

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIANA ASCHAR FERRAZ

Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Alethia® Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi

São Paulo

2022

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA**

MARIANA ASCHAR FERRAZ

Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Alethia® Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Maria Fátima Di Santi

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ferraz, Mariana Aschar

Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Alethia® Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos / Mariana Aschar Ferraz -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Sílvia Maria Fátima Di Santi.

Descritores: 1.Malária 2.Diagnóstico molecular 3.Malária transfusional
4.Plasmodium 5.Banco de sangue 6.Transplante

USP/FM/DBD-356/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A Deus, que me presenteia todos os dias com a energia da vida.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, pela educação que me deram, pela disciplina que me ensinaram, e por serem um verdadeiro pilar de esperança, sabedoria, respeito a Deus e amor em minha vida.

Ao meu marido e companheiro, Charles, pelo apoio incondicional oferecido em todos os aspectos, pela sua ajuda em manter nosso lar operacional enquanto eu investia tempo neste trabalho, e que foi capaz de suportar todos os meus momentos de estresse durante o processo.

Ao meu filho, Arthur, pela sua compreensão com as minhas horas de ausência.
Sem vocês por perto os resultados não seriam os mesmos.

Agradecimentos

Gostaria de iniciar os meus agradecimentos à grande responsável por este estudo, a minha orientadora Silvia Di Santi, sem ela nada disso seria possível. Sou grata a ela por ter aberto as portas do laboratório e ter me dado a maior oportunidade da minha vida que foi este projeto lindo, além de toda a dedicação que ela teve comigo e toda a força e incentivo que ela me deu ao longo desses anos. Hoje me sinto capaz de receber o título de doutora graças a todos os seus ensinamentos.

Agradeço por todo o suporte e amizade da equipe maravilhosa do Núcleo de Estudos em Malária, Christina R. C. Toniolo, Maria de Jesus Costa-Nascimento (Dida) e Maria Silvia P. de Paula, que me ajudaram nas minhas coletas, nas leituras das lâminas e na bancada. À grande amiga que fiz, Maria de Lourdes Rêgo Neves Farinas (Malu), que me ajudou a entender a rotina no laboratório e por todo o seu incentivo.

À Dra. Carmen Arroyo Sanchez, por toda ajuda e atenção que nos deu. Pela oportunidade de nos oferecer os antígenos para os ensaios de sorologia e o seu laboratório para que pudéssemos fazer as reações. Por toda a sua contribuição nas análises dos resultados, nas análises estatísticas e nas suas correções. Agradeço também a Ruth, que com muita paciência, me ensinou e ajudou na realização das reações de ELISA.

Ao Dr. José Eduardo Levi, que aceitou prontamente colaborar com este projeto e pelas portas que abriu para que pudéssemos realizá-lo.

A toda a minha família que sempre apoiou as minhas escolhas. Aos meus pais que me deram a base da educação e me ensinaram a lutar pelos meus sonhos. Ao meu marido, Charles, e aos meus sogros, Cristina e Rubens, que cuidaram do meu filho e da minha casa enquanto eu me dedicava a realização deste projeto, sem o apoio e suporte deles eu não teria conseguido realizar esse sonho. Ao meu filho, Arthur, que com os seus cinco anos de idade compreendeu a minha ausência enquanto eu me dedicava aos meus estudos. Ao meu irmão e minha cunhada, Marcelo e Suzana, que sempre me deram forças e torceram pelas minhas conquistas. A minha gata, June, que me deu seu carinho nos dias e nas noites de estudo.

Ao Dr. Alfredo Mendrone Júnior, a Dra. Sandra Camargo Montebello e toda a equipe do Posto de Coleta da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo. Ao Dr. Afonso

José P. Cortez e toda a equipe da Colsan e do Hemonúcleo de Santos. Ao Dr. Denys Eiti Fujimoto, Dra. Thereza Picado, a Larissa Campos e toda a equipe do Hemoacre. Sem o auxílio de todos não seria possível a realização das coletas das amostras desse estudo.

A todos os doadores de sangue e doadores/receptores de órgãos ou tecidos que participaram deste estudo.

