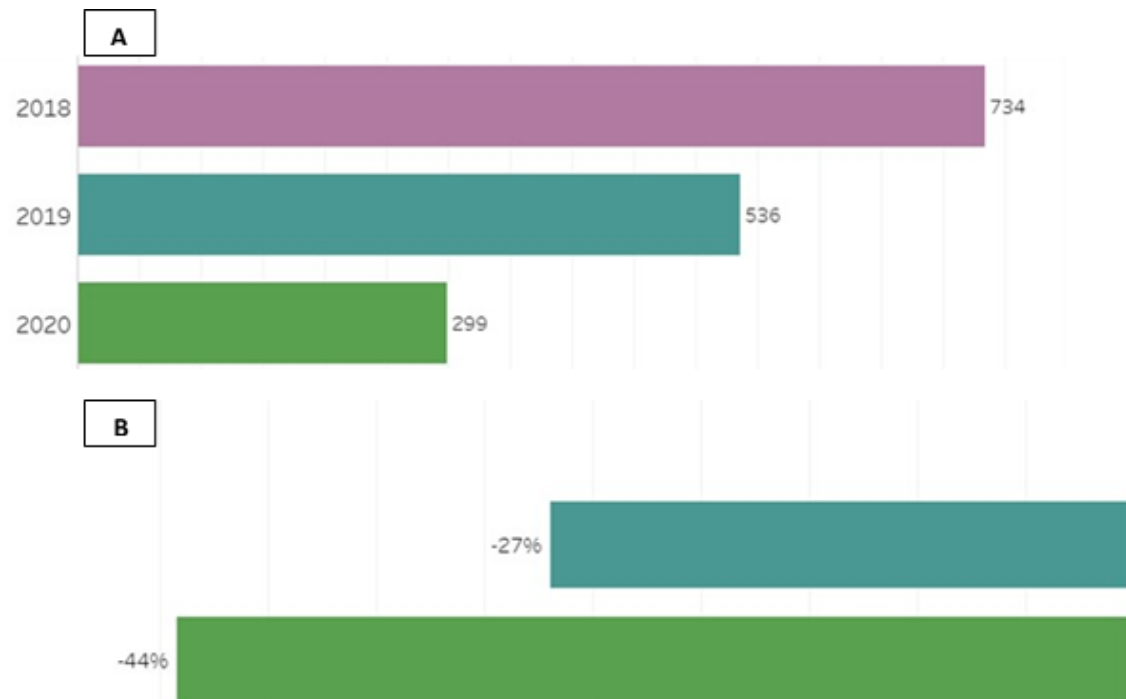


Figura 9 - Casos confirmados de malária notificados na região Extra-amazônica, 2018 a 2020. A: número de casos notificados; B: percentual de queda no número de casos entre 2018 e 2019 (azul) e entre 2019 e 2020 (verde).

FONTE: Brasil, 2021

As unidades federativas que mais notificaram casos autóctones de 2018 a 2020 foram ES (148 casos), BA (77 casos) e SP (36 casos), segundo dados do Ministério da Saúde apresentados na Figura 10 (Brasil, 2021).

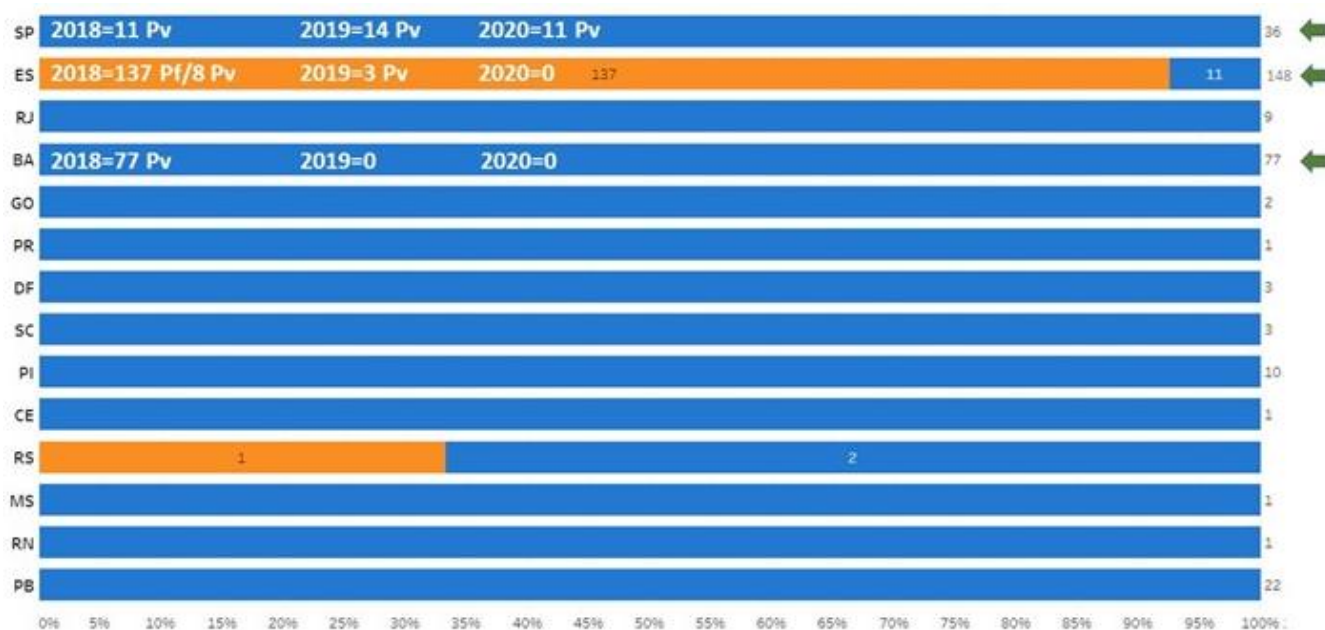


Figura 10 - Proporção e número de casos autóctones de malária da Região Extra-amazônica por UF de infecção, 2018 a 2020.
 FONTE: Brasil, 2021

De acordo com o Programa de Qualificação das Ações de Vigilância em Saúde (PQA-VS) que visa ao aperfeiçoamento do Sistema Único de Saúde (SUS), o indicador da malária adotado é a proporção de casos que iniciaram tratamento adequado até 48 horas a contar do início dos sintomas para os casos autóctones, e até 96 horas para os casos importados. Em 2019, 63,2% dos casos notificados no Brasil receberam tratamento em tempo oportuno a contar do início dos sintomas. A maioria dos estados da Região Amazônica apresenta mediana de oportunidade de tratamento em até dois dias após o início dos sintomas, enquanto para Região Extra-amazônica a mediana é de seis dias (Brasil, 2020). A justificativa para esta diferença é que na Região Extra-amazônica a suspeita é dificultada pela ausência de transmissão local ou pela ocorrência de casos esporádicos de malária. Essa dificuldade na suspeição de casos importados da doença, geralmente sintomáticos, é agravada com relação à suspeita de casos autóctones, que se caracterizam por exibir baixa parasitemia e sintomatologia pouco exuberante (Couto et al., 2010). Portanto, o número de casos autóctones pode ser maior, visto que o teste de referência para malária, a gota espessa, tem

sensibilidade variável em função da experiência do observador e da parasitemia sanguínea.

1.7 Resposta imune

Indivíduos vivendo em áreas endêmicas podem desenvolver imunidade à malária mediada por anticorpos contra as formas graves da doença, após frequentes exposição ao *Plasmodium* (Cohen et al., 1961). Entretanto, a imunidade adquirida não é suficiente para impedir a infecção, levando à ocorrência de casos assintomáticos (Gupta et al., 1999).

A resposta imune humoral se inicia com a apresentação do antígeno às células B, com consequente sinalização para a interação com células T *helper* CD4+ (Garside et al., 1998). Com a inoculação dos esporozoítos, há produção de anticorpos na tentativa de imobilizar o parasito no local da inoculação ou impedir seu deslocamento para a circulação (Flores-Garcia et al., 2018). Nessa fase, a ativação da imunidade envolve mastócitos, neutrófilos, células *natural killer* e células gama-delta, sem resposta inflamatória local (Segurado e Di Santi, 2017). Após a infecção dos hepatócitos pelos esporozoítos, os parasitos da fase hepática podem ser eliminados mediante resposta imune celular (Cockburn e Seder, 2018). Com a finalização do ciclo pré eritrocítico e com a invasão das hemácias, os anticorpos têm importante papel, agindo nos merozoítos e nas hemácias infectadas, na tentativa de impedir a infecção de novas células por neutralização (Akter et al., 2019), fagocitose (Kana et al., 2019) ou destruição mediada por complemento (Boyle et al., 2015). Esta imunidade é mediada em grande parte por anticorpos contra antígenos do *Plasmodium* na superfície da hemácia infectada, facilitando a adesão e evitando o clareamento via baço (Chan et al., 2012).

No ciclo sanguíneo ocorre intensa ativação celular, resultando em um processo inflamatório sistêmico decorrente da liberação de citocinas. Com a ruptura das hemácias infectadas ocorre liberação de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral alfa α e γ , responsáveis pela síndrome febril própria do acesso malárico). A produção de IFN- γ e de TNF- α favorece a produção de óxido nítrico e de outros radicais tóxicos para o parasito. Essa resposta depende da interação (PAMP/PRP) de diversos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP) e seus

respectivos receptores de reconhecimento de padrões (PRP), como por exemplo, âncoras de glicofosfatidilinositol/receptores toll-like-1 e toll-like-2, hemozoína/sensores intracitoplasmáticos do inflamassoma (NLRP3 e AIM2), DNA parasitário ligado a hemozoína/receptores toll-like-9, RNA parasitário/receptores toll-like-7. A resposta imune nas diferentes fases do ciclo de *Plasmodium* é apresentada na Figura 11. A diversidade genética em *Plasmodium* impede que o hospedeiro desenvolva imunidade duradoura. Além disso, a ativação policlonal de células B leva à produção de autoanticorpos que acarretam a anemia, plaquetopenia e glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos em alguns casos de infecção por *P. malariae*. Alguns mecanismos de evasão do parasito estão envolvidos na resposta imune, como o polimorfismo da proteína PfEMP-1, secretada para a superfície de glóbulos vermelhos parasitados por *P. falciparum* e o fenômeno de sequestro de hemácias parasitadas nos sinusóides, por meio da citoaderência, diminuindo a passagem pelo baço e a fagocitose (Segurado e Di Santi, 2017).

É interessante notar que a imunidade à malária é adquirida mais rapidamente em áreas de baixa transmissão, não sendo, portanto, somente o número de infecções responsável pelo desenvolvimento da resposta imune (Rolfes et al., 2012)

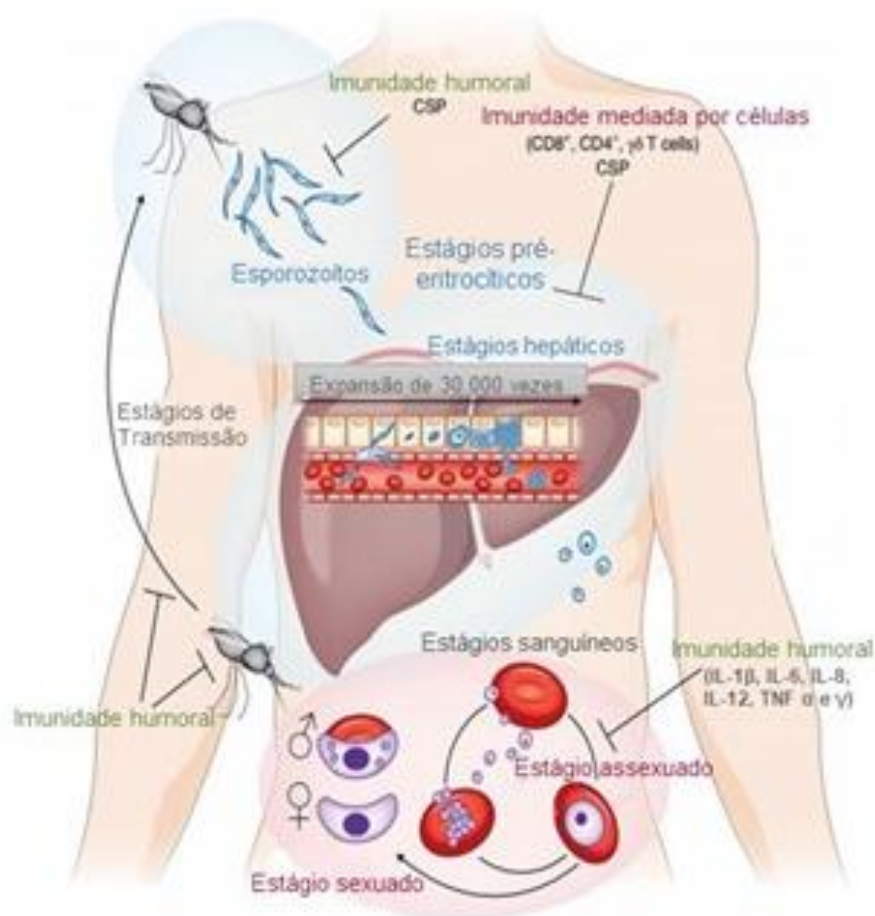


Figura 11 - Mecanismos imunológicos de proteção. Com a inoculação de esporozoítos pelo mosquito inicia-se uma resposta humoral, com anticorpos principalmente contra a proteína de superfície do esporozoítio (CSP), na tentativa de impedir que cheguem ao fígado. Após a invasão dos hepatócitos os parasitas podem ser eliminados por mecanismos imunológicos mediados por células. Na fase sanguínea, a resposta imune envolve a eliminação dos parasitas na passagem pelo baço e a resposta via anticorpos contra proteínas envolvidas na invasão das hemácias pelos merozoítos.

FONTE: Cockburn e Seder, 2018

1.8 Infecção Assintomática por *Plasmodium*

As infecções assintomáticas por *Plasmodium* representam um grande desafio ao controle da malária em todo o mundo, pois são reservatórios naturais silenciosos. Por não terem qualquer sintoma, estes indivíduos não buscam atendimento médico, influenciando a cadeia de transmissão da doença

(Mendonça e Barral-Netto, 2015). Infecções assintomáticas são descritas em todas as áreas com transmissão de malária, com todas as espécies de *Plasmodium* (Coura et al., 2006; Wang et al., 2014; Golassa et al., 2015; Waltmann et al., 2015). A imunidade adquirida após repetidas infecções leva ao controle da densidade parasitária, portanto adultos são mais propensos a desenvolver infecções submicroscópicas (Okell et al., 2012). Embora indivíduos altamente expostos apresentem alto percentual de infecções assintomáticas quando comparados aos residentes em áreas de baixa exposição, este padrão não é repetido em nível mundial (Moshia et al., 2013). Em uma perspectiva mundial, em áreas de alta transmissão, com prevalência de parasitos detectados por microscopia seja $\geq 75\%$, a proporção de infecções assintomáticas é de cerca de 20%. Por outro lado, em áreas de baixa prevalência por microscopia ($\leq 10\%$), a proporção de infecções assintomáticas pode atingir 80% da população (Okell et al., 2012). É possível que a densidade parasitária em áreas de baixa transmissão seja afetada por diferentes fatores em nível local e mundial, além da influência da exposição atual e pregressa e o sucesso dos programas de controle baseados na prevalência por microscopia. Neste cenário, a imunidade residual da população favorece a manutenção da transmissão em níveis submicroscópicos (Satoguina et al., 2009), porém este fenômeno pode ser influenciado pela exposição dos indivíduos em eventos de autoctonia, com rápido aumento da resposta imune (Bejon et al., 2010) ou por um mecanismo imune efetivo que controla a densidade parasitária em áreas de baixa transmissão (Franks et al., 2001). Embora no Brasil 99% dos casos ocorram na Amazônia Legal, há casos autóctones em área de baixa transmissão da Região Extra-amazônica, incluindo assintomáticos com parasitemia submicroscópicas (Hristov et al., 2014; Pina-Costa et al., 2014). A ocorrência de infecções assintomáticas tem impacto nos programas de controle e eliminação da malária, bem como oferece riscos à segurança transfusional, com relatos de infecções a partir de doadores assintomáticos, albergando principalmente *P. malariae* (Scuracchio et al., 2011; Lima et al., 2018).

1.9 Diagnóstico

1.9.1 Gota Espessa

No Brasil, a técnica da gota espessa é o teste *gold standard* para o diagnóstico da malária devido à sua simplicidade na confecção, baixo custo e acessibilidade. O teste consiste numa maior concentração de sangue periférico na lâmina e posterior desmoglobinização e pré-coloração com azul de metileno fosfatado (para lise dos eritrócitos), seguido de coloração com Giemsa. Essa técnica apresenta uma sensibilidade 20 vezes maior que o esfregaço sanguíneo comum. A gota espessa permite a visualização do parasito, o estágio de desenvolvimento, a identificação e a quantificação do *Plasmodium*. A parasitemia pode ser apresentada em cruzes ou em número de parasitos/ μL , conforme apresentado na Figura 12. Em contrapartida, apresenta algumas desvantagens. Neste método não há fixação do material e ocorre lise dos eritrócitos durante o processo de coloração. Desta forma, a morfologia dos parasitos não é bem preservada, pois todo o processo deixa-os livres e passíveis de degradação. Essa característica exige que o microscopista tenha considerável nível de treinamento para avaliação e liberação seguras do diagnóstico. (Moraes et al., 2013).

Na microscopia a sensibilidade pode variar de 50 a 500 parasitos/ μL , mas numa realidade de campo a média seria de 100 parasitos/ μL (Milne et al., 1994; Moody, 2002; Oliveira, 2009).

A		
Parasitas contados	Número de campos microscópicos	Cruzes
40 a 60	100	+/2
1	1	+
2 - 20	1	++
21 - 200	1	+++
+ 200	1	++++

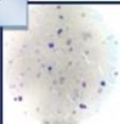
B	
	$\text{Número de parasitos } /\mu\text{L} = \frac{\text{Número de parasitos em 100 leucócitos} \times 6.000 \text{ leucócitos}}{100}$

Figura 12 - Padrão semiquantitativo de parasitemia em cruzes em diagnóstico de malária por gota espessa, em 100 campos microscópicos (A) e fórmula para diagnóstico quantitativo de parasitemia sanguínea adotados no Brasil (B).

FONTE: Ministério da Saúde/SVS. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, 2009
Foto: Maria de Lourdes R N Farinas

1.9.2 Testes Rápidos

Segundo Di Santi e Boulos (1999), em locais onde a estrutura laboratorial e de recursos humanos é precária o teste da gota espessa com pesquisa microscópica dos parasitos se torna, muitas vezes, inviável. Assim, utilizam-se os testes rápidos, que dispensam equipamentos e pessoal altamente capacitado.

Os testes rápidos descritos no Quadro 1, detectam os antígenos dos parasitos da malária que são liberados no rompimento eritrocitário: *histidine rich protein* II (HRPII), lactato desidrogenase (pLDH) e aldolase (Moraes et al., 2013). O teste de captura de PfHRP-II é específico para diagnóstico de *P. falciparum*, proteína presente nos estágios eritrocitários deste parasito. A pLDH detecta todas as formas de *Plasmodium* por possuir isoformas para cada espécie do parasito. A aldolase (antígeno pan-malárico) é comum a todas as espécies do parasito (Chiodini, 2014; Di Santi et al., 2004).

<i>Plasmodium</i>	HRP- II	pLDH-Pf	pLDH-Pan	pLDH-Pvmo	pLDH-Pv	Aldolase
<i>P. falciparum</i>	X	X	X			X
<i>P. vivax</i>			X	X	X	X
<i>P. malariae</i>			X	X		X
<i>P. ovale</i>			X	X		X

Quadro 1 - Biomarcadores utilizados nos testes rápidos para diagnóstico de malária.

FONTE: Moraes et al, 2013 (Adaptado do World Malaria Report, 2011)

Os testes rápidos podem apresentar algumas desvantagens: não são muito sensíveis em baixas parasitemias, não são quantitativos e não podem diferenciar as formas sexuadas das assexuadas; podem acusar falso-positivos por detectarem antígenos circulantes após a cura, resultar em falso-negativos em parasitemias muito altas em função da intensa concentração de antígenos, fenômeno denominado prozona e sofrer influência de altas temperaturas, diminuindo a sensibilidade (Moraes et al., 2013); ainda, há falhas no diagnóstico por PfHRP-II devido a deleções encontradas nos genes *pfHRP-II* e *pfHRP-III*. Gamboa e colaboradores (2010) reportaram no Peru 41% de amostras com deleção no gene *pfHRP-II* e 70% no gene *pfHRP-III*. Outros estudos têm reportado deleções nos dois genes na América do Sul (Akinyi et al., 2015),

América Central (Fontecha et al., 2018), Ásia (Bharti et al., 2016) e África (Wurtz et al., 2013). Além disso, pode ocorrer reação cruzada com o fator reumatoide, uma vez que autoanticorpos de pacientes com doenças reumáticas se ligam de forma inespecífica aos anticorpos da fita de nitrocelulose do teste. Assim, deve-se levar em consideração as vantagens e desvantagens dos testes rápidos e avaliar as situações de seu uso de maneira a não comprometer o diagnóstico da malária (Moraes et al., 2013).

1.9.3 Diagnóstico Molecular

Os métodos moleculares de detecção de DNA possuem excelente sensibilidade e especificidade, sendo eficientes para detectar infecções mistas e/ou parasitemias baixas em assintomáticos, resposta a antimaláricos, caracterização genotípica de *Plasmodium* e avaliação de novos testes diagnósticos (Moraes et al., 2013).

De acordo com Di Santi e colaboradores (2004), citando Waters & McCutchan (1989), foram descobertas sequências espécie-específicas da subunidade menor do RNA ribossomal de *Plasmodium* (região codificadora SSUrRNA). A partir disso, essas sequências têm baseado muitos testes moleculares por caracterizar polimorfismos de regiões conservadas do DNA do parasito.

A *polymerase-chain reaction* (PCR) consiste em um processo cíclico para a geração de milhares de cópias idênticas. Apresenta alta especificidade e sensibilidade, onde um par de oligonucleotídeos iniciadores flanqueia a sequência do gene desejado, sintetizando o DNA nas fitas simples produzidas pelo processo de desnaturação do DNA genômico (Mullis e Faloona, 1987; Alberts, 2010; Amaral, 2014), com a ação da enzima DNA-polimerase (Figura 13).

O limite de detecção (LoD) de um dos protocolos de PCR convencional mais utilizados (Snounou et al., 1993) é de 10 parasitos/ μL . Porém, as técnicas de qPCR tem se apresentado como alternativas mais sensíveis para detecção de baixas parasitemias.

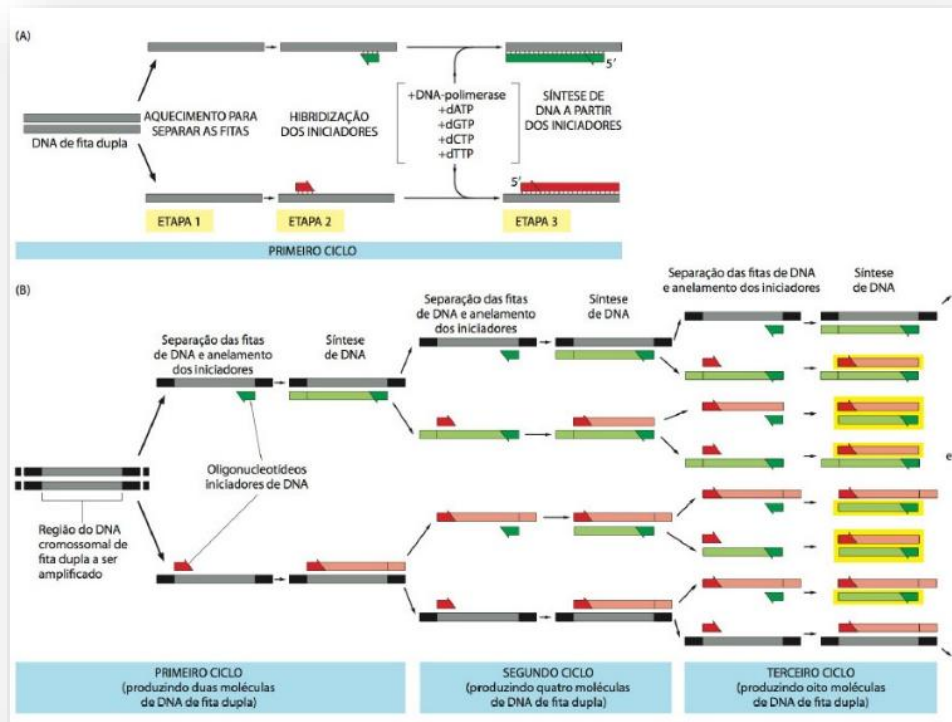


Figura 13 - Ciclos da PCR para amplificação de DNA genômico.
 FONTE: Alberts et al., 2010

1.9.4 qPCR

É uma técnica que permite o monitoramento, em tempo real, da quantificação da amplificação de fragmentos de DNA e RNA de forma precisa e com uma reprodutibilidade maior, porque determina valores exponenciais durante a reação. O ponto onde há a detecção do limiar da fase exponencial chama-se *Cycle Threshold* (Ct). Essa quantificação reprodutível e exata está baseada na fluorescência. (Amaral, 2014). A amplificação acontece em quatro fases: *baseline*, início da reação, quando ainda é baixo o nível de detecção da amplificação; exponencial, quando a amplificação está acontecendo com máxima eficiência e o aumento da fluorescência é diretamente proporcional ao aumento de produto amplificado durante os ciclos. Na fase linear há uma diminuição na eficiência de amplificação devido ao consumo dos reagentes na fase anterior. A fase platô ocorre ao final da reação, com os últimos ciclos da PCR (Shibley, 2006).

Existem dois sistemas na qPCR, a tecnologia *TaqMan*[®], uma enzima exonuclease 5'-3' e o sistema *SYBR*[®] Green (Oliveira, 2015). O sistema *TaqMan*[®] consiste na utilização de uma sonda, onde um oligonucleotídeo é

marcado com dois fluoróforos, um denominado *reporter* que, ao se ligar com a molécula de DNA na extremidade 5', emite fluorescência, e outro denominado *quencher*, capaz de absorver a luz emitida pelo *reporter* na extremidade 3' (Figura 14). A ação de degradação da enzima cliva a sonda marcada que está anelada especificamente na parte interna do seguimento de interesse entre dois *primers*. Se a ação ocorresse na forma íntegra, a energia do *reporter* seria transmitida e absorvida pelo *quencher*, mas como acontece a degradação da sonda pela atividade da *TaqDNA* polimerase, os fluoróforos são separados e a fluorescência emitida pelo *reporter* não é absorvida pelo *quencher*, o que aumenta a emissão de fluorescência que, por sua vez, é detectada e quantificada pelo equipamento. Quando o sinal fluorescente captado alcança um determinado nível (*threshold*) as amostras podem ser analisadas (Oliveira, 2015). Este ponto mostra o momento exato em que ocorre a fluorescência. É definido pelo pesquisador e deve representar quando a fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência de base (*background*) (Haas e Torres, 2016). A detecção é definida na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde amplificada pela reação (Almeida e Saddi, 2007). O sistema *TaqMan*[®] permite a amplificação através de mais de uma sonda com diferentes fluoróforos o que possibilita a quantificação de dois ou mais alvos ao mesmo tempo, de forma independente, o que caracteriza um protocolo multiplex (Oliveira, 2015).

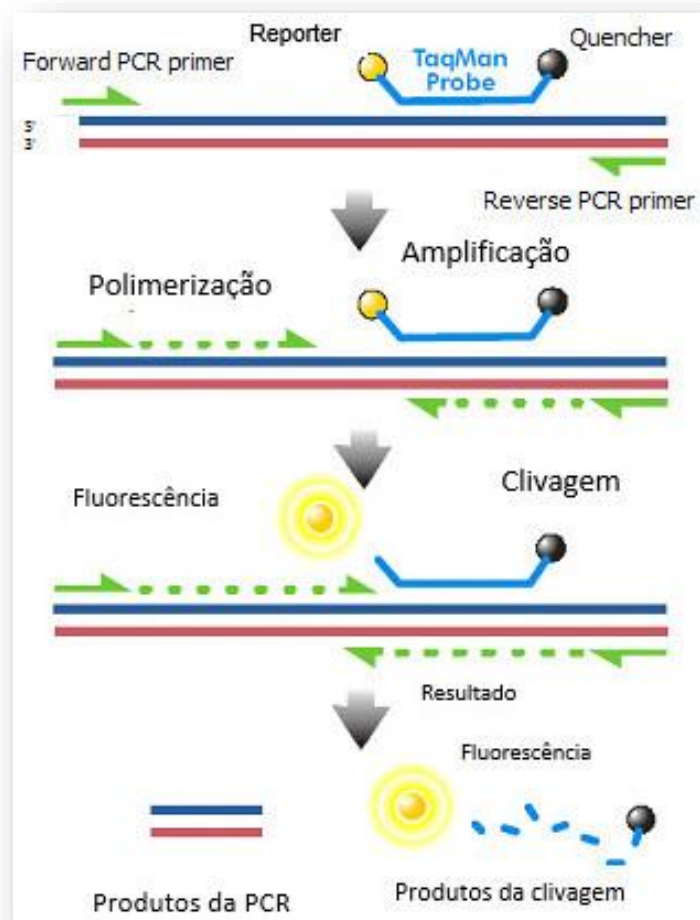


Figura 14 - Sistema *TaqMan*[®] utilizado em qPCR.

Fonte: <http://www.wikiwand.com/en/TaqMan>

No sistema SYBR Green[®] ocorre a ação de um agente intercalante do DNA, incorporando um corante livre, SYBR Green[®], a uma molécula de DNA, recém-sintetizada (Figura 15). A detecção (assim como no sistema *TaqMan*[®]) é dada pela intensidade de fluorescência durante os ciclos de repetição. Por se ligar a qualquer molécula fita dupla (DNA alvo ou não e dímeros de *primers*) o agente intercalante apresenta, assim a inespecificidade da reação como desvantagem (Shipley, 2006).

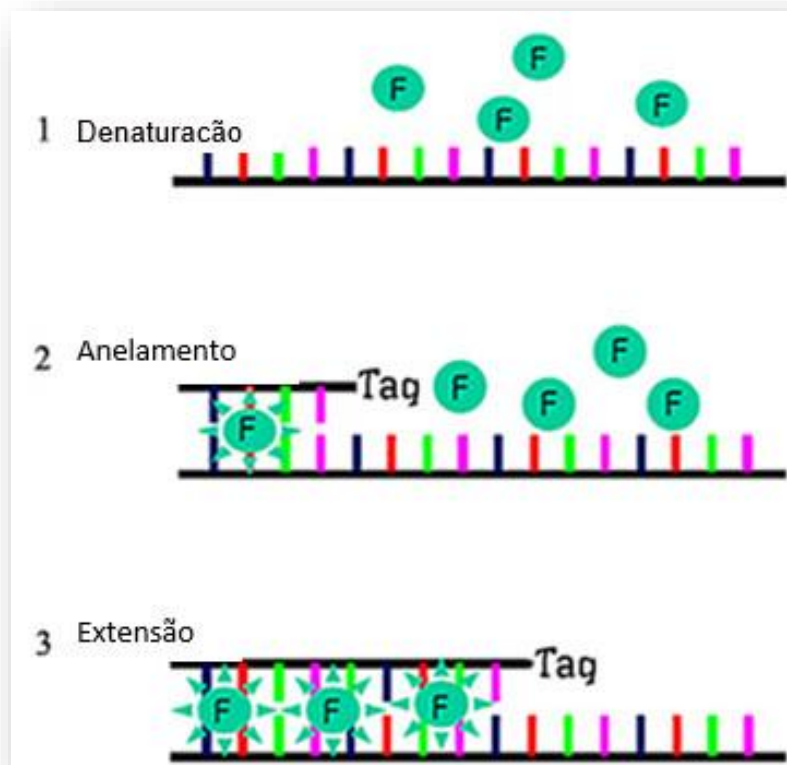


Figura 15 - Sistema SYBR Green® utilizado em qPCR.

FONTES: <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>

Com relação à sensibilidade, Perandin e colaboradores (2004) descreveram LoDs da qPCR para malária de 0,7 parasito/ μL para *P. falciparum*, 1,5 parasitos/ μL para *P. vivax* e 4 parasitos/ μL para *P. ovale*. Lima e colaboradores (2016) obtiveram LoD de 0,35 parasito/ μL em protocolo de qPCR gênero-específico para amplificação de genes ribossomais. No mesmo estudo o PET-gênero/PET-Pf (Lucchi et al., 2013) detectou 3,5 parasitos/ μL e o protocolo de Rougemont e colaboradores (2004) detectou 3,2 parasitos/ μL .

1.9.5 Nested PCR

A *nested* PCR é uma variação da PCR convencional que aumenta a sensibilidade de detecção da amostra de interesse porque ocorrem duplas reações de amplificação (Figura 16). A amplificação ocorrida na primeira PCR será molde para a segunda reação (amplicon 1). Nessa segunda reação ocorre a amplificação da sequência alvo interna à primeira PCR (amplicon 2) o que

aumenta a sensibilidade do método. Uma revisão sistemática com metanálise mostrou que entre 26 estudos comparando *nested* PCR com microscopia, 17 utilizaram o protocolo descrito por Snounou e colaboradores (1993). Os restantes utilizaram 18S *SSUrRNA* ou 28S *SSUrRNA*, dihidrofolato redutase ou o gene *mdr-1* de *P. falciparum* como alvos, com acurácia semelhante entre os protocolos (Snounou et al., 1993; Roth et al., 2016).

Por sua sensibilidade, a *nested* PCR pode ser um método adequado para a análise de organismos que tenham um número baixo de cópias, sendo muito útil para a detecção e especificidade do material de interesse (Montenegro, 2002; Abath et al., 2002).

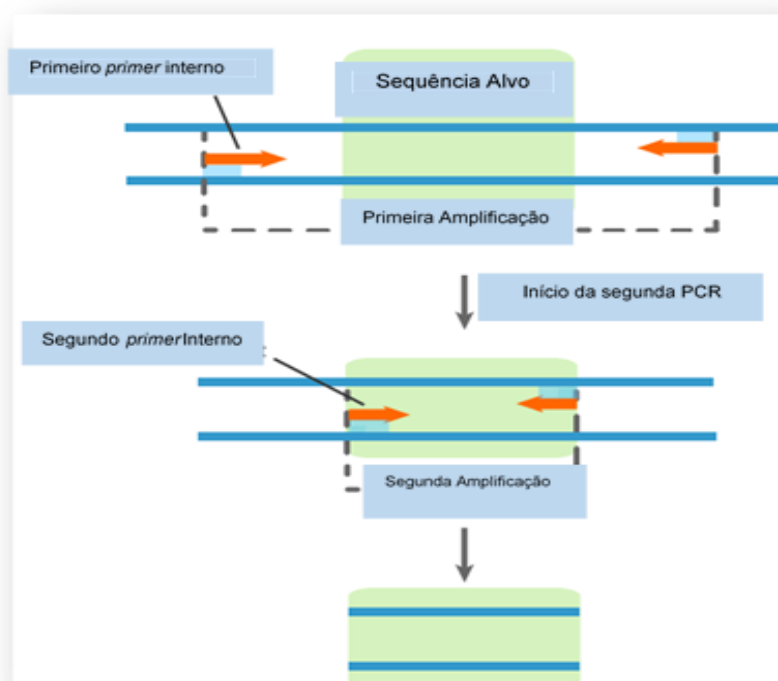


Figura 16 - Esquematização da *nested* PCR para amplificação de DNA genômico.

FONTE:

www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_variation_system.php

Nessa variação da PCR, citando como exemplo o protocolo de Snounou e colaboradores (1993), a primeira reação usa dois *primers* (rPLU6 e rPLU5) gênero-específicos. O produto dessa amplificação é submetido a uma nova reação onde cada espécie do parasito será detectada a partir de *primers* específicos. A amplificação é detectada por coloração com brometo de etídio,

GelRed ou Blue Green numa eletroforese em gel agarose onde é possível observar os diferentes tamanhos dos produtos amplificados de cada espécie, sendo 205 bp para *P. falciparum*, 144 bp para *P. malariae*, 120 bp para *P. vivax*, e 800 bp para *P. ovale* (Figura 17).

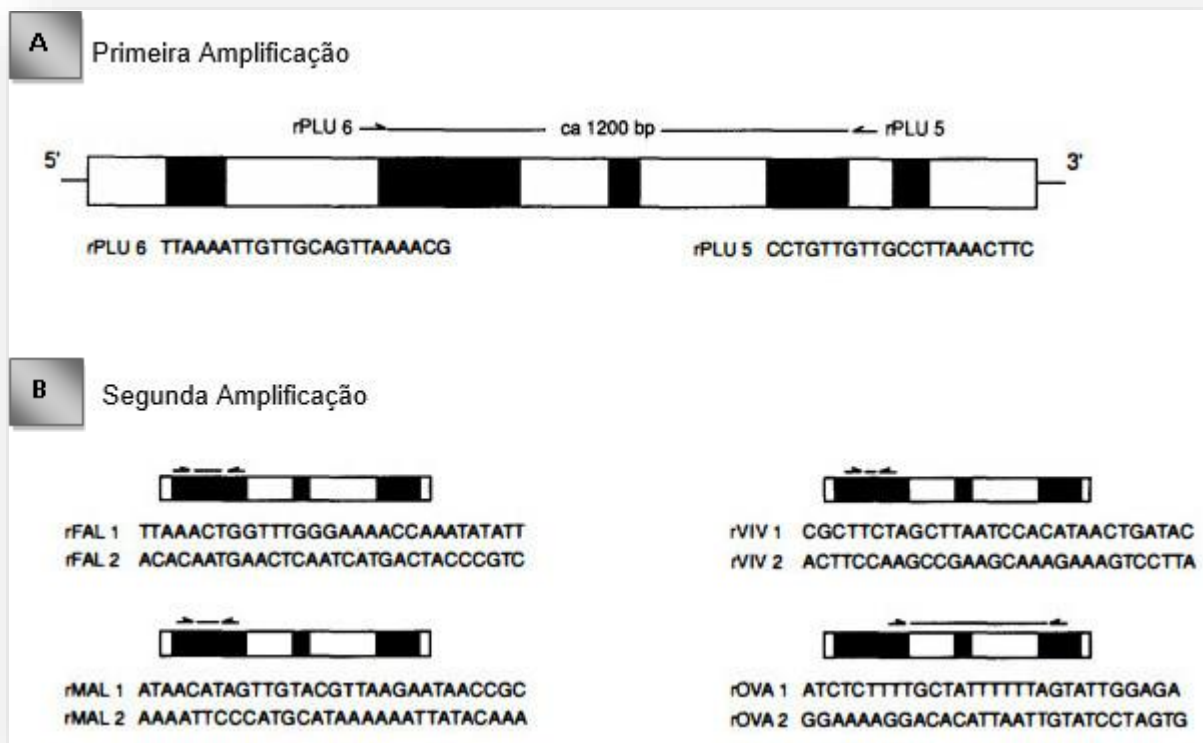


Figura 17 - Primers da *nested* PCR para amplificação de fragmentos de gene ribossomal. **A:** amplificação gênero-específica. **B:** amplificação espécie-específica para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*.