A secretaria da Pós-Graduação do Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, a PROAP/CAPES pelo suporte na obtenção de insumos e ao Núcleo de Estudos em Malária/SUCEN/IMT/FMUSP pela infraestrutura laboratorial para a realização deste trabalho.

Meu muito obrigada a todos que participaram diretamente ou indiretamente deste projeto.

E por fim, agradeço mais do que tudo a Deus!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Ferraz MA. Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Alethia® Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A malária é uma doença infecciosa causada por *Plasmodium* transmitida naturalmente por *Anopheles*, ou induzida por via congênita durante o parto, compartilhamento de seringas, transfusão sanguínea e transplantes de órgãos e tecidos. Pode se manifestar com formas graves, mas também como infecções assintomáticas difíceis de diagnosticar devido à baixa densidade do parasito. A região Amazônica brasileira contribui com 99,9% dos casos. Na região extra-amazônica, o estado de São Paulo figura entre os que apresentam maior número de notificações e casos autóctones, estes em áreas cobertas por Mata Atlântica. Embora a gota espessa (GE) seja a referência para o diagnóstico, não se aplica à detecção de baixas parasitemias na triagem de doadores assintomáticos em bancos de sangue e transplantes de órgãos e tecidos. Protocolos moleculares como qPCR são mais sensíveis, porém de uso na rotina limitado, por exigir infraestrutura laboratorial complexa. A busca por protocolos moleculares *point-of-care* é fundamental para o diagnóstico acurado na triagem de doadores e receptores assintomáticos portando *Plasmodium*. Este estudo avaliou os ensaios moleculares Alethia® Malaria LAMP e Malachite Green (MG) LAMP em comparação com a técnica de qPCR, em amostras de candidatos a doadores de sangue e de doadores/receptores de órgãos ou tecidos para transplantes em três bancos de sangue de região endêmica e não endêmica para malária. Foram coletadas 1054 amostras, sendo 365 na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, 188 no Hemonúcleo e 501 no Hemoacre. A positividade dos testes moleculares foi de 5,3% na qPCR (56/1054), de 1,4% no Alethia® LAMP (15/1054) e de 2,8% no MG LAMP (5/180). A positividade da GE foi de 0,2% (2/1054). A exposição dos candidatos a antígenos de *Plasmodium* foi avaliada por ELISA, com 3,3% (6/180) reagentes no ELISA–*Pm*, 7,2% (13/180) no ELISA–*Pv* e 3,4% (3/87) no ELISA–*Pf*. As amostras positivas em pelo menos um dos testes foram submetidas ao *nested* PCR para determinação da espécie de *Plasmodium*, sendo identificadas 11 positivas para *P. malariae*. Dentre as 1054 amostras analisadas, duas foram positivas para todos os testes, sendo uma de doador de área endêmica e outra de não endêmica, ambas identificadas como *P. malariae*. Com a pandemia de COVID-19, as restrições impactaram na coleta de amostras de doadores e receptores de transplantes baseada em amostragem de conveniência. Neste cenário, foi possível a obtenção de 19 amostras de doadores e/ou receptores provenientes de áreas com transmissão de malária, todas negativas nos testes realizados. A utilização dos protocolos *point-of-care* Alethia® Malaria LAMP e Malachite Green LAMP mostrou-se aplicável à triagem de doadores e receptores em serviços de hemoterapia e transplante, para aumentar a segurança dos receptores de sangue, órgãos e tecidos.

Descritores: Malária. Diagnóstico molecular. Malária transfusional. *Plasmodium*. Banco de sangue. Transplante.