FONTE: Snounou et al, 1993.

Mais recentemente, foi descrito um protocolo de *nested* PCR para amplificação dos genes da dihidrofolato redutase (DHFR) e timidilato sintase (TS) com dois ciclos de amplificação gênero-específicos, seguidos de ciclos espécie-específicos para amplificação de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Tanomsing et al., 2010). Essas enzimas participam do ciclo do folato para produção de dTMP utilizado na síntese de DNA. A análise das sequências disponíveis de DHFR-TS de *Plasmodium* mostrou que as sequências das diferentes espécies localizadas em uma região de ligação única,

são altamente conservadas entre diferentes isolados da mesma espécie. Os autores desenharam *primers* degenerados específicos de *Plasmodium* que amplifica um fragmento de 1 kb que abrangendo os domínios da DHFR-TS de qualquer espécie de *Plasmodium* para a primeira amplificação, seguida de uma segunda amplificação gênero-específica (Figura 18). A terceira reação foi desenvolvida com cinco pares de *primers* localizados na região de ligação, específicos para cada uma das cinco espécies de *Plasmodium* humanos.

Quanto à sensibilidade e especificidade, este protocolo mostrou desempenho semelhante ao de Snounou e colaboradores (1993), com LoD de 1 a 10 genomas parasitários.

PF	TNNVGLNEQNCIKGEEKNNEMPLK-----NDDKDTCHMKKLTFFYKXVVDKYY-----INYENDDDDEEIDDFVYFIFNKEKKEKKNNSIHPNDFQIYNSLKVKY
PV	VGGGV--DGGANGSTAD--SARENCNALNCHAPKCSAPNCRSPNGGTAQQE-----KGGGPAACF--NKK-----NNAAEEDDLVYFSPNNKVGEE--KNPEHLQDFKIYNSLKIKQ
PM	RXXDLTQESLPHQSSGSDKGSNTSS--TISNGAMSNTIR-GSTTSSS--GKG-----XGGGES--IFEREYNFMGDEEDDLVYFNFNNKNE--YKNAENANDFKIYNSLKPKH
PO	KKQDTQNDGDSSEGSTTTTATA--TWPGIAGATSSMNIAE-TSTTYASSHRGKGSXWTKVCTKSGAEWVKGMT--TSQGGKNVDEEDDYMYFSPNNKKK--SQIGKNAEDFEIYNTIKLKQ
PK	VGGEV--DGGASNGSTMDGDSGRENCEVVKCGAPNCTSGCISPNCTSTREEK-----NRKCSPAQ--NKK-----SNADVEEDDLVYFSPNNKVGEE--KNPEHLQDFKIYNSVKIKQ

Pla-DHFR- Forward	ATGGARSAMSTYTSMGABGTWTTYGA
Pla-TS- Reverse	AAATATTGRTAYTCTGGRTG
Pla-DHFR-N	
Forward	AAATGYTTYATYATWGGDGG
Pla-TS- Reverse	AAATATTGRTAYTCTGGRTG
PF-Lin- Forward	AAAAGGAGAAGAAAAAATAA
PF-Lin- Reverse	AAAATAAACAAAATCATC
PM-Lin- Forward	GACCCAAGAATCCCTCCC
PM-Lin- Reverse	CCCATGAAGTTATATTCC
PV-Lin- Forward	CGGGAGCACTGCGGACAGCG
PV-Lin- Reverse	CACGGGCACGCGGGCGGGGC
PO-Lin- Forward	GACACACAAAATGATGGGGA
PO-Lin- Reverse	ATTGTCCTTTCCTTGACTCG
PK-Lin-Forward	CGATGGATATGGATAGTGG
PK-Lin- Reverse	CGCGGGAGAGCATTTCCTC

Figura 18 - Alinhamento de aminoácidos (DHFR-TS) na região de ligação das espécies de *Plasmodium* que infectam humanos e sequência de *primers* para as duas reações de *nested* PCR gênero-específico e para as cinco reações espécie-específicas para detecção de *P. falciparum* (PF); *P. vivax* (PV); *P. malariae* (PM); *P. ovale* (PO); *P. knowlesi* (PK).

FONTE: Tanomsing et al., 2010

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de considerável número de estudos e conhecimentos adquiridos sobre a malária, ainda há desafios quanto ao diagnóstico e métodos de identificação de *Plasmodium*. A proposta deste estudo é a utilização de diagnóstico molecular como ferramenta para detecção de casos assintomáticos em área de autoctonia do estado de São Paulo, que possa ser utilizada no controle e monitoramento da doença na Região Extra-amazônica. O estudo fundamenta-se no uso de protocolos moleculares como a qPCR na investigação das baixas parasitemias em amostras de difícil detecção do parasito por meio da gota espessa, além de avaliar o desempenho da *nested* PCR, protocolo sensível e específico, para determinação das espécies do parasito.

Apesar de ser o padrão-ouro no diagnóstico da malária, a gota espessa requer extrema experiência do microscopista, assim, o baixo número de casos notificados no Estado de São Paulo pode ser maior, o que expõe a fragilidade da técnica quanto à acurácia e a rapidez necessárias para o diagnóstico.

O uso de técnicas mais sensíveis e específicas para a investigação da malária pode incrementar a detecção de portadores assintomáticos na população exposta, mapear com maior precisão os locais onde ocorre transmissão no estado de São Paulo, com mais acurácia na determinação das espécies, melhorando a qualidade e eficiência dos programas de controle.

De acordo com as normas técnicas do Programa de Controle da Malária no estado de São Paulo, quando são detectados casos autóctones algumas medidas imediatas devem ser deflagradas: a população residente num raio de 5 Km a partir da residência do primeiro paciente é considerada como pertencente à área do foco e deve ser investigada para verificação de novos casos. Simultaneamente devem ser iniciados os estudos entomológicos para confirmação das espécies envolvidas na transmissão. A pesquisa de novos casos se dá por meio da coleta de lâminas de investigação de casos, independente de apresentarem estado febril (Andrade et al., 1986). É necessário observar que, por questões de logística, nem sempre é possível realizar a busca por novos casos num raio de 5 Km, comprometendo a detecção de infecções assintomáticas que têm sido reportadas na área costeira e com cobertura de Mata Atlântica, onde se concentram os casos autóctones atualmente. Como o

teste de referência é a gota espessa e as parasitemias majoritariamente são extremamente baixas, o diagnóstico pode falhar na determinação da (s) espécie (s) circulantes, como observado em estudo com dados secundários, que apontou *P. vivax* como principal agente etiológico na região (Couto et al., 2010). É importante considerar que, dependendo da densidade populacional, centenas de amostras de sangue são coletadas a partir de um caso autóctone, comprometendo o tempo de resolução do foco. Além disso, a positividade certamente é subdimensionada pela baixa sensibilidade da gota espessa em baixas parasitemias.

Embora este tipo de infecção não tenha implicações do ponto de vista clínico, parasitos circulantes em moradores assintomáticos propiciam a infecção de *Anopheles* e interferem na dinâmica de transmissão da malária. Além disso, uma consequência importante é a possibilidade de transmissão de malária por via transfusional, visto que a Portaria do Ministério da Saúde que regulamenta os serviços hemoterápicos (Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017), aborda a triagem epidemiológica com base em áreas endêmicas. Casos de doadores portando *Plasmodium*, bem como de malária transfusional a partir de doadores assintomáticos infectados em regiões do estado de São Paulo com as mesmas características têm sido reportados (Aschar et al., 2020; Scuracchio et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1. Geral: Detectar infecções assintomáticas por *Plasmodium* em residentes de áreas de foco de malária, de municípios do estado de São Paulo.

3.2. Específicos:

- Realizar triagem, por meio de qPCR gênero-específico para amplificação da *ssrRNA* de *Plasmodium*, em amostras de sangue de residentes em áreas de foco de malária de municípios do estado de São Paulo.
- Realizar *nested* PCR espécie-específico para amplificação da *ssrRNA* e DFFR-TS de *Plasmodium* nas amostras positivas por qPCR para o gênero *Plasmodium*, para identificação das espécies do parasito.
- Determinar a prevalência de infecções assintomáticas em cada município analisado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo observacional analítico transversal, com amostras de moradores residentes em áreas de focos de malária autóctone do estado de São Paulo. Estas amostras fazem parte das atividades de vigilância epidemiológica da SUCEN e foram processadas para extração de DNA e realização de qPCR e *nested* PCR.

4.2. Área e população do estudo

Esse estudo abrangeu 16 municípios do estado de São Paulo localizados em área de Mata Atlântica, apresentada na Figura 19.

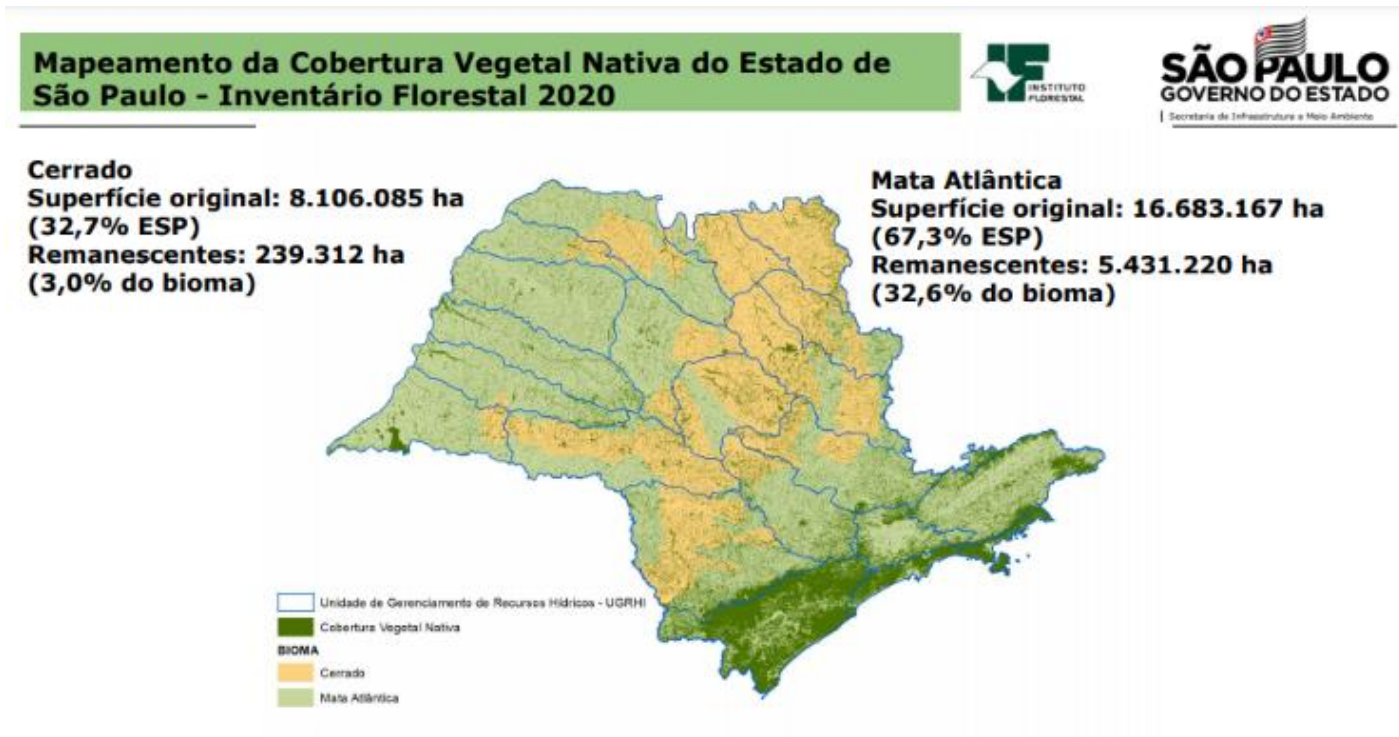


Figura 19 - Mapa do estado de São Paulo, apresentando a cobertura de Mata Atlântica remanescente, 2020.

FONTE: <https://smastr16.blob.core.windows.net/home/2020/07/0apresentacao-inventario-florestal-2020-v1.pdf?hcb=>

Para efeito de organização das coletas, a área de estudo considerou as Regiões Imediatas (RI) do estado de São Paulo, quais sejam: Registro, Sorocaba, Santos, São Paulo, Caraguatatuba/Ubatuba/São Sebastião e Taubaté (Figura 20). Nestas regiões, todos os municípios onde foram realizadas as coletas são inseridos no Bioma de Mata Atlântica.

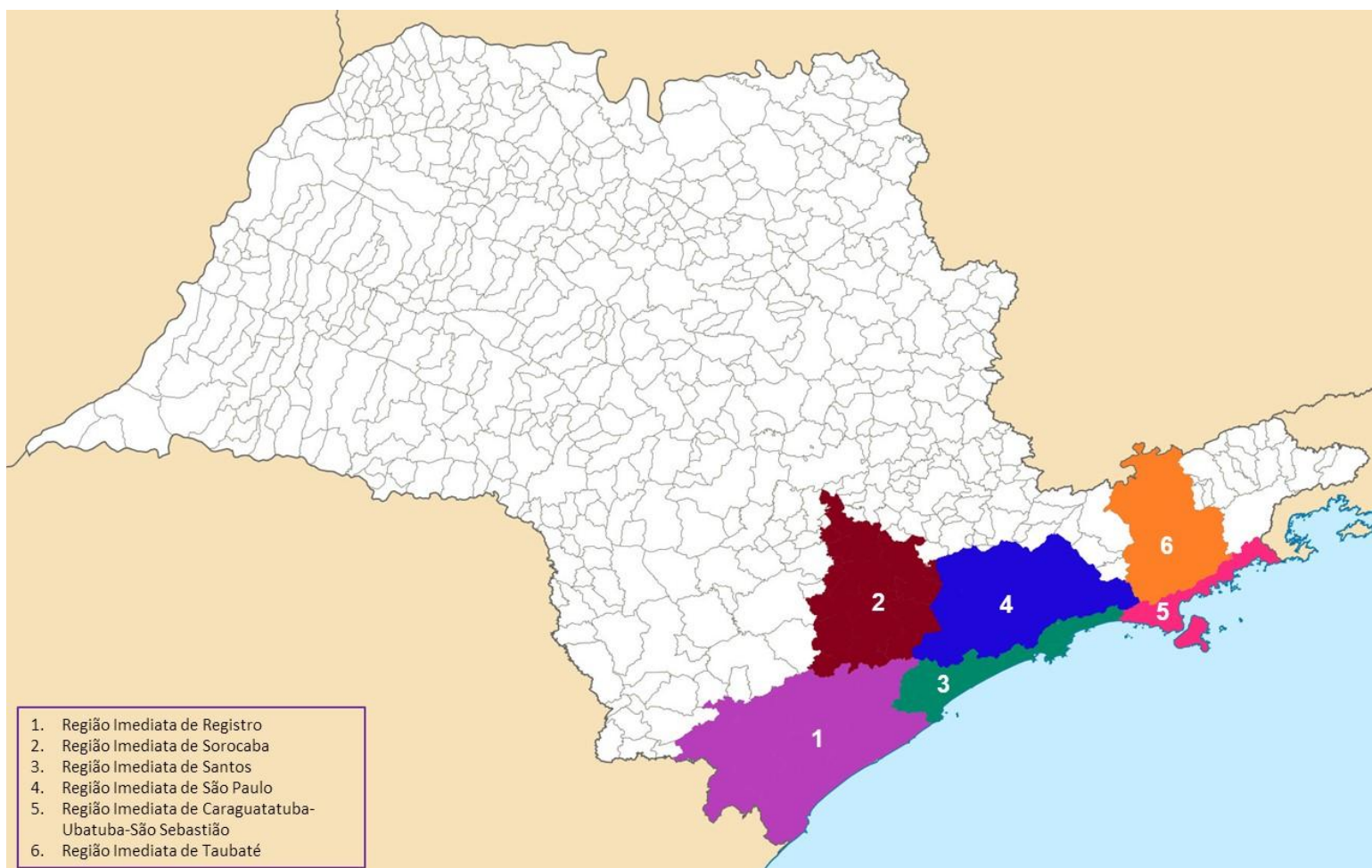


Figura 20 - Mapa do estado de São Paulo apresentando as Regiões Imediatas, onde se inserem os municípios estudados.

Fonte: <http://www.bibliotecavirtual.sp.gov.br/temas/sao-paulo/sao-paulo-aspectos-territoriais.php>

Elaboração da arte: MLRN Farinas

4.3. Caracterização das amostras

Foram analisadas 955 amostras de sangue coletadas em atividade de Busca Ativa realizadas nos municípios com notificação de casos autóctones, localizados nas seguintes RIs do estado de São Paulo:

1. Região Imediata de São Paulo (n= 179)



Amostras procedentes dos municípios de Juquitiba, Salesópolis, São Bernardo do Campo, São Paulo (Parelheiros).

2. Região Imediata de Santos (n= 177)



Amostras procedentes dos municípios de Bertioga, Mongaguá

3. Região Imediata de Sorocaba (n= 16)



Amostras procedentes do município de Tapiraí

4. Região Imediata de Registro (n= 37)



Amostras procedentes dos municípios de Cananéia, Iporanga, Juquiá, Sete Barras

5. Região Imediata de Caraguatatuba-Ubatuba-São Sebastião (n= 464)



Amostras procedentes dos municípios de Caraguatatuba, Ilhabela, São Sebastião, Ubatuba

6. Região Imediata de Taubaté-Pindamonhangaba (n= 81)



Amostras procedentes do município de Natividade da Serra

Não foi possível identificar a origem de uma amostra de sangue de 2004.

A Figura 21 apresenta as atividades de Busca Ativa realizada em Salesópolis, em 2019.



Figura 21 - Atividade de Busca Ativa realizada no município de Salesópolis, SP, em fevereiro de 2019.

Fotos: MLRN Farinas

4.4. Fluxograma de trabalho

Dentre as 955 amostras, 371 foram coletadas por punção venosa em tubo com EDTA (Greiner Bio-One, Áustria) e 584 por punção digital e plotagem em papel filtro (DBS, do inglês *dried blood spots*). As coletas em campo utilizaram papel filtro Whatman® FTA® (Merck, Alemanha), conforme apresentado na Figura 22. O fluxo de processamento dos protocolos é descrito na Figura 23.

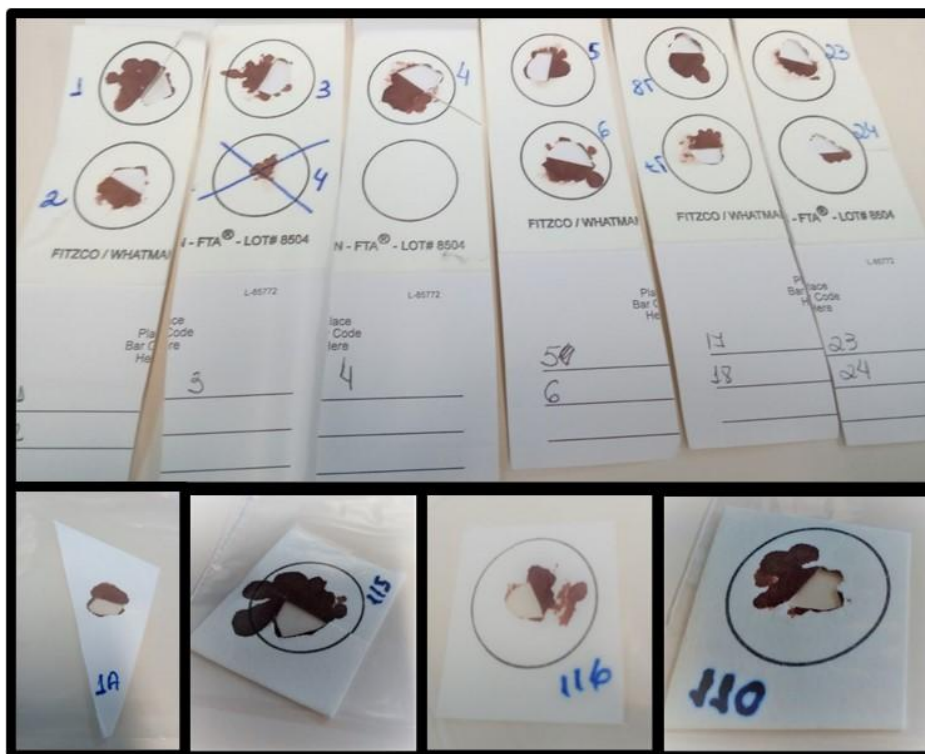


Figura 22 - Ilustração de amostras de sangue total coletadas em papel filtro Whatman® FTA®.

Foto: MLRN Farinas

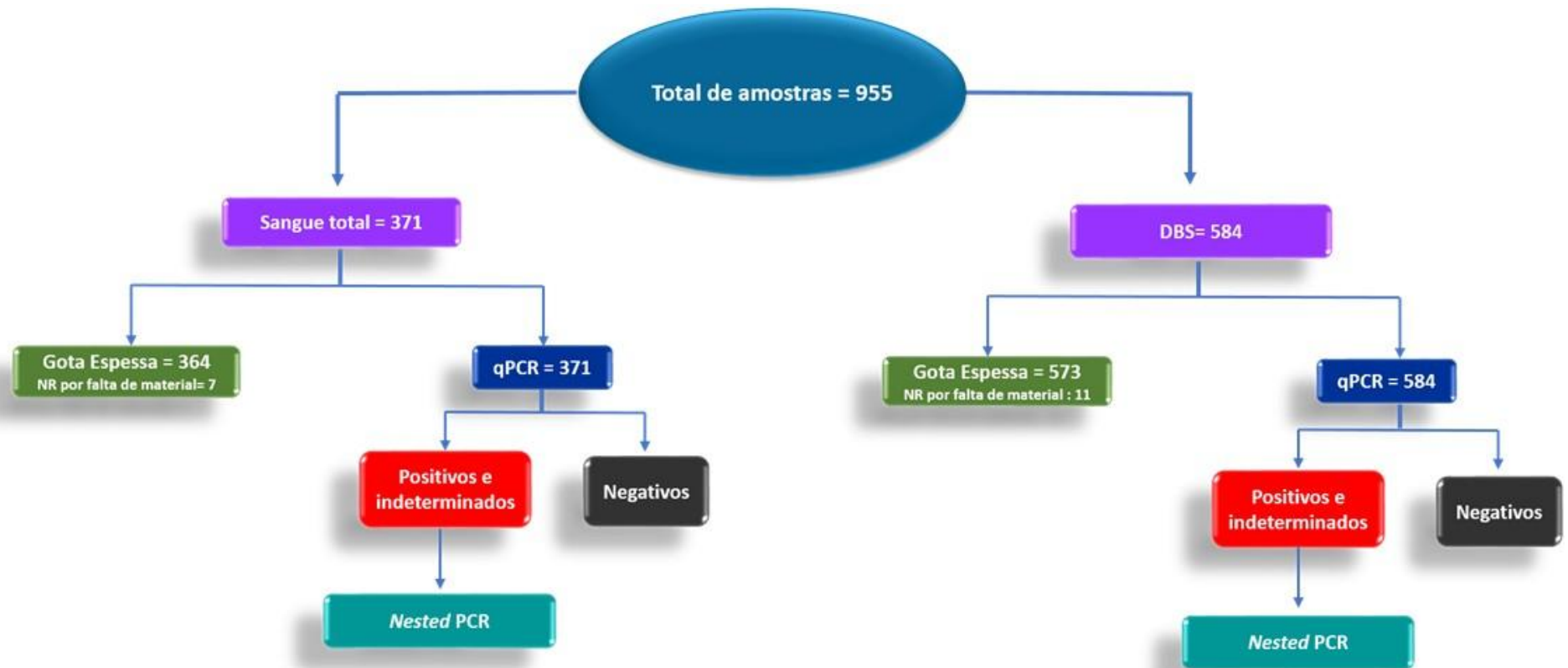


Figura 23 - Fluxo de processamento das 955 amostras de sangue ensaiadas por gota espessa, qPCR e *nested* PCR.
Elaboração da arte: MLRN Farinas

4.5. Hemoscopia por gota espessa

As amostras de sangue foram submetidas ao exame de gota espessa nas atividades de controle de foco, de acordo com o preconizado pelo Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM (Brasil, 2003). O sangue foi coletado por punção digital após assepsia com álcool 70%, utilizando-se lanceta descartável. Foram depositadas duas gotas de sangue em lâmina histológica, com dados referentes ao local de coleta, data e identificação de cada indivíduo. Após a secagem o material foi submetido à lise e pré-coloração com azul de metileno fosfatado. O material foi corado por sete minutos com corante de Giemsa e examinado em objetiva de imersão 1000x. A determinação da espécie e a contagem da parasitemia foram realizadas de acordo com o preconizado (Brasil, 2009). Os exames foram realizados por diferentes equipes com experiência em diagnóstico laboratorial da malária, de acordo com a localização geográfica de cada foco.

4.6. Extração de DNA genômico de amostras de sangue total colhidas em EDTA

O DNA de cada amostra de sangue colhido em EDTA foi extraído mediante lise de hemácias com saponina a 1% (Serva, Heidelberg, Alemanha) e lavagens com água ultrapura para que um pellet de hemácias concentrado fosse obtido; deste *pellet* foram utilizados 200µL para a extração do material genético com QIAamp DNA Blood Mini Kit (QiAgen®, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante, conforme ilustrado na Figura 24. A eluição do gDNA foi realizada em volume de 50µL para concentração do DNA.



Figura 24 - Esquema de extração de DNA genômico de amostras de sangue total colhidas em EDTA.

Elaboração da arte: MLRN Farinas

4.7. Extração de DNA genômico de amostras de sangue total colhidas em DBS

4.7.1 Chelex®100

As amostras plotadas em papel filtro foram extraídas com Chelex®100 (Bio-Rad™, Estados Unidos da América). A área do papel filtro contendo o sangue foi cortada (aproximadamente 1 cm²) e transferida para um tubo estéril de 1,5 mL. A seguir, foi acrescentado 1 mL de saponina 0,5% em PBS a cada tubo e estes foram incubados a 37°C durante 1 hora e meia. Depois, a solução acastanhada foi totalmente retirada e adicionado 1 mL PBS 1x autoclavado, com incubação a 4°C por 30 minutos. Em novos tubos de 1,5 mL foram adicionados 50 µL de Chelex®100 a 20% e 150 µL de água destilada estéril e colocados em banho-maria a 100°C. O PBS das amostras que estavam a 4°C foi retirado e substituído pela solução de Chelex®100 aquecida. Os tubos foram homogeneizados vigorosamente durante 30 segundos e incubados em banho-maria a 100°C durante 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi transferido para o tubo final e armazenado a -20°C (Plowe et al., 1995).

4.7.2 InstaGene™

Algumas amostras foram plotadas em papel filtro para serem extraídas com InstaGene™ (Bio-Rad™, Estados Unidos da América) para testar a metodologia. A área do papel filtro contendo o sangue foi de aproximadamente 15 mm e transferida para um tubo estéril de 1,5 mL. A seguir, foram acrescentados 100 µL de PBS a cada tubo e estes foram incubados *overnight* a 4°C. Depois, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 100 µL de PBS novamente. Foi feita mais uma centrifugação a 14000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado. Foram adicionados 200 µL de InstaGene™ e as amostras foram incubadas a 56°C por 30 minutos, vortexando aos 15 minutos da incubação. Os tubos foram novamente vortexados ao final da incubação e foram colocados a 100°C durante 8 minutos. Após centrifugação de 13000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi transferido para o tubo final e armazenado a -20°C.

4.8 Processamento das amostras por qPCR

O ensaio seguiu o protocolo descrito por Lima e colaboradores (Lima et al., 2011) com os *primers* M60 e M61 e a sonda M62 marcada com FAM™ e TAMRA™ (Applied Biosystems™, Estados Unidos da América) para amplificação de sequências da unidade ribossomal menor (*ssrRNA*) de *Plasmodium*, esquematizados na Tabela 1. A reação de qPCR foi preparada com 2,5 µL de DNA genômico adicionados a um volume de 22,5 µL por reação contendo 12,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems™, Estados Unidos da América), 0,50 µM de cada *primer* gênero-específico (M60 e M61) e 0,3 µM da sonda M62; as condições de amplificação e detecção foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto (Figura 25). As amostras foram ensaiadas em duplicata no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Estados Unidos da América). Em todos os ensaios foram utilizados controles positivos e negativos. Os controles positivos foram obtidos de diluição seriada de culturas de *P. falciparum*, em diluições de 0,1; 1; 10; 100; 1.000 e 10.000 parasitos/µL, de modo a se obter uma curva padrão para determinação de parasitemia. Os

controles negativos utilizados foram DNA de amostras comprovadamente negativas. O LoD deste protocolo é de 1 parasito/ μ L, validado em estudos anteriores.

Tabela 1. Sequência dos *primers* gênero-específicos para *Plasmodium* e sonda FAM™ e TAMRA™ para qPCR.

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

Fonte: Gama et al., 2007



Figura 25 - Esquemática do ensaio de qPCR (Lima et al, 2011), com os *primers* M60 e M61 e a sonda M62 marcada com FAM™ e TAMRA™ para amplificação de sequências da unidade ribossomal menor (*ssrRNA*) de *Plasmodium*.

Elaboração da arte: MLRN Farinas

Neste estudo não foi utilizado controle interno, visto que as amostras foram colhidas de moradores assintomáticos das áreas de foco que, se positivos, provavelmente portariam baixas parasitemias. Em ensaios anteriores do grupo foram evidenciadas diferenças significativas nos valores de *Ct*, quando uma mesma amostra foi ensaiada com e sem controle interno na reação de qPCR. Em parasitemias muito baixas, a adição de controle interno poderia levar a uma reação falso-negativa. O Quadro 2 mostra as diferenças de *Ct* em diferentes parasitemias (Lima, 2011).

PCR em tempo real realizado em triplicata com amostras de <i>P. falciparum</i> de cultura em diluições seriadas, com e sem GAPDH.								
Well	Amostra	Parasitemia	Ct		Média		diferença	diferença %
			Com GAPDH 10/11/2009	Sem GAPDH 22/10/2009	Com GAPDH 10/11/2009	Sem GAPDH 22/10/2009		
A1	PFA	3.200p/μL	24,22	21,28	24,36	21,32	-3,04	14,24
B1	PFA		24,26	21,37				
C1	PFA		24,6	21,32				
D1	PFB	320p/μL	26,84	23,76	26,88	23,82	-3,06	12,85
E1	PFB		26,87	23,8				
F1	PFB		26,92	23,89				
A2	PFC	36p/μL	30,14	27,53	30,18	27,55	-2,63	9,56
G1	PFC		30,29	27,49				
H1	PFC		30,12	27,63				
B2	PFD	3,6p/μL	35,15	31,57	34,66	31,36	-3,30	10,52
C2	PFD		34,19	31,4				
D2	PFD		34,63	31,1				
E2	PFE	0,36p/μL	37,74	33,42	37,29	33,54	-3,74	11,16
F2	PFE		36,86	33,49				
G2	PFE		37,26	33,72				
A3	PFY	1p/μL	35,68	33,3	36,09	33,27	-2,82	8,47
B3	PFY		36,28	33,18				
H2	PFY		36,3	33,33				
C3	PFZ	0,5p/μL	38,03	34,3	37,32	34,43	-2,89	8,39
D3	PFZ		37,52	34				
E3	PFZ		36,42	35				
A4	(Contr.+) Pool valid. 14	1440p/μL	26,02	22,65	26,06	22,58	-3,48	15,42
H3	(Contr.+) Pool valid. 14		26,09	22,5				
F3	(Contr. +) S-19/90	32.400p/μL	Undetermined	21,38	0,00	21,35	21,35	-100,00
G3	(Contr. +) S-19/90		Undetermined	21,31				

Quadro 2 - Resultados de qPCR com e sem adição de controle interno em amostras com diferentes parasitemias.

Fonte: Lima, 2011 (Dissertação de Mestrado)

4.9 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com QIAamp DNA Blood Mini Kit, InstaGene™ e Chelex®100

Foram realizadas diluições seriadas de um controle positivo de *P. falciparum*, com parasitemia exata, utilizando sangue negativo para malária para as diluições em razão 2, de 5000 parasito/ μ L a 0,3 parasito/ μ L, para a extração com QIAamp DNA Blood Mini Kit. Algumas dessas diluições (2500, 312, 156, 78, 10 e 5 parasitos/ μ L) foram plotadas em DBS, num volume de 50 μ L e a extração seguiu os protocolos de InstaGene™ e Chelex®100 já mencionados.

4.10. Processamento das amostras por *nested* PCR

Após o processamento de todas as amostras por qPCR, as positivas para *Plasmodium* foram analisadas por *nested* PCR tendo genes *ssrRNA* como alvo, com 25 µL em cada reação, sob as seguintes condições: uma primeira reação com 250 nM de cada *primer* gênero-específico rPLU5 e rPLU6, 125 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 0,4 U de *Taq* polimerase e 1 µL de gDNA como *template*. A amplificação foi de: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos e 24 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, com um ciclo final de 72°C por 5 minutos. A segunda reação seguiu o mesmo protocolo, porém com os *primers* rVIV1/rVIV2, rMAL1/rMAL2 e rFAL1/rFAL2 (espécies) e 1 µL do amplificado da primeira reação como *template*. Foram realizados 30 ciclos nas mesmas condições. As sequências de *primers* das duas reações estão apresentados na Tabela 2. Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1-1,5%) em tampão TBE e corados com Blue Green (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil). Em todos os ensaios de PCR foram incluídos controles positivos e negativos. Como controles positivos foram utilizadas amostras confirmadas por PCR como *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Amostras de sangue negativas para *Plasmodium* por PCR, coletadas de indivíduos sem deslocamento para área endêmica e sem relato de malária anterior foram processadas para extração de DNA e utilizadas como controles negativos (Snounou et al., 1993).

Tabela 2. Sequência de *primers* gênero-específico e espécie-específico usados nas reações de *nested* PCR.

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'
<i>Forward</i> - rPLU6	TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG
<i>Reverse</i> - rPLU5	CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC
<i>Forward</i> - rVIV1	CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC
<i>Reverse</i> - rVIV2	ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA
<i>Forward</i> - rMAL1	ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC
<i>Reverse</i> - rMAL2	AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA
<i>Forward</i> - rFAL1	TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT
<i>Reverse</i> - rFAL2	ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC

Fonte: Snounou et al., 1993.

4.11. Processamento das amostras por DHFR-TS *nested* PCR

O protocolo de Tanomsing e colaboradores (2010) foi utilizado, com duas ampliações para gênero *Plasmodium* e ampliações aninhadas para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*. Para a primeira reação foram utilizados os *primers* gênero-específicos *Pla*-DHFR-F e *Pla*-TS-R, gerando um fragmento de 1 Kb, e para a segunda reação foram utilizados os *primers* também gênero-específicos *Pla*-DHFR-NF e *Pla*-TS-R, amplificando um fragmento de 509-587 bp. Os seguintes ensaios de *nested* PCR utilizaram *primers* espécie-específicos para as espécies de *Plasmodium* (PV-Lin- Forward e PV-Lin- Reverse para *P. vivax*; PM-Lin- Forward e PM-Lin- Reverse para *P. malariae*; PF-Lin- Forward e PF-Lin- Reverse para *P. falciparum* (Figura 16). Foram utilizados 25 µL para cada reação, sob as seguintes condições: 250 nM de cada *primer* gênero-específico ou espécie-específicos (Invitrogen, Brasil), 125 µM dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América), 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 0,4 U de *Taq* polimerase (Go*Taq* HotStart, Promega, Brasil) e 1 µL de DNA genômico para a primeira reação ou 1 µL do amplificado obtido nas reações anteriores. A concentração de MgCl₂ foi de 3 mM nas reações gênero-específicas e para *P. malariae*. Para *P. falciparum* e *P. vivax* a concentração de MgCl₂ foi de 2 mM. As condições de ciclagem são descritas no Quadro 3.

Primer	Espécies	Denaturação inicial	Anelamento	Extensão	Denaturação	Nº de ciclos	Extensão Final
Pla-DHFR-F	<i>Plasmodium spp.</i>	95°C por 5'	50°C por 1'	72°C por 1'	94°C por 1'	30	72°C por 5'
Pla-TS-R							
Pla-DHFR-NF	<i>Plasmodium spp.</i>	95°C por 5'	55°C por 1'	72°C por 1'	94°C por 1'	35	72°C por 5'
Pla-TS-R							
PF-Lin-F	<i>P. falciparum</i>	95°C por 5'	50°C por 1'	72°C por 1'	94°C por 1'	35	72°C por 5'
PF-Lin-R							
PM-Lin-F	<i>P. malariae</i>	95°C por 5'	50°C por 1'	72°C por 1'	94°C por 1'	35	72°C por 5'
PM-Lin-R							
PV-Lin-F	<i>P. vivax</i>	95°C por 5'	58°C por 1'	72°C por 1'	94°C por 1'	35	72°C por 5'
PV-Lin-R							

Quadro 3 - Condições de ciclagem da DHFR-TS *nested* PCR.

Fonte: Tanomsing et al., 2010.

Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TBE e corados com Blue Green (LGC Biotecnologia Ltda., Brasil). Foi utilizado marcador de peso molecular 100-2000bp (Norgen Biotec Corp., Canadá). Os fragmentos obtidos foram de 144 bp para *P. vivax*, 177 bp para *P. malariae* e 160 bp para *P. falciparum*.

4.12. Aspectos Éticos da Pesquisa

As amostras de sangue armazenadas foram coletadas em eventos de controle de foco, como parte das atividades de vigilância epidemiológica da SUCEN em parceria com os municípios envolvidos. As amostras positivas (controles) foram coletadas em projetos anteriores, devidamente aprovados por Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas e são integrantes do Biorrepositório do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da USP, com o qual a SUCEN tem Acordo de Cooperação Científica. Como não existe a possibilidade de contato com os indivíduos para obtenção de TCLE para a utilização do material armazenado em nova pesquisa, foram cumpridas as exigências em relação aos aspectos éticos da conservação e utilização do material biológico estocado, bem como das informações obtidas a partir dele e foi garantida a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos envolvidos. Estas condutas estão de acordo com as determinações da Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética e

Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP (Parecer 2.728.246).