ABSTRACT

Ferraz MA. Evaluation of the molecular protocols LAMP Alethia[®] Malaria and Malachite Green for the detection of asymptomatic infections and their applicability in hemotherapy practices and organ or tissue transplants [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* transmitted naturally by *Anopheles*, or induced congenitally during childbirth, sharing syringes, blood transfusion, and organ and tissue transplants. It may progress to severe cases, but also as asymptomatic infections difficult to diagnose due to the low density of the parasites. The Brazilian Amazon region contributes with 99,9% of the cases. In the extra-Amazon region, the state of São Paulo is among those with the highest number of imported cases. Rare autochthonous outbreaks are reported in areas covered by the Atlantic Forest. Although the thick blood smear is the reference test for diagnosis, it does not apply to the detection of low parasitemias in the screening of asymptomatic donors in blood banks or organ and tissue transplants. Molecular protocols such as qPCR are more sensitive, but of limited use in the routine, as they require complex laboratory infrastructure. The search for point-of-care molecular protocols is essential for accurate diagnosis in the screening of asymptomatic donors and receptors harboring *Plasmodium*. This study evaluated the molecular assays Alethia[®] Malaria LAMP and Malachite Green LAMP in comparison with the qPCR technique, in samples of candidates for blood donors and in donors/recipients of organs or tissues for transplants in three blood banks from endemic and non-endemic regions for malaria. A total of 1,054 samples were collected, of which 365 were collected at the Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, 188 at Hemonúcleo and 501 at Hemoacre. The positivity of the molecular assays was 5.3% for qPCR (56/1054), 1.4% for Alethia[®] LAMP (15/1054) and 2.8% for MG LAMP (5/180). The positivity of the thick blood smear was 0.2% (2/1054). The exposure of candidates to *Plasmodium* antigens was evaluated by ELISA, with 3.3% (6/180) of samples reagents in ELISA-*Pm*, 7.2% (13/180) in ELISA-*Pv* and 3.4% (3/87) in ELISA-*Pf*. The positive samples in at least one of the tests were assayed by nested PCR to determine the *Plasmodium* species, with 11 positives for *P. malariae*. Among the 1054 samples analyzed, two were positive for all tests, one from donor from endemic area and the one from non-endemic area, both identified as *P. malariae*. With the COVID-19 pandemic, the restrictions impacted the collection of samples from donors and transplant recipients based on convenience sampling. In this scenario, it was possible to obtain 19 samples from donors and/or recipients from areas with malaria transmission, all negative in the tests performed. The use of the point of care protocols Alethia[®] Malaria LAMP and Malachite Green LAMP showed to be suitable for the screening of donors and recipients in hemotherapy and transplantation services, to increase the safety of blood, organ, and tissue recipients.

Descriptors: Malaria. Molecular diagnosis. Transfusional malaria. *Plasmodium*. Blood bank. Transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens de esfregaço de sangue corado com Giemsa visualizadas em microscópio óptico: (A) <i>Plasmodium falciparum</i> , (B) <i>P. vivax</i> , (C) <i>P. malariae</i> , (D) <i>P. ovale</i> . (E) <i>P. knowlesi</i>	19
Figura 2. Sintomas clássicos da malária (A); manifestações clínicas e achados laboratoriais indicativos de malária grave (B, C)	21
Figura 3. Ciclo biológico da malária	23
Figura 4. Países com casos autóctones em 2000 e sua situação em 2020. Os países que apresentarem zero casos autóctones por pelo menos 3 anos consecutivos, recebem o certificado de eliminação da malária	25
Figura 5. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021	27
Figura 6. Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020	28
Figura 7. Casos de malária notificados segundo espécie parasitária, Brasil, 2019-2021 ..	29
Figura 8. Casos de malária notificados na região extra-amazônica, por espécie parasitária, entre 2007 e 2022.....	30
Figura 9. Número e proporção de casos de malária por Unidade Federativa (UF) e região de acordo com o local provável de infecção, 2021	31
Figura 10. Número de casos notificados de malária na região extra-amazônica de acordo com a espécie parasitária e tendência, janeiro de 2020 a junho de 2021	32
Figura 11. Mosquito transmissor da malária humana e símia em região de Mata Atlântica, <i>Anopheles (Kerteszia) cruzii</i> . Foto de Genilton Vieira.....	39
Figura 12. Esquema do comportamento alimentar de <i>An. (K.) cruzii</i> que ocorre tanto nas copas das árvores como próximo ao solo, favorecendo a transmissão do <i>Plasmodium</i> em primatas não humanos e humanos em locais próximos a fragmentos de florestas	40
Figura 13. Mapa do Brasil com identificação das regiões endêmica e não endêmica para malária, com a localização dos bancos de sangue participantes do estudo.....	50
Figura 14. Fluxograma do estudo, apresentando o número total de amostras ensaiadas em cada protocolo. Para as técnicas de qPCR, GE e Alethia LAMP foram ensaiadas todas as amostras coletadas (n=1054), porém para o LAMP as reações foram realizadas em <i>pools</i>	

de duas amostras. Para o ensaio de MG LAMP foram sorteadas 10% das amostras negativas nos demais testes, para cada posto de coleta. Além disso, foram ensaiadas todas as amostras positivas em qualquer teste molecular e GE, totalizando 180 amostras. Essas mesmas amostras foram ensaiadas por ELISA *Pm/Pv*. ELISA *Pf* somente foi realizado com as amostras coletadas em área endêmica (n=87).....52

Figura 15. **A:** Amplificação da qPCR dos controles positivos de cultura de *P. falciparum* com diluições seriadas com parasitemias de 3.600 a 0,36 parasitos/ μ L e os valores do *Cycle threshold* (Ct) variando entre 21,7-34,3; **B:** Curva padrão mostrando o logaritmo da quantidade inicial do parasito (eixo x) em relação ao Ct (eixo y) com coeficiente de determinação (R²) de 0,99 e inclinação -3,253

Figura 16. Curva padrão para MG LAMP com amostra de *P. falciparum* de cultura com diluições seriadas com parasitemias de 38.162 parasitos/ μ L a 2,3 parasitos/ μ L. CN: Controle negativo.....54

Figura 17. Esquema das etapas do Alethia[®] Malaria LAMP, incluindo um passo de preparação da amostra seguido de um passo de amplificação57

Figura 18. Esquema representativo do MG LAMP, com leitura visual dos resultados.....59

Figura 19. Fluxograma do estudo com os resultados obtidos em cada teste realizado: qPCR, gota espessa (GE), Alethia[®] LAMP, Malachite Green (MG) LAMP e ELISA64

Figura 20. Positividade em pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo (qPCR, Alethia[®] LAMP, MG LAMP, GE, nested PCR e ELISA) em relação ao total de amostras coletadas em cada banco de sangue (Hemoacre, FPSH/SP, Hemonúcleo)68

Figura 21. Caso positivo de candidato da FPSH/SP com deslocamento para área endêmica. **A:** resultado da GE, mostrando estrutura semelhante a *Plasmodium*. **B:** amplificação pela qPCR, em que a curva azul é o controle positivo com 100 parasitos/ μ L, a curva verde o controle positivo com 10 parasito/ μ L e a curva rosa do doador de sangue75

Figura 22. Caso positivo de candidato da FPSH/SP com deslocamento para área endêmica. **A:** Amplificação da amostra ensaiada individualmente no Alethia[®] LAMP para *Plasmodium*. **B:** ELISA reagente para *P. malariae*. **C:** Amplificação de DNA genômico por *nested* PCR, com banda de 144 pb correspondente a *P. malariae*, onde 214 = doador, CN = controle negativo e *Pm* = controle positivo para *P. malariae*. **D:** Amplificação para *Plasmodium* com coloração azul esverdeada no MG LAMP76

Figura 23. Caso positivo em doador da FPSH/SP com deslocamento para região de Mata Atlântica. **A:** resultado positivo da GE. **B:** amplificação pela qPCR, onde a curva azul é o controle positivo com 100 parasitos/ μ L, curva verde o controle positivo com 1 parasito/ μ L e curva rosa do doador de sangue77