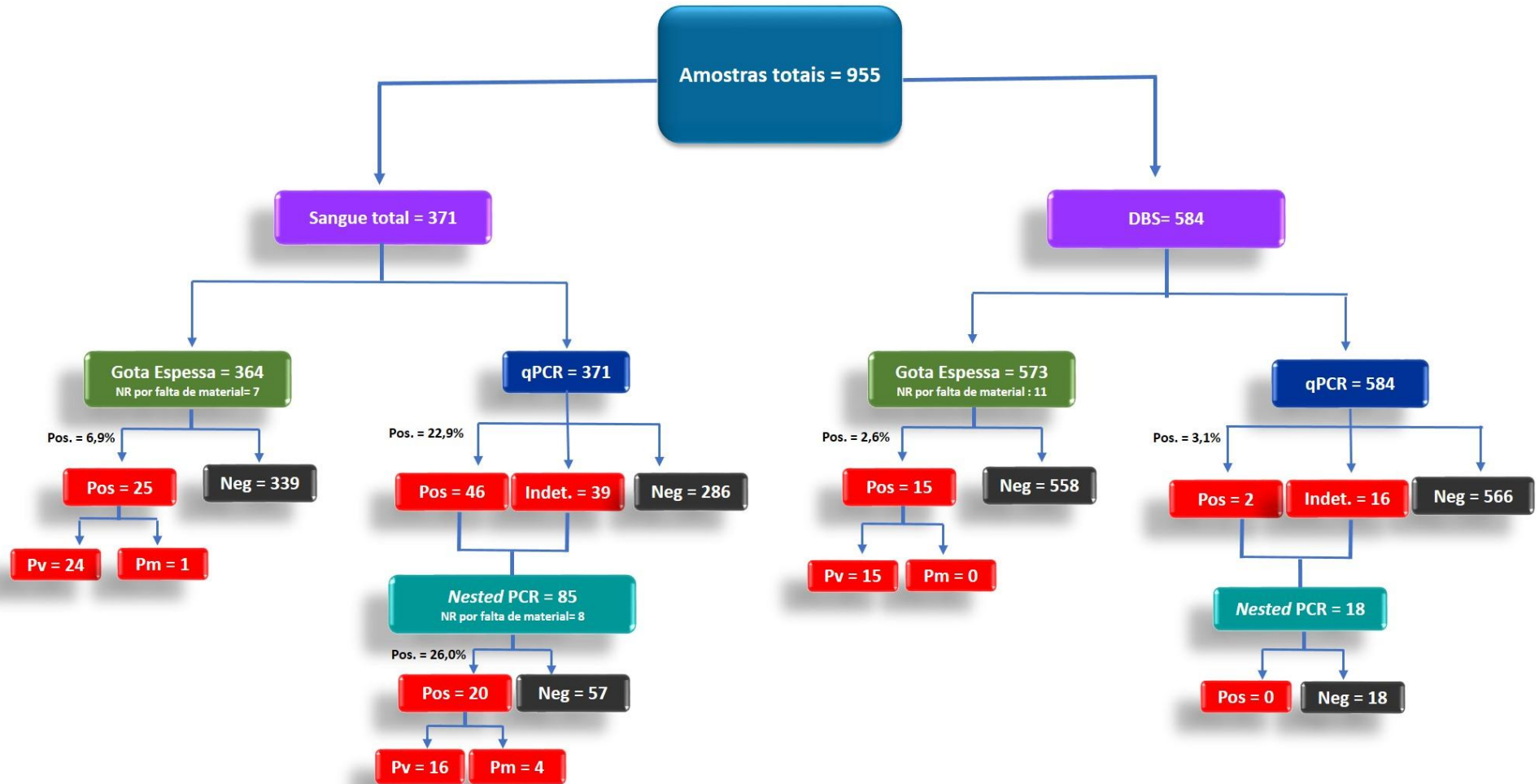
4.13. Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando os softwares *GraphPad Prism* 5.0 e *QuickCalcs GraphPad* (GraphPad Software Inc., Estados Unidos da América). A positividade dos testes foi calculada com 95% de intervalo de confiança (IC) e para a correlação entre os testes, considerando a amostragem total e cada município, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. A concordância entre os testes foi calculada pelo Índice Kappa (k). Os níveis de significância dos testes empregados na análise estatística foram fixados aceitando um erro tipo 1 de 5% ($\alpha=0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Fluxograma dos resultados por método de coleta e técnica utilizada

Foram analisadas 955 amostras de sangue coletadas em atividades de Busca Ativa realizadas em municípios em área com focos de malária no estado de São Paulo. Dentre as amostras coletadas, 371 foram colhidas em EDTA (sangue total) e 584 em DBS. As amostras foram processadas por GE no momento das atividades de controle de foco, anteriormente a este estudo, por diferentes equipes de microscopistas. Neste estudo foram triadas por qPCR e as positivas foram ensaiadas por *nested* PCR para determinação das espécies (Figura 26).



Pv = *P. vivax*; Pm = *P. malariae*

Figura 26 - Fluxograma mostrando o total de amostras analisado por método de coleta e técnicas utilizadas.
Elaboração da arte: MLRN Farinas

5.2. Comparação de positividade entre GE, qPCR e *nested* PCR em todos os municípios estudados

De acordo com o estudo, das 371 amostras de sangue total coletadas, 364 foram processadas por GE e sete amostras não foram realizadas por falta de material. Destas, 25 foram positivas na GE, sendo 24 *P. vivax* e 1 *P. malariae* (6,9% [IC: 4,66 – 9,98]), e 339 foram negativas. Na qPCR, foram 85 positivas (22,9% [IC: 18,92 – 27,46]) e 286 negativas. Os resultados obtidos entre as duas técnicas (GE e qPCR) apresentaram diferença estatística ($p < 0,0001$) e fraca concordância ($K = 0,049$). Dentre as positivas, 77 foram ensaiadas para *nested* PCR e oito não foram realizadas por falta de material. Dessas, 20 amostras foram positivas com o resultado de 16 *P. vivax* e 4 *P. malariae* (26,0% [IC: 17,42 – 36,81]) e 57 foram negativas. Além disso, 584 amostras foram coletadas em DBS e 573 foram processadas para GE e 11 não foram realizadas por falta de material, 15 foram positivas para *P. vivax* (2,6 % [IC: 1,56 – 4,31]) e 558 negativas. As 584 foram processadas por qPCR, sendo 18 positivas (3,1% [IC: 1,93 – 4,85]) e 566 negativas. As 18 amostras positivas foram processadas por *nested* PCR e todas resultaram negativas. Para as amostras colhidas em DBS não houve diferença estatística ($p = 0,7$) e apresentaram fraca concordância ($K = 0,036$) entre GE e qPCR (Tabela 3).

Tabela 3 - Número de amostras positivas e negativas para sangue total e papel filtro (DBS) comparando as técnicas utilizadas.

SANGUE					
	Positivo	Negativo	Positividade (%)	Kappa	p value
GE	25	339	6,9 (IC: 4,66 – 9,98)	K = 0,049*	p < 0,0001**
qPCR	85	286	22,9 (IC: 18,92 – 27,46)		
nPCR	20	57	26,0 (IC: 17,42 – 36,81)		
DBS					
	Positivo	Negativo	Positividade (%)	Kappa	p value
GE	15	558	2,6 (IC: 1,56 – 4,31)	K = 0,036*	p = 0,7***
qPCR	18	566	3,1 (IC: 1,93 – 4,85)		
nPCR	0	18	0		

*Fraca concordância.

**Apresenta diferença estatística.

***Não apresenta diferença estatística.

5.3. Comparação de positividade entre GE, qPCR e *nested* PCR em cada município estudado

O estudo abrangeu 16 municípios (figura 27), e entre as amostras ensaiadas, 134 (14,03%) foram positivas em qualquer um dos métodos realizados. O município de São Sebastião apresentou a maior positividade com 58 casos positivos (43,28%), em seguida São Paulo com 15 (11,19%) e Bertoga com 13 (9,7%). Os municípios de Iporanga e Cananéia apresentaram a menor positividade com somente um caso positivo (>1%).

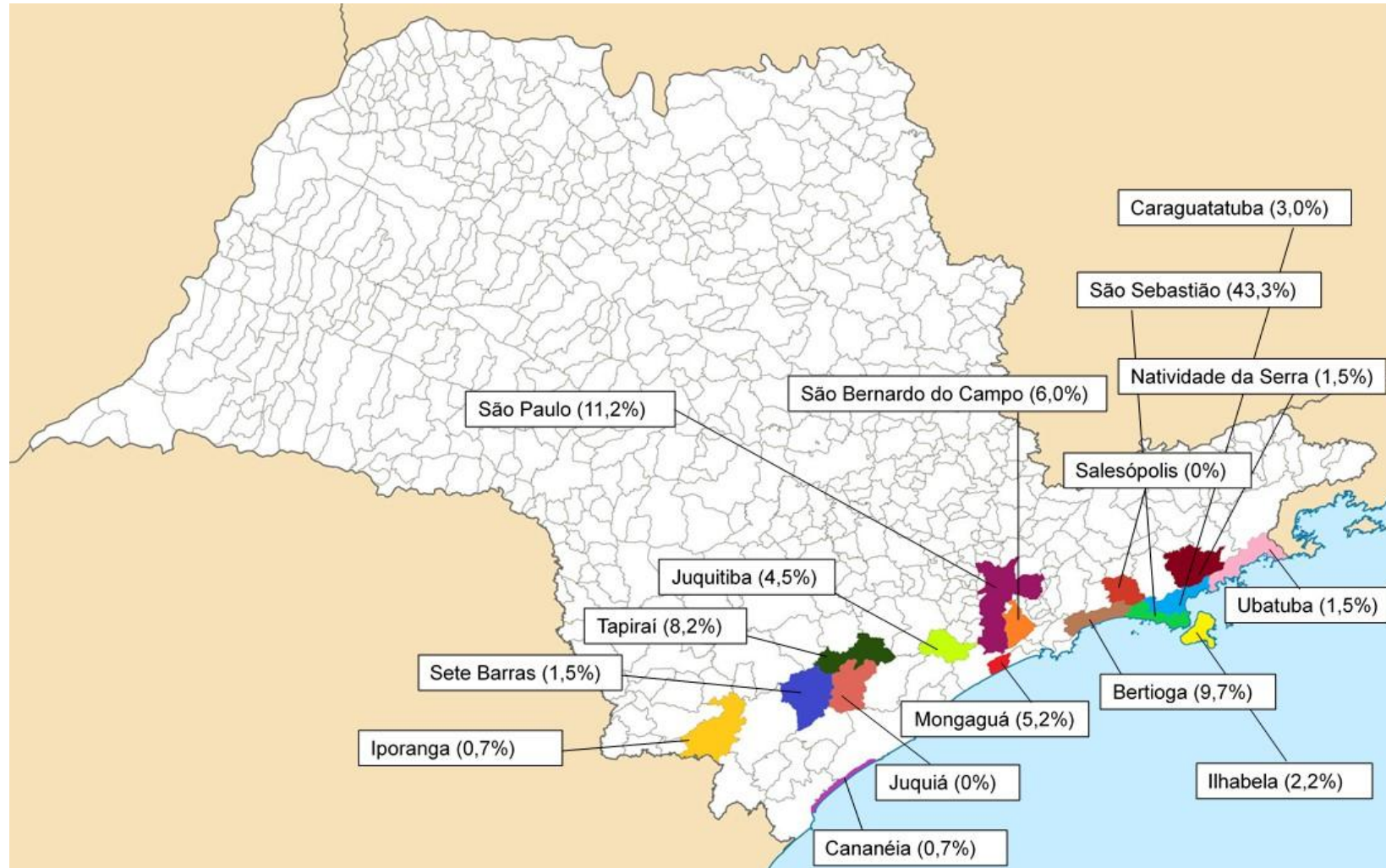


Figura 27 - Distribuição de amostras positivas (em %) em cada município estudado, com relação ao total de amostras positivas (n=134) por qualquer uma das técnicas (GE ou qPCR).

* Uma amostra não tem origem conhecida, representando 0,7%.

Elaboração da arte: MLRN Farinas

5.4. Positividade por município na GE e qPCR

O município de Caraguatatuba apresentou o maior número de amostras analisadas (227), com três amostras positivas pela GE (1,3%) e somente uma para o qPCR (0,4%), não apresentando diferença estatística entre as técnicas ($p=0,62$). Da mesma forma, a maioria dos municípios estudados não apresentou diferença estatística, conforme Tabela 4. O município de São Sebastião, o segundo maior número de amostras analisadas (218), obteve somente três amostras positivas pela GE (1,4%) e 56 positivas para qPCR (25,7%), apresentando diferença estatística entre os testes ($p<0,0001$). Além dele, os municípios de Mongaguá, com 86 amostras analisadas apresentando somente positividade para GE em sete amostras (8,1%) e Tapiraí, com 16 amostras analisadas apresentando somente positividade para a qPCR em 11 amostras (68,8%), também apresentaram diferença estatística entre as técnicas ($p=0,01$ e $p<0,0001$, respectivamente) de acordo com Tabela 4.

Tabela 4 - Número de amostras, percentual e positividade entre as técnicas por município.

Município	Nº de amostras analisadas	nº de GE positivas	% de GE positivas	nº de qPCR positivos	% de qPCR positivos	p value
Bertioga	91	8	8,8	6	6,6	0,78
Cananéia	1	NR	-	1	100	-
Caraguatatuba	227	3	1,3	1	0,4	0,62
Ilhabela	12	1	8,3	2	16,7	1,0
Iporanga	24	0	0	1	4,2	1,0
Juquitiba	80	3	3,8	4	5,0	1,0
Mongaguá	86	7	8,1	0	0	0,01*
Natividade da Serra	81	2	2,5	0	0	0,49
Salesópolis	19	0	0	0	0	-
São Bernardo do Campo	54	5	9,3	5	9,3	1,0
São Paulo (Parelheiros)	26	6	23,1	12	46,2	0,14
São Sebastião	218	3	1,4	56	25,7	<0,0001*
Sete Barras	11	0	0	2	18,2	0,47
Tapiraí	16	0	0	11	68,8	<0,0001*
Ubatuba	7	2	28,6	2	28,6	1,0

* Apresenta diferença estatística

Com relação aos resultados de *nested* PCR realizado nas amostras positivas na qPCR, a distribuição das espécies mostrou 80% de *P. vivax* (16/20) e 20% de *P. malariae* (4/20). Os resultados de cada município analisado são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de *nested* PCR realizados em amostras positivas na qPCR.

Municípios	qPCR positiva /realizada	<i>nested</i> PCR		
		<i>Pv</i>	<i>Pm</i>	Negativa
Bertioga	6/2	2	-	-
Caraguatatuba	1/1	-	-	1
Ilhabela	2/2	-	-	2
Juquitiba	4/4	1	-	3
São Bernardo do Campo	5/4	2	-	2
São Paulo	12/11	3	-	8
São Sebastião	56/56	2	3	51
Sete Barras	2/2	2	-	-
Tapiraí	11/11	4	1	6
Ubatuba	2/2	-	-	2
TOTAL	101*/95	16	4	75

* Duas amostras positivas na qPCR (Cananéia e origem desconhecida) não foram processadas por *nested* PCR por falta de material

5.5. Variação nos valores de *Cts* na PCR em tempo real em amostras de Sangue total colhidas em EDTA e DBS

Para as 371 amostras de sangue total colhidas em EDTA, 85 foram positivas na qPCR, sendo que 46 mostraram amplificação em duplicata e 39 em simplicata. As curvas apresentaram valores médios de *Cts* entre 18,85 e 39,13 para as duplicatas. Nas amostras que amplificaram em simplicata o intervalo de *Ct* variou de 35,67 e 39,77 como exemplificado na Figura 28.

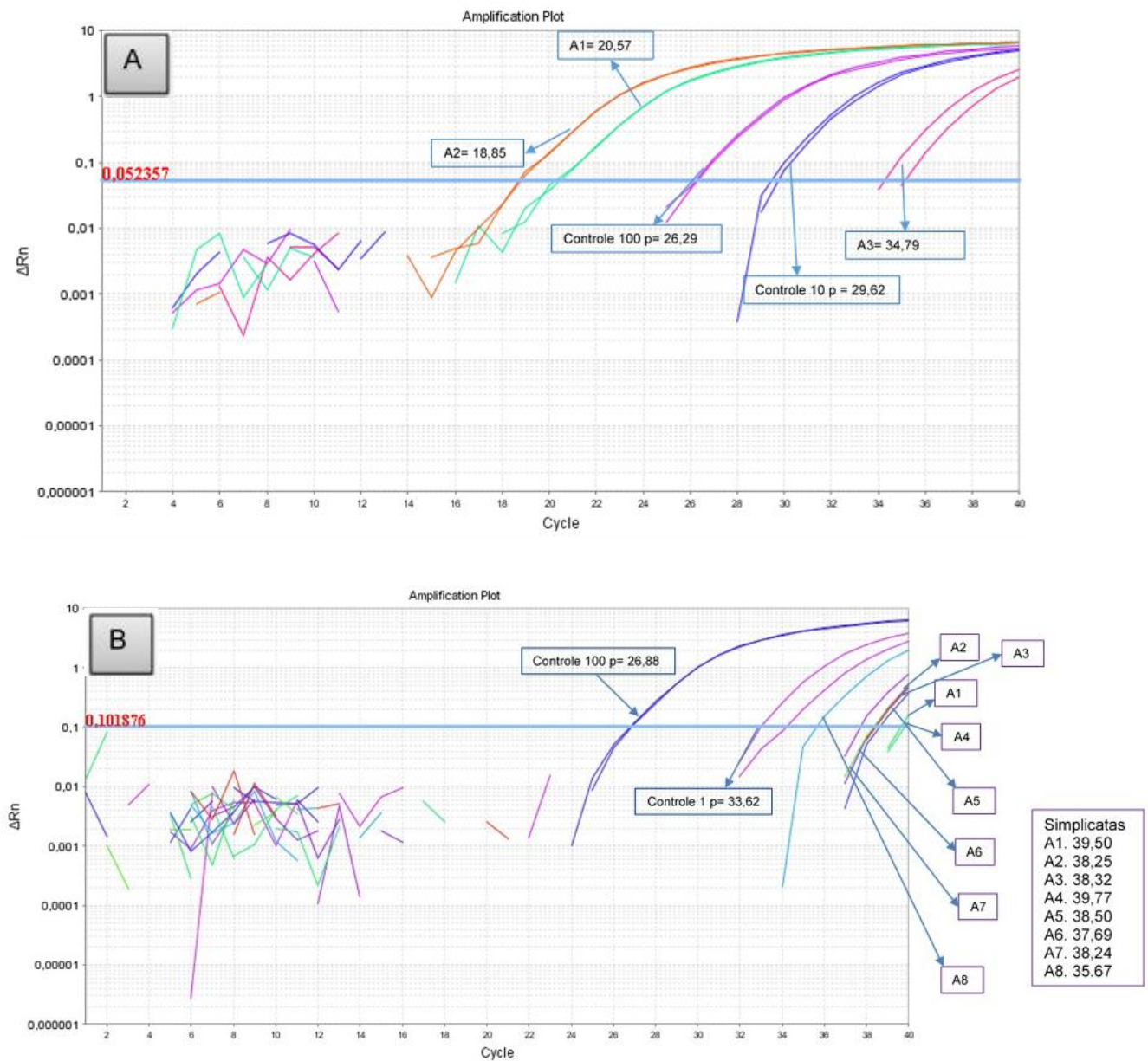


Figura 28 - Curvas dos valores médios de *Cts* nas amostras de sangue total colhidas em EDTA. A: amplificações em duplicata; B: amplificações em simplicata.

Elaboração da arte: MLRN Farinas

Para as 584 amostras de sangue total colhidas em DBS, 18 foram positivas na qPCR, sendo que 2 mostraram amplificação em duplicata e 16 em simplicata. As curvas apresentaram valores médios de *Ct*s entre 34,82 e 38,10 para as duas que amplificaram em duplicata. Nas amostras que amplificaram em simplicata o intervalo de *Ct* variou de 37,44 a 39,84 e apenas uma amostra obteve valor de *Ct* de 28,76 como exemplificado na Figura 29.

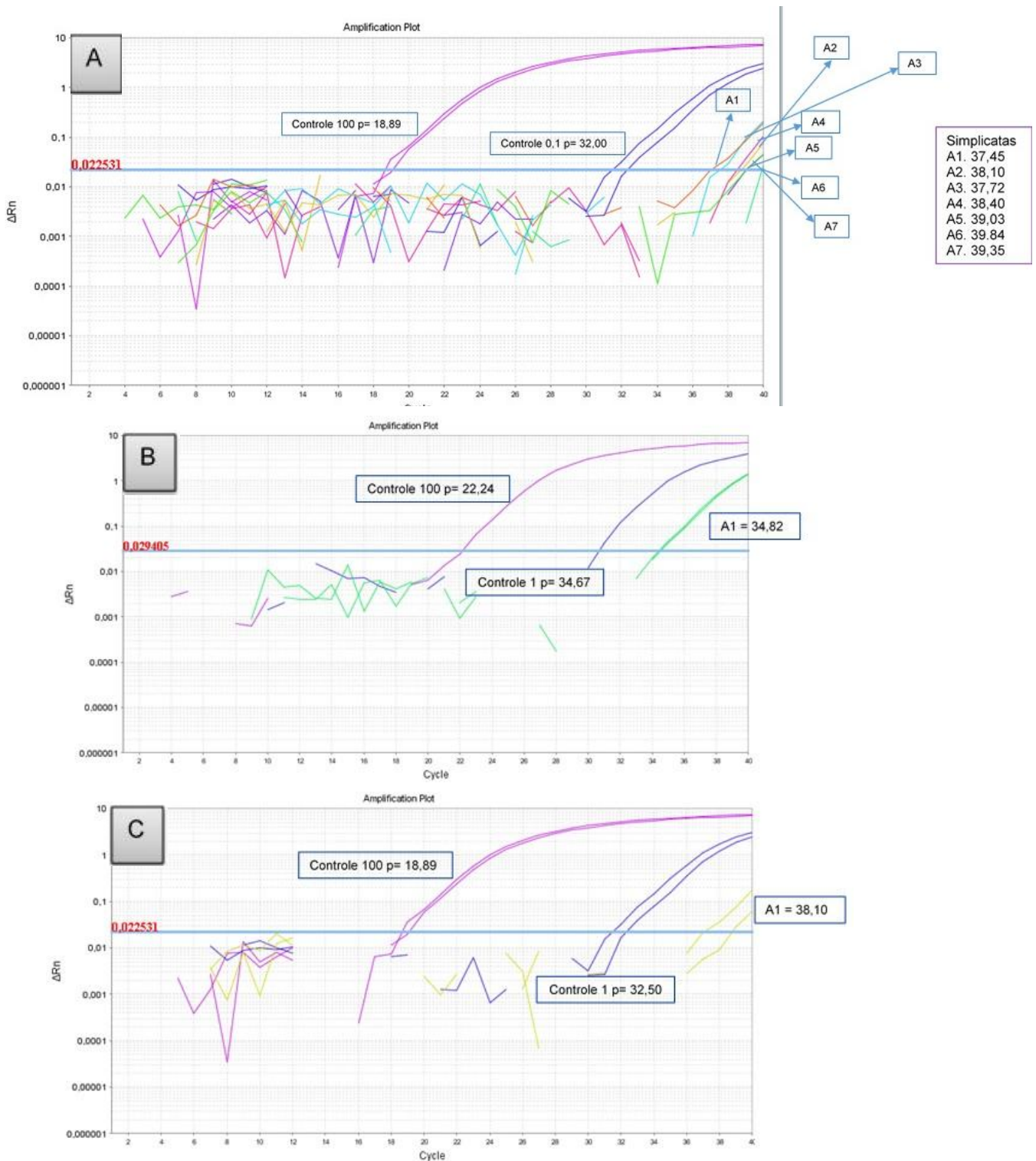


Figura 29 - Curvas dos valores de C_t s nas amostras de sangue total colhidas em DBS. A: ampliações em simplicata; B e C: média das ampliações em duplicata.

Elaboração da arte: MLRN Farinas

5.6 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com QiAgen®

O controle positivo de sangue total em EDTA usado como teste em diluições seriadas para testar as metodologias de extração e extraído com QIAamp DNA Blood Mini Kit, apresentou amplificação em duplicata com curvas que mostram valores médios de *Cts* entre 20,26 e 34,00 como apresentado na Figura 30.

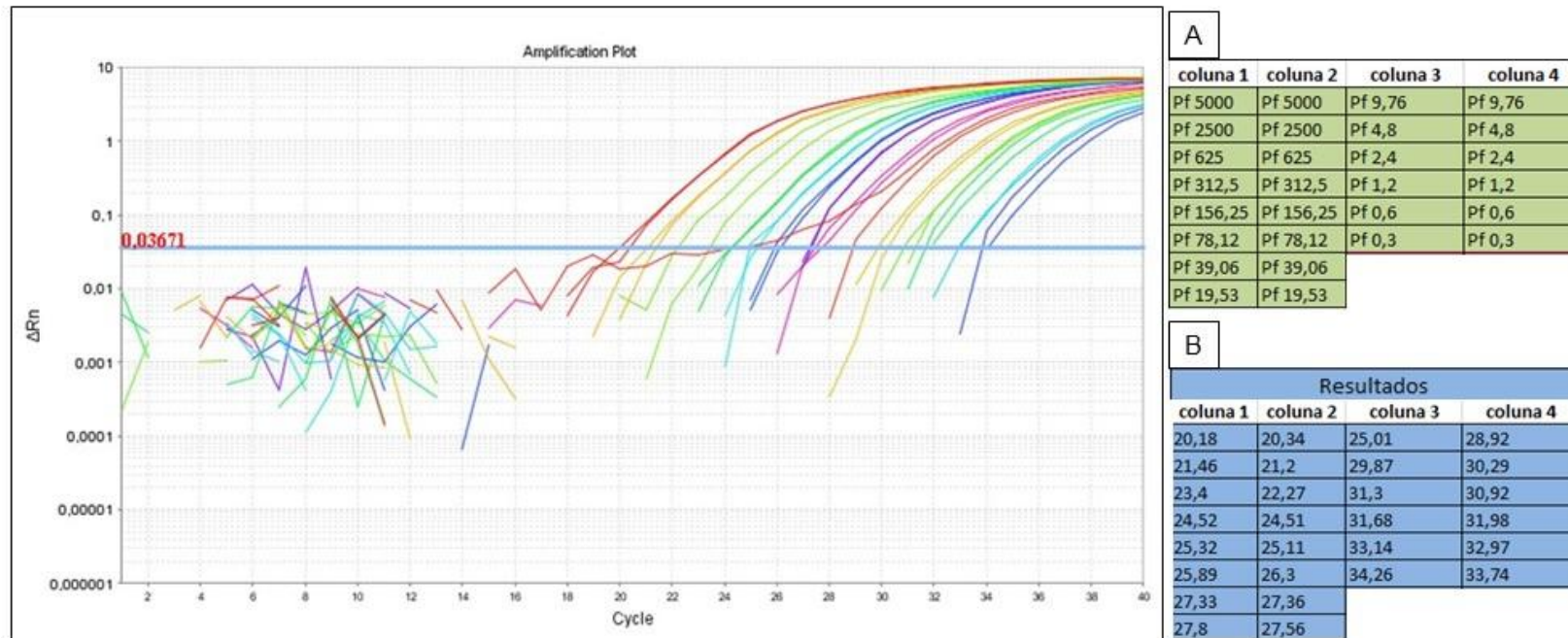


Figura 30 - Curvas de amplificação das diluições seriadas de controle positivo de sangue extraído por QIAamp DNA Blood Mini Kit.

Elaboração da arte: MLRN Farinas

5.7 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com InstaGene™

O controle positivo de sangue total plotado em DBS usado em diluições seriadas para testar o protocolo InstaGene™ (Bio-Rad™, Estados Unidos da América) apresentou uma amplificação em simplicata na diluição de 312 parasitos/ μ L e uma amplificação em duplicata na diluição de 156 parasitos/ μ L. A média do C_t da duplicata foi de 35,18 como apresentado na Figura 31. As amostras do estudo foram processadas somente com extração com Chelex®100, devido ao desempenho inferior do InstaGene™ nas amostras utilizadas como controles positivos.

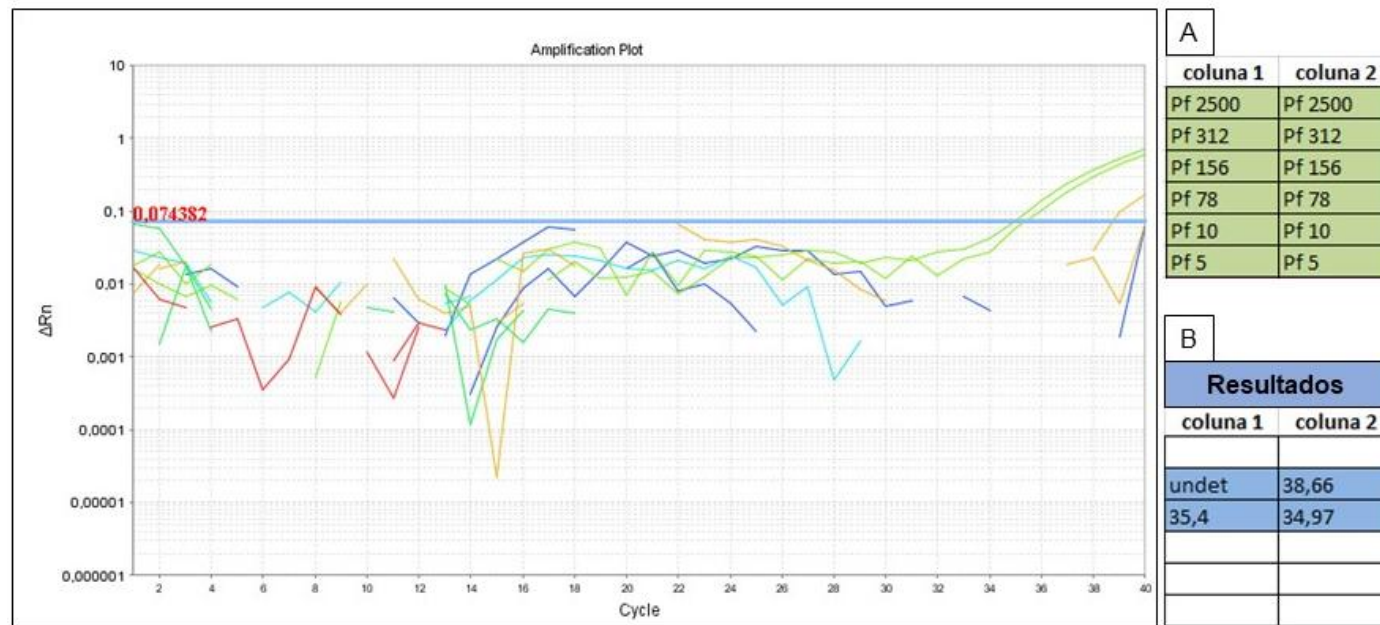


Figura 31 - Curvas de amplificação das diluições seriadas de controle positivo de sangue extraído por InstaGene™. Elaboração da arte: MLRN Farinas

5.8 qPCR de diluições seriadas de controles positivos de sangue extraídos com Chelex®100

O controle positivo de sangue total plotado em DBS usado em diluições seriadas para testar o protocolo Chelex®100 (Bio-Rad™, Estados Unidos da América) apresentou quatro ampliações em duplicata nas diluições de 2500, 312, 156 e 78 parasitos/ μ L e uma amplificação em simplicata na diluição de 5 parasitos/ μ L. Os valores médios de *C_t*s das duplicatas ficaram entre 33,15 e 36,46 como apresentado na Figura 32.

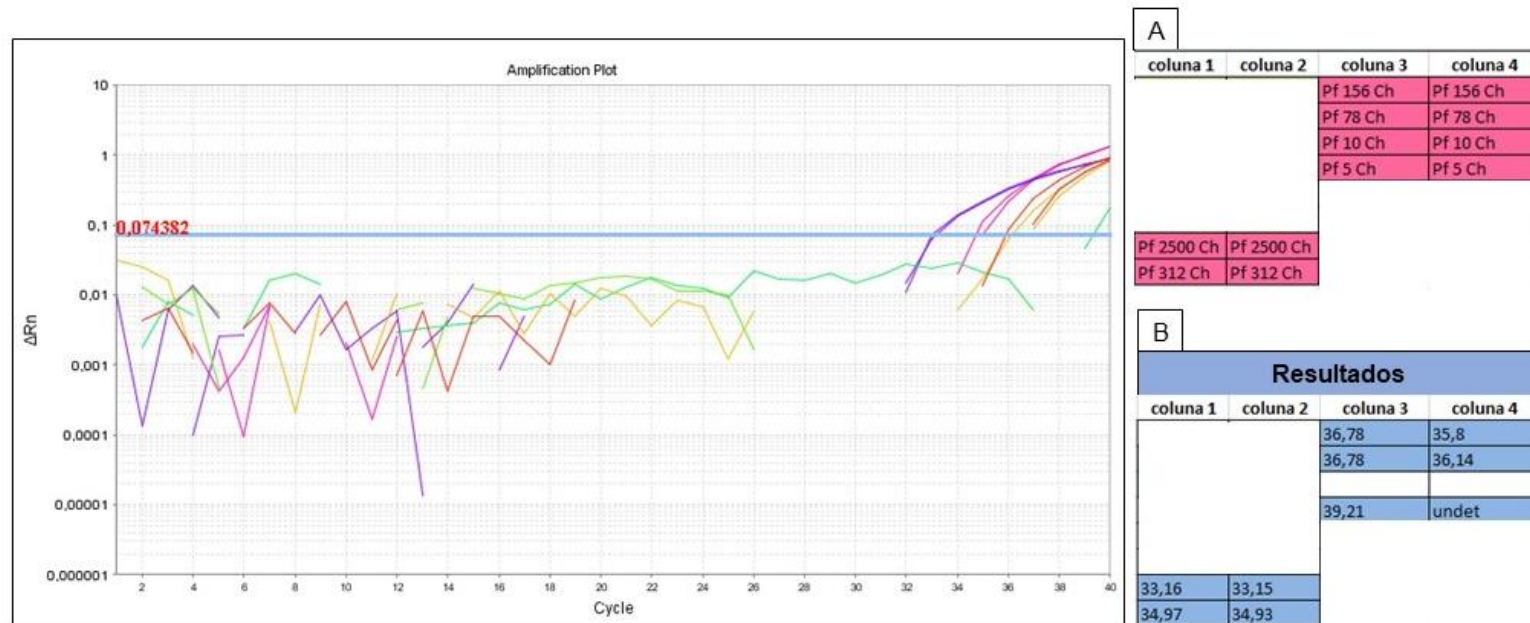


Figura 32 - Curvas de amplificação das diluições seriadas de controle positivo de sangue extraído por Chelex®100.
Elaboração da arte: MLRN Farinas

5.9. *Nested* PCR

Para a *nested* PCR, 101 amostras foram processadas para a determinação das espécies utilizando um protocolo baseado em genes *ssrRNA* e um protocolo no gene das enzimas DHFR-TS. Duas amostras positivas na qPCR (Cananéia e uma de origem desconhecida) não foram processadas por falta de material. A Figura 33 apresenta géis de agarose, com fragmentos de 144 pb para *P. vivax* (DHFR-TS) e 144 pb para *P. malariae* (*ssrRNA*). Foram amplificadas 16 amostras para *P. vivax* e 4 para *P. malariae*. Nenhuma amostra amplificou para *P. falciparum* por nenhum dos protocolos.

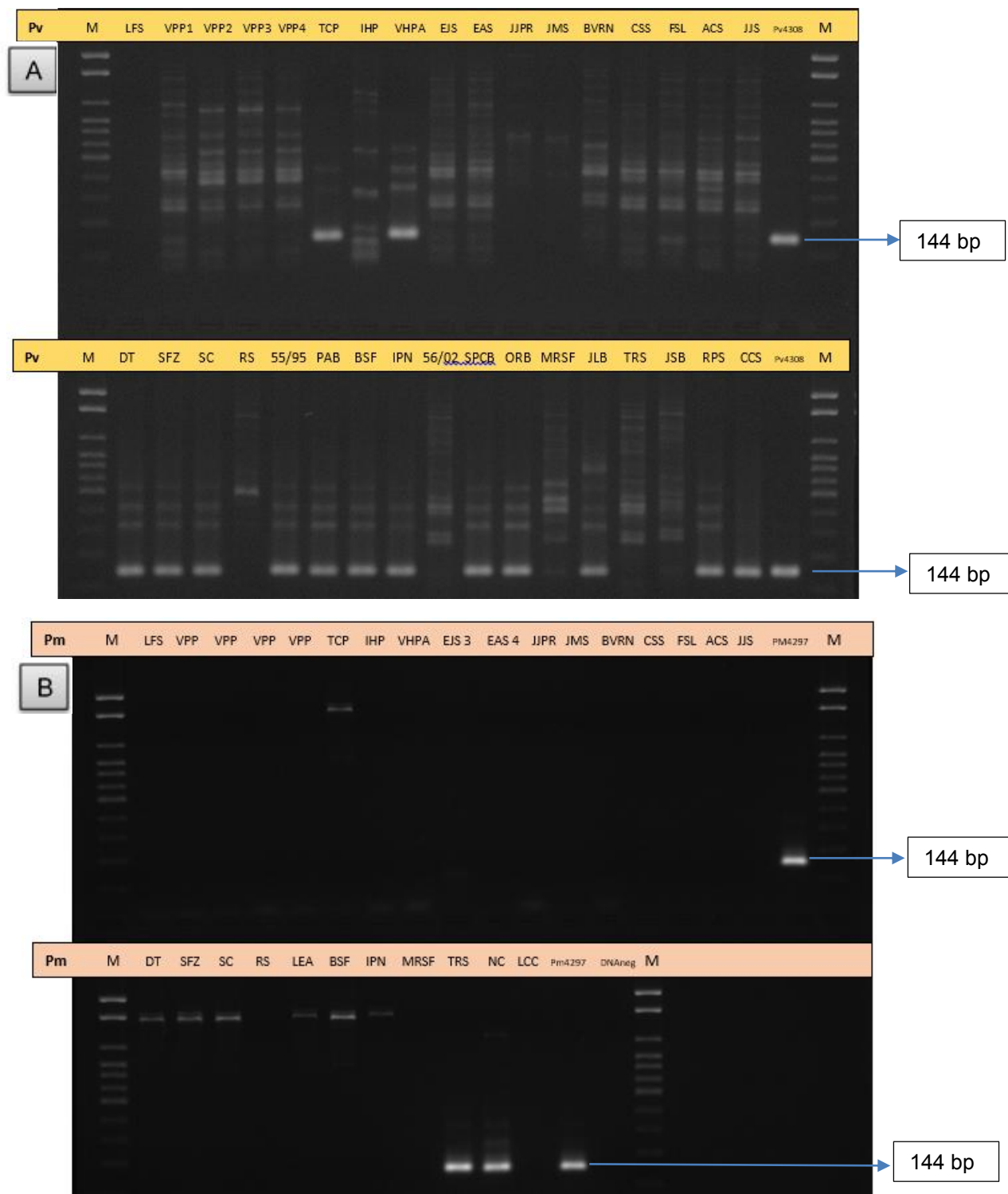


Figura 33 - Resultados de eletroforese pós amplificação. A: *P. vivax* (DHFR-TS = 144 bp); B: *P. malariae* (ssrRNA = 144 bp).