Figura 24. Caso positivo em doador da FPSH/SP com deslocamento para região de Mata Atlântica **A:** Amplificação da amostra individualmente no Alethia[®] LAMP para *Plasmodium*. **B:** ELISA reagente para *P. malariae*. **C:** Amplificação de DNA genômico por *nested* PCR, com banda de 144 pb correspondente a *P. malariae*, onde 180 = doador, CN = controle negativo e Pm = controle positivo para *P. malariae*. **D:** Amplificação para *Plasmodium* com coloração azul esverdeada no MG LAMP.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> gênero-específicos para <i>Plasmodium</i> e a sonda marcada com FAM™ e TAMRA™ para a qPCR	55
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> gênero-específicos e espécie-específicos utilizados nas reações de <i>nested</i> PCR.....	56
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> gênero-específicos para <i>Plasmodium</i> utilizados para a reação MG LAMP	58
Tabela 4. Número de amostras processadas, apresentadas segundo o teste parasitológico, molecular ou sorológico realizado e o deslocamento para regiões endêmicas e não endêmicas	63
Tabela 5. Positividade para <i>Plasmodium</i> ou para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> das amostras coletadas de doadores de sangue, para cada teste parasitológico, molecular ou sorológico realizado	65
Tabela 6. Positividade para <i>Plasmodium</i> ou para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> das amostras coletadas na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (n=365) de acordo com o deslocamento para região endêmica (n=116) e não endêmica (n=249).....	66
Tabela 7. Positividade para <i>Plasmodium</i> ou para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> das amostras coletadas no Hemonúcleo de Santos (n=188) de acordo com o deslocamento para região endêmica (n=7) e não endêmica (n=181).....	66
Tabela 8. Positividade para <i>Plasmodium</i> ou para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> das amostras coletadas no Hemoacre em Rio Branco, AC (n=501)	67
Tabela 9. Concordância entre os resultados obtidos por qPCR e Alethia® LAMP utilizando os testes McNemar e Kappa.....	70
Tabela 10. Concordância entre os resultados obtidos nas três técnicas (qPCR, Alethia® LAMP e MG LAMP) utilizando o teste Q de Cochran e comparação entres dois pares (McNemar pareado e Kappa)	72
Tabela 11. Associação entre os resultados dos ensaios de ELISA com as amostras negativas selecionadas por sorteio (n=96) e os casos positivos por qPCR, Alethia® LAMP	

e/ou GE (n=84) e com as amostras dos candidatos com deslocamentos para região endêmica e não endêmica, utilizando teste exato de Fisher	73
Tabela 12. Concordância entre os resultados obtidos nos testes moleculares e ELISA em amostras negativas selecionadas por sorteio e os casos positivos (qPCR, Alethia® LAMP e/ou GE): análise total (n=180) e separada entre as amostras dos candidatos com deslocamentos para região endêmica (n=105) e não endêmica (n=75) utilizando os testes de McNemar e Kappa	74
Tabela 13. Resultado das amostras coletadas de doadores/receptores para transplante de órgãos ou tecidos, ensaiadas por qPCR, Alethia® LAMP, MG LAMP, GE e <i>nested</i> PCR .	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LAMP	<i>loop-mediated isothermal amplification</i>
WHO	World Health Organization
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
IPA	Incidência Parasitária Anual
SHM	Série Histórica de Malária
SISMAL	Sistema de Informação do Programa de Controle da Malária
Sivep	Sistema de Vigilância Epidemiológica
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
MS	Ministério da Saúde
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
GE	Gota espessa
RDTs	<i>Rapid Diagnostic Tests</i>
HRP2	<i>Histidine-rich protein 2</i>
pLDH	lactato desidrogenase de <i>Plasmodium</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
LoD	Limite de detecção (<i>limit of detection</i>)
Ct	<i>Cycle threshold</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
IgG	Imunoglobulina G
pmp	por milhão de população
TTS	Transmissão por transfusão sanguínea
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	15
SUMÁRIO	16
INTRODUÇÃO.....	19
1. Aspectos gerais da malária.....	19
2. Ciclo biológico do <i>Plasmodium</i>	22
3. Aspectos epidemiológicos da malária.....	23
<i>Malária no mundo.....</i>	<i>23</i>
<i>Consequências das interrupções dos sistemas de saúde durante a pandemia de COVID-19.....</i>	<i>25</i>
<i>Malária nas Américas.....</i>	<i>26</i>
<i>Malária no Brasil.....</i>	<i>26</i>
4. Diagnóstico da malária.....	32
<i>LAMP - loop-mediated isothermal amplification</i>	<i>36</i>
5. Infecções assintomáticas.....	37
6. Malária autóctone na Mata Atlântica.....	38
7. Malária zoonótica envolvendo primatas não humanos.....	40
8. Transmissão da malária por transfusão sanguínea (TTS).....	42
9. Transmissão por transplante de órgãos ou tecidos.....	43
OBJETIVOS.....	46

1. Geral	46
2. Específicos.....	46
MATERIAIS E MÉTODOS	47
1. Desenho do estudo	47
2. Coleta de amostras	47
3. Coleta de amostras em bancos de sangue.....	47
<i>Região não endêmica para malária</i>	48
<i>Região endêmica para malária</i>	49
4. Coleta de amostras de doadores e/ou receptores de órgãos ou tecidos para transplante.....	50
5. Diagnóstico por gota espessa (GE)	52
6. Controles positivos e negativos para os testes moleculares.....	53
7. Extração de DNA	54
8. Análise molecular.....	54
<i>qPCR</i>	54
<i>Nested PCR</i>	55
<i>Alethia® Malaria LAMP</i>	56
<i>Malachite Green LAMP</i>	58
9. Sorologia.....	59
<i>Teste imunoenzimático - ELISA</i>	59
10. Aspectos éticos da pesquisa	61
11. Análise estatística.....	61
RESULTADOS	63
1. Amostras coletadas em bancos de sangue	63
2. Positividade para <i>Plasmodium</i> ou para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> das amostras coletadas de doadores de sangue, para cada teste parasitológico, molecular ou sorológico realizado.....	63

<i>Amostras positivas amplificadas em simplicata na qPCR</i>	68
3. Comparação entre Alethia® LAMP e qPCR	69
4. Comparação entre qPCR, Alethia® e MG LAMP	70
5. Análises sorológicas - ELISA.....	72
6. Resultados dos testes moleculares comparados aos testes sorológicos	74
7. Amostras positivas para <i>Plasmodium</i> e para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i> de doadores de sangue, nos testes parasitológico, molecular e sorológico.....	75
8. Investigação epidemiológica dos dois casos positivos para <i>Plasmodium</i> e para anticorpos anti- <i>Plasmodium</i>	78
9. Amostras coletadas de doadores/receptadores de órgãos ou tecidos para transplantes.....	80
DISCUSSÃO.....	81
CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXO I	100
ANEXO II	103

INTRODUÇÃO

1. Aspectos gerais da malária

A malária é uma doença infecciosa causada por parasitos protozoários intracelulares do gênero *Plasmodium*, transmitidos naturalmente ao homem pela picada de fêmeas infectadas do mosquito *Anopheles*. Porém, há outras formas de transmissão menos comuns, como por via congênita durante o parto, por compartilhamento de seringas, por transfusão sanguínea (Ashley et al., 2018) e em transplantes de órgãos (Pierrotti et al., 2018) e tecidos (Inoue et al., 2010). São cinco as espécies de *Plasmodium* que podem causar a malária humana: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi* (Figura 1), este último somente reportado no Sudeste Asiático (Miguel-Oteo et al., 2017; Segurado e Di Santi, 2017).

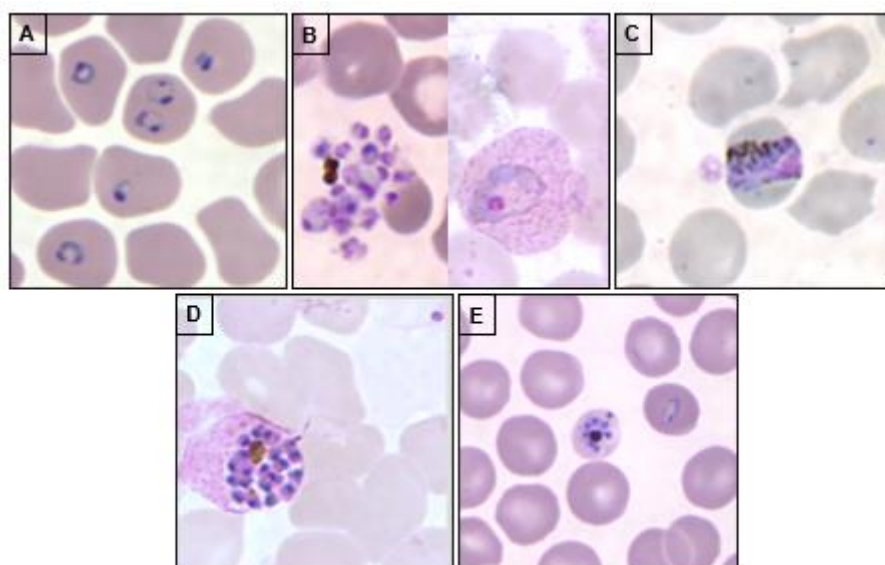


Figura 1. Imagens de esfregaço de sangue corado com Giemsa visualizadas em microscópio óptico: (A) *Plasmodium falciparum*, (B) *P. vivax*, (C) *P. malariae*, (D) *P. ovale*. (E) *P. knowlesi*