Elaboração da arte: MLRN Farinas

6. DISCUSSÃO

Este estudo revelou a ocorrência de infecções assintomáticas por *Plasmodium* em moradores de 14 dos 16 municípios investigados. A positividade da gota espessa foi de 4,3% (IC 95% 3,07 - 5,77) e da qPCR foi de 10,8% (IC 95% 8,89- 12,93), considerando-se os dois métodos de coleta. Embora infecções assintomáticas tenham sido descritas no Bioma de Mata Atlântica brasileiro, pela primeira vez foi realizado estudo envolvendo grande número de municípios em áreas onde casos autóctones foram notificados. No estado de São Paulo, Hristov e colaboradores (2014) relataram 1,6% de positividade pela gota espessa e 5,6% por PCR, em amostras de sangue de gestantes assintomáticas residentes no município de Juquitiba, SP. Dentre as sete amostras positivas por qPCR e *nested* PCR, *P. vivax* foi detectado em três gestantes e *P. malariae* em quatro. No estado do Rio de Janeiro, um estudo realizado em 324 residentes do município de Guapimirim revelou 2,8% de infecções assintomáticas por *nested* PCR, sendo que nenhuma gota espessa foi positiva (Miguel et al., 2019). No estado do Espírito Santo, amostras coletadas em 92 moradores em um raio de 2 km a partir de um caso autóctone detectado, apresentaram positividade de 3,4%, por PCR, com presença de *P. vivax* e *P. malariae*, sendo todos os indivíduos assintomáticos. A gota espessa resultou negativa nas 92 amostras de sangue (Alencar et al., 2018).

Embora 99% dos casos de malária no Brasil ocorram na Região Amazônica (Brasil, 2020), a transmissão de casos autóctones no Sul e Sudeste do Brasil em regiões inseridas no Bioma de Mata Atlântica é um desafio para os objetivos de eliminação da doença. As características da paisagem local, com abundância de bromélias, possibilitam que as espécies de anofelinos do subgênero *Kerteszia* encontrem condições favoráveis para oviposição (Deane, 1986). Além disso, a presença de primatas das famílias *Atelidae* e *Cebidae*, principalmente dos gêneros *Alouatta*, *Brachyteles*, *Cebus* e *Sapajus* (Alvarenga et al., 2015), dificulta a aplicação de medidas clássicas de controle, como as adotadas pelo PNCM. Neste sentido, o caráter silvestre da transmissão impossibilita o controle vetorial por meio de inseticidas, o que acarretaria imensos danos ao ecossistema.

Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propõem, além da redução das desigualdades globais e fim da pobreza, eliminar a malária até 2030. Em 2015, a OMS propôs a Estratégia Técnica Global para Malária, com objetivo de reduzir pelo menos 90% de casos e óbitos em nível mundial e evitar a reintrodução da malária em áreas sem transmissão. No Brasil, o Plano Nacional de Saúde 2020-2023 propôs que até 2023 houvesse uma redução de 50% dos casos, tendo como base o ano de 2018, que notificou 187.756 casos. Uma readequação do plano nacional de eliminação estabeleceu a meta de menos de 14 mil casos em 2030, isto é, redução de 93% em relação a 2018, e eliminação da malária até 2035. Estas metas são dependentes da sustentabilidade das ações, com adoção de estratégias para ampliar a detecção, tratamento e vigilância de casos, em parceria com as diferentes áreas do SUS e outros setores que atuam no controle da malária, como as Secretarias de Atenção Primária à Saúde, a Secretaria Especial de Saúde Indígena e o Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2020).

O conceito de eliminação da malária considera a interrupção da transmissão autóctone de dada espécie de *Plasmodium* em uma região definida. Já a certificação da eliminação exige a interrupção da transmissão de todas as espécies de *Plasmodium* por no mínimo três anos. A OMS considera que as experiências progressas com campanhas de erradicação e o investimento em pesquisa científica, podem promover o controle da transmissão em nível mundial e a eliminação em regiões com baixa ou moderada endemicidade. Um dos pilares da OMS para atingir essas metas é a abordagem estratificada da transmissão, com ações específicas para cada cenário (WHO, 2018). Neste sentido, a OMS recomenda a identificação de foco, que é a “área definida e circunscrita localizada em uma área que é ou foi malárica e onde fatores epidemiológicos e ecológicos necessários para a transmissão da malária ocorram”. A existência de um foco pressupõe a integração entre populações de *Plasmodium*, hospedeiros e vetores que mantêm o caráter focal da transmissão. A Organização Panamericana de Saúde define os seguintes cenários: Cenário 1. Não receptivo; Cenário 2. Receptivo, sem casos autóctones, não vulnerável (inclui focos eliminados, sem casos importados ou nenhuma migração de países endêmicos); Cenário 3. Receptivo, sem casos autóctones, vulnerável (inclui

focos eliminados, com casos importados ou com migração de países endêmicos); Cenário 4. Receptivo, com casos autóctones (inclui focos ativos e residuais). Esta classificação deve nortear as estratégias de prevenção, de controle e de eliminação específicas para cada contexto epidemiológico (Brasil, 2020). Neste estudo foram analisadas amostras de sangue de moradores de áreas de foco classificados como Cenário 4, trazendo importantes dados sobre a presença de infecções assintomáticas que exigem ações diferenciadas para permitir que esses portadores sejam identificados e inseridos nas estratégias de controle e eliminação, quais seja, diagnóstico oportuno e tratamento específico.

A proposta de descentralização do diagnóstico e tratamento da malária no estado de São Paulo foi consolidada a partir de 2002, com iniciativas que garantissem o atendimento integral dos casos importados e autóctones notificados. Assim, 14 Unidades de Referência em Malária (URMs) foram criadas e inseridas em um contexto que permite fácil acesso a estrutura física e recursos humanos adequados ao atendimento dos casos suspeitos de malária, como diagnóstico, tratamento e vigilância. Além disso, pacientes internados em outras unidades podem ser atendidos mediante o envio de material biológico, que é encaminhado para a URM mais próxima para realização do exame, com dispensação de antimaláricos para o tratamento, que está disponível somente nas URMs. Quando um caso suspeito chega a uma URM, esta notifica o Núcleo de Vigilância Epidemiológica e encaminha o paciente para atendimento médico. A lâmina de GE é encaminhada para um laboratório de referência para investigação e resultado. Sendo positivo é indicado o tratamento e o controle de cura, e caso seja negativo o caso é encerrado. Além desse processo, o Núcleo de Vigilância Epidemiológica comunica as vigilâncias regionais e municipais para a investigação do caso. Sendo positivo, ocorre a avaliação para classificação do caso, que pode ser importado, autóctone ou induzido. Sendo um caso autóctone ocorre, então, a Busca Ativa, contexto em que se inserem as amostras deste estudo (SESSP, 2021).

No estado de São Paulo a transmissão autóctone apresenta um padrão constante, porém com baixo número de casos notificados, em áreas de Mata Atlântica ainda preservadas. Considerando o aspecto clínico, observa-se quadros com sintomatologia branda e casos oligossintomáticos, estes

geralmente detectados em Busca Ativa, deflagradas a partir de casos sintomáticos diagnosticados por Busca Passiva (SESSP, 2008). Neste estudo, dentre os 955 moradores avaliados, foram detectados 134 positivos para *Plasmodium*, em qualquer um dos métodos utilizados, nenhum apresentando sintomas característicos de malária no momento da abordagem. A detecção e notificação esporádica de casos sintomáticos não deve afrouxar as medidas de vigilância, pois os assintomáticos sem diagnóstico e sem tratamento mantêm o *Plasmodium* em circulação na região, produzindo novos focos (Barroso, 2003).

A positividade geral deste estudo, mostra que o desempenho da GE (4,3%) foi inferior à qPCR (10,8%). Diversos estudos mostram que as técnicas moleculares são mais acuradas e sensíveis quando comparadas à gota espessa (Wang et al., 2014; Naeem et al., 2018).

Mesmo assim, em alguns municípios os resultados apresentados pela GE tiveram uma positividade maior e esse achado pode ser atribuído a alguns fatores importantes. Embora a extração com Chelex[®]100 seja amplamente utilizada (Singh et al., 2018; Panda et. al., 2019), neste estudo as amostras foram coletadas em campo por diferentes equipes, com diferentes padrões de coleta, como apresentado na Figura 22. Essa falta de padronização pode ter interferido no desempenho da qPCR a partir de DNA extraído das amostras colhidas em DBS.

Um estudo comparando métodos de extração de DNA (Chelex[®]100-saponina, metanol e TRIS-EDTA) mostrou que a resina Chelex[®]100 teve melhor performance em amostras de 21 indivíduos positivos (2 *P. falciparum*, 18 *P. vivax* e 1 *P. falciparum* + *P. vivax*), sendo 18 assintomáticos, com apenas quatro GEs positivas (parasitemia média de 367 parasitos/ μ L para *P. falciparum* e 225 parasitos/ μ L para *P. vivax*). Mesmo apresentando melhores resultados, a sensibilidade com a extração com Chelex[®]100 foi de 66,7% para o *P. falciparum* e 31,6% para o *P. vivax* (Miguel et al. 2013). Schwartz e colaboradores (2015) testaram os efeitos de armazenamento, extração e amplificação em amostras DBS contendo 25 μ L em diluições seriadas de um controle positivo, com variação de 0,1 a 100.000 parasitos/ μ L determinada por GE, concluindo que a sensibilidade foi baixa para infecções com baixa densidade parasitária. O ensaio não refletiu todas as variações que podem acontecer em amostras de campo e,

mesmo sendo processadas em ambiente controlado o resultado foi inferior ao esperado. Esses achados corroboram com os realizados neste estudo, com diluições seriadas de parasitemia exata que foram processadas por qPCR para avaliar os protocolos de extração. Quando ensaiadas as diluições de 2.500 parasitos/ μL a 5 parasitos/ μL com extração por QIAamp DNA Blood Mini Kit a partir de 200 μL e Chelex[®]100 com 50 μL de sangue plotado em DBS, as médias de *Cts* variaram de 21,33 a 30,08 e 33,10 a 39,21, respectivamente. Dentre as diluições por Chelex[®]100 uma não amplificou e uma amplificou somente em *simplicata*. Considerando que esses resultados foram processados em ambiente laboratorial controlado, fica evidenciado que o volume de sangue e a padronização da coleta, somados à eficiência de cada protocolo de extração, além das baixas parasitemias, impactaram diretamente nos resultados da qPCR. A hipótese de que a extração com Chelex[®]100 pudesse produzir DNA contendo inibidores da qPCR está excluída, uma vez que todas as extrações incluíram controles positivos que amplificaram em todos os ensaios.

Por outro lado, não se pode descartar que os resultados das GEs de Mongaguá e Natividade da Serra sejam falso-positivos, uma vez que é possível considerar alguns fatores como: 1. Nem sempre os exames de GE referentes a Busca Ativa são realizados por profissionais capazes de realizar esta técnica com padrões de sensibilidade e especificidade necessários em função das características dos casos autóctones; 2. As lâminas dessas coletas de Busca Ativa apresentam baixa parasitemia e configuram um desafio para a sua leitura, pois as infecções assintomáticas características de Mata Atlântica, com raros parasitos e morfologia atípica, distinta do diagnóstico clássico de malária, demandam longo tempo de leitura, podendo confundir e esgotar o profissional. 3. Mesmo que algumas dessas lâminas tenham sido examinadas em centros de referência, como no caso de Natividade da Serra, a morfologia pouco clássica dessas amostras de Mata Atlântica pode levar profissionais treinados a diagnóstico falso-positivo (Di Santi et al., 2004).

Ainda, deve-se levar em consideração o tempo dispendido para a leitura de cada lâmina. Assim, é importante considerar que para a leitura das 955 gotas espessas envolvidas nesse estudo, foram necessárias aproximadamente 477 horas. Por outro lado, para a execução dos ensaios de qPCR, foram necessárias

apenas 116 horas, considerando os protocolos de extração e preparo das placas de qPCR.

A *performance* da qPCR evidencia alguns achados interessantes. As amostras de sangue total colhidas em EDTA e extraídas por um protocolo que leva a um maior rendimento de DNA tiveram melhor desempenho que as amostras extraídas por Chelex®100. Por se tratar de amostras de baixa parasitemia, há o risco de nem sempre se conseguir obter o parasito no volume de sangue utilizado. Assim, das amostras colhidas em EDTA que amplificaram em *simplicata*, 5/39 apresentaram resultado positivo na *nested* PCR. Por outro lado, nenhuma das 16 amostras extraídas por Chelex®100 que amplificaram em *simplicata* tiveram resultado positivo na *nested* PCR. Isso mostra que, possivelmente, a quantidade de DNA extraído das amostras colhidas em DBS pode ser inferior ao LoD da técnica que é de 2 a 10 parasitos/ μ L para a *nested* PCR (Snounou et al., 1993; Amaral et al., 2019). Um estudo realizado na Malásia comparando a microscopia com a *nested* PCR espécie-específica, avaliou amostras de sangue plotadas em DBS em 129 indivíduos residentes de área endêmica. Neste protocolo, que incluiu 2 ciclos de amplificação para gênero seguido de um ciclo para as espécies, o LoD foi de 6 parasitos/ μ L (Singh et al., 1999). A qPCR possui maior sensibilidade com LoD de 1 parasito/ μ L (Lima et al., 2011), o que justifica os achados em *simplicata* nas amostras ensaiadas.

Por se tratar de amostras com baixíssima parasitemia, visto que foram colhidas de população assintomática, não foi utilizado controle interno. Também não foi estabelecido um *cut-off* para determinar um valor de *Ct* que caracterizasse um teste positivo. Quando padronizada, a qPCR utilizada para triagem de positivos calculou um valor de *cut-off* para um LoD de 1 parasito/ μ L (Lima et al., 2011). Neste estudo foi aceito que qualquer amplificação seria considerada como positiva, visto que amostras com parasitemias abaixo de 1 parasito/ μ L poderiam ser detectadas, com valores de *Ct* acima do *cut-off*, corroborando com o caráter de transmissão e circulação do *Plasmodium* na região. A adição de controle interno, conforme demonstrado anteriormente, poderia elevar os valores de *Ct* de modo a resultar em uma reação falso-negativa. Murphy e colaboradores (2012) mostraram que o LoD aumenta conforme o volume da amostra diminui e é possível que em 200 μ L de sangue, o

limite mínimo detectável seja 5 parasitos/mL ou 1 parasito/200 μ L. Já em uma amostra de 50 μ L, o limite mais baixo de detecção é 20 parasitos/mL (ou 1 parasito/50 μ L). Assim, o limite real de detecção pode ser muito afetado pelo volume da amostra de sangue, o volume de DNA extraído e o volume adicionado ao ensaio de PCR. Amostras com baixa parasitemia podem ser um desafio para a PCR, e diante desses fatores, muitos ensaios não incluem um controle interno.

As atividades de controle de foco autóctone preconizam a utilização de gota espessa para detecção de portadores de *Plasmodium*. Porém, essa metodologia sabidamente não tem sensibilidade para detectar baixas parasitemias. As amostras desse estudo retrospectivo foram processadas após as medidas de contenção dos focos terem sido realizadas de acordo com o programa de controle. Os resultados aqui apresentados são robustos para que possamos propor a metodologia molecular para as atividades de Busca Ativa em focos de malária, invariavelmente com baixas parasitemias. Fatores como acurácia na detecção de portadores invisíveis ao programa de controle e tempo necessário para resolução dos focos, apontam para a adequação de métodos moleculares neste cenário epidemiológico. Para otimizar os procedimentos, a padronização dos protocolos de coleta deve ser contemplada, mediante coleta de maior volume de sangue que aumente a possibilidade de detecção parasitária, garantindo um diagnóstico ainda mais acurado.

Este estudo contribuiu para que as ações de controle de foco em áreas de baixa transmissão sejam reavaliadas, de modo a tornar as ações de controle e vigilância mais ágeis, com maior poder de detecção de reservatórios de *Plasmodium*, não detectados pelos protocolos utilizados atualmente. Considerando as metas estabelecidas pelos organismos internacionais e nacionais para a eliminação da malária, este estudo contribuiu para o enfrentamento de um dos maiores desafios dos programas de controle, que é a detecção de parasitemias submicroscópicas que mantem a transmissão nesse cenário epidemiológico. Como contribuição aos programas de controle e vigilância da malária, os resultados apontam um algoritmo que consiste na triagem de positivos por protocolo sensível, seguida pela identificação das espécies parasitárias, com conseqüente diminuição do tempo para resolução dos focos autóctones.

7. CONCLUSÕES

1. Foram detectadas infecções assintomáticas por *Plasmodium* em residentes de áreas de foco de malária, em 14 de 16 municípios avaliados no estado de São Paulo.
2. Foi realizada triagem por meio de qPCR gênero-específico para amplificação de *ssrRNA* de *Plasmodium*, em amostras de sangue de residentes em áreas de foco de malária de 16 municípios do estado de São Paulo, com positividade geral de 10,8%.
3. Foram realizados ensaios de *nested* PCR espécie-específico para amplificação de *ssrRNA* e DHFR-TS, nas amostras positivas por qPCR para o gênero *Plasmodium*, com positividade de 26%. Dentre as 20 amostras positivas por *nested* PCR, 16 foram identificadas como *P. vivax* e quatro como *P. malariae*.
4. Foi determinada a prevalência de infecções assintomáticas em cada um dos municípios analisados, revelando a conveniência de utilização de protocolos moleculares para a vigilância epidemiológica da malária.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abath FGC, Melo FL, Werkharuser RP, Montenegro R, Schindler HC. *Single-tube nested PCR using immobilized internal primers*. Biotechniques. 2002;33:1210-14.

Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Ceron N, Adhin MR, Chandrabose J, Krishnalall K, Huber CS, Goldman IF, Macedo de Oliveira A, Barnwell JW, Udhayakumar V. *Variation in Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (Pfhrp2) and Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 3 (Pfhrp3) Gene Deletions in Guyana and Suriname*. PLoS One. 2015;10:e0126805.

Akter J, Khoury DS, Aogo R, Lansink LIM, SheelaNair A, Thomas BS, Laohamonthonkul P, Pernold CPS, Dixon MWA, Soon MSF, Fogg LG, Engel JA, Elliott T, Sebina I, James KR, Cromer D, Davenport MP, Haque A. *Plasmodium-specific antibodies block in vivo parasite growth without clearing infected red blood cells*. PLoS Pathog. 2019;15:e1007599.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da célula*. 5° ed. Porto Alegre: Artmed; 2010; 544–5.

Alencar FEC, Malafronte RS, Cerutti Jr C, Fernandes LN, Buery JC, Fux B, Rezende HR, Miranda AE. *Reassessment of asymptomatic carriers of Plasmodium spp. in an endemic area with a very low incidence of malaria in extra - Amazonian Brazil*. Malar J. 2017;16:452.

Alencar FEC, Malafronte RDS, Cerutti Junior C, Natal Fernandes L, Buery JC, Fux B, Rezende HR, Duarte AMRC, Medeiros-Sousa AR, Miranda AE. *Assessment of asymptomatic Plasmodium spp. infection by detection of parasite DNA in residents of an extra-Amazonian region of Brazil*. Malar J. 2018; 14;17(1):113.

Almeida PSR, Saddi VA. *Monitoramento de doença residual mínima em leucemia mielóide crônica por PCR em tempo real*. Rev. Bras Hematol Hemoter. 2007;29:382-6.

Alvarenga DA, de Pina-Costa A, de Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suárez-Mutis MC, Lourenço-de-Oliveira R, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CF. *Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by Plasmodium simium*. Malar J. 2015;14:81.

Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C Jr, Silva S, Nunes AJD, de Souza JC Jr, Hirano ZMB, Moreira SB, Pissinatti A, de Abreu FVS, Lisboa Areas AL, Lourenço-de-Oliveira R, Zalis MG, Ferreira-da-Cruz MF, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CFA. *An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest*. Sci Rep. 2018;8:86.

Amaral LC, Robortella DR, Guimarães LFF, Limongi JE, Fontes CJF, Pereira DB, de Brito CFA, Kano FS, de Sousa TN, Carvalho LH. *Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections*. Malar J. 2019;18(1):154.

Amaral LC. *Desenvolvimento de um protocolo de PCR em tempo real para diagnóstico de malária subpatente e infecções mistas por Plasmodium vivax e Plasmodium falciparum*. [dissertação]. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas René Rachou; 2014.

Andrade JCR, Anjos CFD, Wanderley DMV, Alves MJCP, Campos PC. *Foco de malária no estado de São Paulo (Brasil)*. Rev Saúde Públ. 1986;20:323-6.

Aschar M, Levi JE, Farinas MLRN, Montebello SC, Mendrone-Junior A, Di Santi SM. *The hidden Plasmodium malariae in blood donors: a risk coming from areas of low transmission of malaria*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2020;18;62:e100

Bharti PK, Chandel HS, Ahmad A, Krishna S, Udhayakumar V, Singh N. *Prevalence of pfhrp2 and/or pfhrp3 gene deletion in Plasmodium falciparum population in eight highly endemic states in India*. PLoS One. 2016;11:e0157949.

Barroso WJ. *A malaria de Mata Atlântica no Brasil*. Infarma. 2003; 15:1/3:76-77.

Batista-dos-Santos SA, Freitas DRC, Raiol M, Cabral GF; Feio AC, Póvoa MM, Cunha MG; Ribeiro-dos-Santos A. *Strategy to improve malaria surveillance system preventing transfusion-transmitted malaria in blood banks using molecular diagnostic*. Malar J. 2018;17:344.

Bejon P, Williams TN, Liljander A, Noor AM, Wambua J, Ogada E, Olotu A, Osier FH, Hay SI, Färnert A, Marsh K. *Stable and unstable malaria hotspots in longitudinal cohort studies in Kenya*. PLoS Med. 2010;7:e1000304.

Boyle MJ, Reiling L, Feng G, Langer C, Osier FH, Aspeling-Jones H, Cheng YS, Stubbs J, Tetteh KK, Conway DJ, McCarthy JS, Muller I, Marsh K, Anders RF, Beeson JG. *Human antibodies fix complement to inhibit Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria*. Immunity. 2015;42:580-90.

Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. *Portaria de Consolidação Nº 5, de 28 de setembro de 2017*. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em 13/07/2021.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico*. Número Especial, nov. 2020.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância*

em Saúde – 2. Ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 116 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária*. 2003. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/programa_nac_prev_malaria.pdf. Acesso em 13/07/2021.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2021. *Boletim região Extra-Amazonica*. Disponível em: https://public.tableau.com/app/profile/mal.ria.brasil/viz/RotinaBoletimExtra26_05_2021/SrieHist. Acesso em 15/06/2021

Brasil P, Zalis MG, Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, Areas ALL, Pelajo-Machado M, Alvarenga DAM, Santelli ACFS, Albuquerque HG, Cravo P, Abreu FVS, Peterka CL, Zanini GM, Mutis MCS, Pissinatti A, Lourenço-de-Oliveira R, Brito CFA, Ferreira-da-Cruz MF, Culleton R, Daniel-Ribeiro CT. *Outbreak of human malaria caused by Plasmodium simium in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation*. Lancet Glob Health. 2017;5: e1038–46.

Chan JA, Howell KB, Reiling L, Ataide R, Mackintosh CL, Fowkes FJ, Petter M, Chesson JM, Langer C, Warimwe GM, Duffy MF, Rogerson SJ, Bull PC, Cowman AF, Marsh K, Beeson JG. *Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity*. J Clin Invest. 2012;122:3227-38.

Chavatte JM, Tan SBH, Snounou G, Lin RTPV. *Molecular characterization of misidentified Plasmodium ovale imported cases in Singapore*. Malar J. 2015;14:454.

Chiodini PL. *Malaria diagnostics: now and the future*. Parasitology. 2014;141:1873–9.

Cockburn IA, Seder RA. *Malaria prevention: from immunological concepts to effective vaccines and protective antibodies*. Nat Immunol. 2018;19:1199-1211.

Cohen S, McGregor I, Carrington S. *Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria*. Nature. 1961;192:733–7.

Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale: parasite and disease*. Clin Microbiol Rev. 2005;18:570-81.

Coura JR, Suárez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. *A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection - a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:229-37.

Couto RD, Latorre MRDO, Di Santi SM, Natal D. *Malária autóctone notificada no Estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos de 1980 a 2007*. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43:52-8.

Cox FEG. *History of the discovery of the malaria parasites and their vectors*. (review). Parasites & Vectors. 2010;3:1-9.

Deane LM, Deane MP, Ferreira Neto J. *Studies on transmission of simian malaria and on the natural infection of man with Plasmodium simium in Brazil*. Bull World Health Organ. 1966;35:805–8.

Deane, L. M. *Malaria vectors in Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1986; 81(Suppl II), 5–14.

Di Santi SM, Boulos M. Protozoários – Malária. In: EB Cimerman, S Cimerman. *Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais*. São Paulo: Atheneu; 1999. cap. 16, p. 139 – 155.

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 Sao Paulo. 2004;46:183-7.

Esquematização da *nested* PCR para amplificação de DNA genômico. Disponível em www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_variation_system.php.

Flores-Garcia Y, Nasir G, Hopp CS, Munoz C, Balaban AE, Zavala F, Sinnis P. *Antibody-mediated protection against Plasmodium sporozoites begins at the dermal inoculation site.* mBio. 2018;9:e02194-18.

França TCC, Santos MG, Figueroa-Villar JD. *Malária: aspectos históricos e quimioterapia.* Quím Nova. 2008;31:1271-8.

Franks S, Koram KA, Wagner GE, Tetteh K, McGuinness D, Wheeler JG, Nkrumah F, Ranford-Cartwright L, Riley E M. *Frequent and persistent, asymptomatic Plasmodium falciparum infections in African infants, characterized by multilocus genotyping.* The Journal of Infectious Diseases. 2001;183:796–804.

Fontecha G, Mejía RE, Banegas E, Ade MP, Mendoza L, Ortiz B, Sabillón I, Alvarado G, Matamoros G, Pinto A. *Deletions of pfhrp2 and pfhrp3 genes of Plasmodium falciparum from Honduras, Guatemala and Nicaragua.* Malar J. 2018;17:320.

Gama BE, Silva-Pires FES, Lopes MNR, Cardoso MAB, Britto C, Torres KL, Lima LM, Souza JM, Daniel-Ribeiro CT, Ferreira-da-Cruz MF. *Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia.* Exp. Parasitol. 2007; 116: 427-32.

Gamboa D, Ho MF, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, Incardona S, Perkins M, Bell D, McCarthy J, Cheng Q. *A large proportion of P. falciparum isolates in the Amazon region of Peru lack pfhrp2 and pfhrp3: implications for malaria rapid diagnostic tests.* PLoS One. 2010;5:e8091.

Garrido-Cardenas JA, González-Cerón L, Manzano-Agugliaro F, Mesa-Valle C. *Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria.* Parasitol Res. 2019;118:1-27.

Garside P, Ingulli E, Merica RR, Johnson JG, Noelle RJ, Jenkins MK. *Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node.* Science. 1998;281:96-9.

Golassa L, Baliraine FN, Enweji N, Erko B, Swedberg G, Aseffa A. *Microscopic and molecular evidence of the presence of asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax infections in an area with low, seasonal and unstable malaria transmission in Ethiopia.* BMC Infect Dis. 2015;15:310.

Grande R, Antinori S, Meroni L, Menegon M, Severini C. *A case of Plasmodium malariae recurrence: recrudescence or reinfection?* Malar J. 2019;18:169.

Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. *Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections.* Nat Med. 1999;5(3):340-3.

Haas DJ, Torres ACD. *Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais.* Revista Científica de Medicina Veterinária. 2016, n. 26, Periódico Semestral.

Hristov AD, Sanchez MC, Ferreira JJ, Lima GF, Inoue J, Costa-Nascimento Mde J, Sanchez AR, Ramos-Sanchez EM, Di Santi SM. *Malaria in pregnant women living in areas of low transmission on the southeast Brazilian Coast: molecular diagnosis and humoral immunity profile.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109:1014-20.

Kana IH, Singh SK, Garcia-Senosaiain A, Dodoo D, Singh S, Adu B, Theisen M. *Breadth of functional antibodies is associated with Plasmodium falciparum merozoite phagocytosis and protection against febrile malaria.* J Infect Dis. 2019;220:275-84.

Kantele A, Jokiranta TS. *Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite Plasmodium knowlesi (review).* Clin Infect Dis. 2011;52:1356-62.

Laporta GZ, Linton YM, Wilkerson RC, Bergo ES, Nagaki SS, Sant'ana DC, Sallum MA. *Malaria vectors in South America: current and future scenarios.* Parasites & Vectors. 2015;8:426.

Lima GFMC. *Análise comparativa da PCR em tempo real, nested PCR e teste imunocromatográfico em amostras de sangue processadas em pool, como plataforma de diagnóstico molecular e sorológico de malária em larga escala.* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.

Lima GF, Arroyo Sanchez MC, Levi JE, Fujimori M, Da Cruz Caramelo L, Sanchez AR, Ramos-Sanchez EM Inoue J, De Jesus Costa-Nascimento M, Junior AM, Di Santi SM. *Asymptomatic infections in blood donors harboring Plasmodium: an invisible risk detected by molecular and serological tools.* Blood Transfus. 2018;16:17-25.

Lima GF, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MC, Segurado AA, Hristov AD, Inoue J, Costa-Nascimento MJ, Di Santi SM. *Malaria diagnosis from pooled blood samples: comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011;106:691-700.

Lima GF, Lucchi NW, Silva-Flannery L, Macedo- de- Oliveira A, Hristov AD, Inoue J, Costa-Nascimento Mde J, Udhayakumar V, Di Santi SM. *Still Searching for a*

Suitable Molecular Test to Detect Hidden Plasmodium Infection: A Proposal for Blood Donor Screening in Brazil. PLoS One. 2016;11:3.

Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, et al. *Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR.* PLoS One. 2013;8:e56677

Mascarini, LM. *Uma abordagem histórica da trajetória da parasitologia.* Ciência & Saúde Coletiva. 2003;8:809-14.

Matos, Marina Ruiz de. *Malária em São Paulo: epidemiologia e história.* São Paulo: Hucitec; Funcraf, 2000.

Mendonça VR, Barral-Netto M. *Immunoregulation in human malaria: the challenge of understanding asymptomatic infection.* Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110:945-55.

Miguel RB, Coura JR, Samudio F, Suárez-Mutis MC. *Evaluation of three different DNA extraction methods from blood samples collected in dried filter paper in Plasmodium subpatent infections from the Amazon region in Brazil.* Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013;55(3).

Miguel RB, Albuquerque HG, Sanchez MCA, Coura JR, Santos SDS, Silva SD, Moreira CJC, Suárez-Mutis MC. *Asymptomatic Plasmodium infection in a residual malaria transmission area in the Atlantic Forest region: Implications for elimination.* Rev Soc Bras Med Trop. 2019;52:e20180537.

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.

Montenegro LML. *Desenvolvimento de novas abordagens moleculares baseadas em PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para detecção gênero-*

específica de Plasmodium. [dissertação]. Recife: Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco; 2002.

Moody A. *Rapid diagnostic tests for malaria parasites*. Clin Microbiol Rev. 2002;15:66–78.

Moraes SL, Di Santi SM, Sanchez MCA. Malária. In *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 24 , p. 284 -297.

Mosha JF, Sturrock HJ, Greenhouse B, Greenwood B, Sutherland CJ, Gadalla N, Atwal S, Drakeley C, Kibiki G, Bousema T, Chandramohan D, Gosling R. *Epidemiology of subpatent Plasmodium falciparum infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics*. Malar. J. 2013;12:221.

Mullis KB, Faloona FA. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in Enzymology. 1987;155:335–50.

Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, Pinzon C, Wang R, Talley AK, Kappe SH, Duffy PE, Cookson BT. *Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage Plasmodium falciparum infections in malaria human challenge trials*. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(3):383-94.

Naeem MA, Ahmed S, Khan SA. *Detection of asymptomatic carriers of malaria in Kohat district of Pakistan*. Malar J. 2018;17:44.

Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. *Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control*. Nature Commun. 2012;3:1237.

Olliaro PL, Barnwell JW, Barry A, Mendis K, Mueller I, Reeder JC, Shanks GD, Snounou G, Wongsrichanalai C. *Implications of Plasmodium vivax Biology for Control, Elimination, and Research*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2016;95:4–14.

Oliveira MRF. *Análise de custo-efetividade de teste rápido para o diagnóstico de casos novos de malária em doze municípios endêmicos do Estado do Pará*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.

Oliveira NKA. *Diagnóstico molecular da malária vivax: precisão e sensibilidade*. [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2015.

PAHO/WHO. Pan American Health Organization / World Health Organization. *Epidemiological Update: Epidemiological Update Malaria in the Americas in the context of COVID-19 pandemic*, June 10, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/52288>, acesso em 30/07/2021.

Panda BB, Meher AS, Hazra RK. *Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness*. J Parasit Dis. 2019. 43(3):337-342.

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. *Development of real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis*. J Clin Microbiol. 2004;42:1214-9.

Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, De Araújo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-de-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. *Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2014;109:618-33.

Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Wellems TE. *Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa*. Am J Trop Med Hyg. 1995;52(6):565-8.

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

Rolfes MA, McCarra M, Magak NG, Ernst KC, Dent AE, Lindblade KA, John CC. *Development of clinical immunity to malaria in highland areas of low and unstable transmission*. Am J Trop Med Hyg. 2012;87:806-12.

Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MMG, Mens PF. *Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis*. Crit Rev Clin Lab Sci. 2016;53:87-105.

Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. *Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays*. J Clin Microbiol. 2004;42,:5636–43.

Sallum MAM, Urbinatti PR, Malafronte RS, Resende HR, Cerutti-Junior C, Natal D. *Primeiro registro de Anopheles (Kerteszia) homunculus Komp (Diptera, Culicidae) no Espírito Santo, Brasil*. Rev Bras entomol. 2008;52:671-3.

Satoguina J, Walther B, Drakeley C, Nwakanma D, Oriero EC, Correa S, Corran P, Conway DJ, Walther M. *Comparison of surveillance methods applied to a situation of low malaria prevalence at rural sites in The Gambia and Guinea Bissau*. Malar J. 2009;8:274.

Schalkwyk DA, Moon R, Blasco B, Sutherland CJ. *Comparison of the susceptibility of Plasmodium knowlesi and Plasmodium falciparum to antimalarial agents*. J Antimicrob Chemother. 2017;72:3051–8.

Schwartz A, Baidjoe A, Rosenthal PJ, Dorsey G, Bousema T, Greenhouse B. *The effect of storage and extraction methods on amplification of Plasmodium falciparum DNA from dried blood spots*. Am J Trop Med Hyg. 2015;92(5):922-5.

Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, Bueno LM, Colella R, Ramos-Sanchez EM, Lima GF, Inoue J, Sanchez MC, Di Santi SM. *Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring Plasmodium malariae*. Rev Inst Med Trop. São Paulo. 2011;53:55-9.

Segurado AC, Di Santi SM. – Malária. In: R. Salomão. *Infectologia: Bases Clínicas e Tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017. cap. 21, p. 164 – 176.

SESSP. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de Zoonoses. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Bepa 2008;5(56):24-25.

SESSP. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de Zoonoses. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Sobre a malária. 2021. Disponível em: <https://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/malaria/sobre-a-malaria>, acesso em 04/08/2021.

Shipley GL. An introduction to real-time PCR in DORAK, T. M. (Ed.). *Real-time PCR*. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

Sistema SYBR Green®, disponível em <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>.

Singh UA, Kumari M, Iyengar S. *Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using Chelex 100 resin*. Biological Procedures Online. 2018;20:12.

Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA. *A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies*. Am J Trop Med Hyg. 1999;60(4):687-92.

Sistema SYBR Green® utilizado em qPCR. Disponível em <http://www.sinobiological.com/sybr-green-qpcr-method-cro-service.html>.

Sistema TaqMan® utilizado em qPCR. Disponível em <http://www.wikiwand.com/en/TaqMan>.

Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. *High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction*. Mol Biochem Parasitol. 1993;61:315-20.

Tanomsing N, Imwong M, Theppabutr S, Pukrittayakamee S, Day N P J, White N J, Snounou G. *Accurate and sensitive detection of Plasmodium species in humans by use of the Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase Linker Region*. Journal of Clinical Microbiology. 2010;48:3735–7.

Waltmann A, Darcy AW, Harris I, Koepfli C, Lodo J, Vahi V, Piziki D, Shanks GD, Barry AE, Whittaker M, Kazura JW, Mueller I. *High Rates of Asymptomatic, Submicroscopic Plasmodium vivax infection and disappearing Plasmodium falciparum malaria in an area of low transmission in Solomon Islands*. PLoS Negl Trop Dis. 2015. 9(5): e0003758.

Wang B, Han SS, Cho C, et al. *Comparison of microscopy, nested-PCR, and real-time-PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for*

diagnosis of malaria in asymptomatic carriers from areas of endemicity in Myanmar. J Clin Microbiol. 2014;52:1838-45.

Waters AP, McCutchan TF. *Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA.* Lancet. 1989;17:1343-6.

WHO. Malaria surveillance, monitoring & evaluation: a reference manual. WHO, 2018. Disponível em:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272284/9789241565578-eng.pdf>

WHO. World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. Geneva: World Health Organization; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, Diatta B, Fall KB, Mbaye PS, Diémé Y, Bercion R, Wade B, Briolant S, Pradines B. *Pfhrp2 and pfhrp3 polymorphisms in Plasmodium falciparum isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests.* Malar J. 2013;12:34.