Fonte: Galeria de imagens do Laboratório de Identificação de Parasitos de Interesse para a Saúde Pública (DPDx), do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

A malária é considerada uma das principais doenças infecciosas em regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em 85 países. Mundialmente destaca-se o continente africano,

com a maioria dos casos sendo por *P. falciparum*, principalmente em crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas (WHO, 2021a).

A malária é uma doença considerada antiga. Registros históricos como em um documento chinês datado de 2700 a.C., peças de argila da Mesopotâmia de 2000 a.C., papiros egípcios de 1570 a.C. e textos hindus do século VI a.C. sugerem a ocorrência de casos já nessa época. Na Grécia antiga Homero (850 a.C.), Empédocles de Agrigento (550 a.C.) e Hipócrates (400 a.C.), relacionavam as febres da malária e o baço aumentado com pessoas que moravam próximo a pântanos. Durante 2500 anos acreditou-se que a malária era causada por miasmas vindos dos pântanos, e o nome dado à doença originou-se do italiano mal'aria, significando "ar estragado". No entanto, com o descobrimento das bactérias por Antoni van Leeuwenhoek em 1676 e com a teoria dos germes por Louis Pasteur e Robert Koch em 1879, foi admitido que as causas das doenças infecciosas se deviam à presença de microrganismos. Os estudos sobre a malária foram intensificados com a descoberta dos parasitos causadores da doença por Charles Louis Alphonse Laveran em 1880 e dos mosquitos vetores da malária aviária, por Ronald Ross em 1897. Entre 1898 e 1900, os cientistas italianos Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli, Angelo Celli, Camillo Golgi e Ettore Marchiafava confirmaram os mosquitos também como vetores da malária humana (Cox, 2010).

Os principais sintomas relacionados à malária são febre alta, cefaleia, sudorese, calafrios, náuseas, vômitos, mialgia e artralgia. A doença, potencialmente fatal, apresenta quadros de febre aguda que ocorrem após a invasão e multiplicação do parasito nos eritrócitos, durante o seu complexo ciclo de vida. O hospedeiro infectado pode ter o quadro agravado em dias ou mesmo horas, evoluindo para anemia grave, hipoglicemia, acidose metabólica, insuficiência renal, edema pulmonar e coma (Figura 2). As infecções causadas por *P. falciparum* e *P. vivax* são as mais prevalentes. As ocasionadas por *P. falciparum* e *P. knowlesi*, quando não reconhecidas ou não tratadas corretamente, podem evoluir com manifestações clínicas graves e levar à morte (Segurado e Di Santi, 2017; Verra et al., 2018).



Figura 2. Sintomas clássicos da malária (A); manifestações clínicas e achados laboratoriais indicativos de malária grave (B, C)

Fonte: Segurado e Di Santi, 2017.

No entanto, além da malária se manifestar em formas graves, pode apresentar infecções assintomáticas, mais difíceis de diagnosticar devido à baixa densidade de parasitos. Apesar da baixa parasitemia, estes reservatórios são capazes de transmitir a infecção (Alho et al., 2017).

Crianças até cinco anos de idade e gestantes são os principais grupos de risco para a malária, devido à baixa imunidade. Nas gestantes a relação entre o *Plasmodium falciparum* e a placenta pode ocasionar a malária placentária, e os efeitos decorrentes são: bebês natimortos, baixo peso ao nascer, parto prematuro, anemia e aumento do risco de malária nos primeiros meses de vida (Moya-Alvarez et al., 2014). De acordo com Ferrarini e colaboradores (2009), a malária congênita pode ocorrer pela transmissão dos parasitos

da mãe para o feto durante a gestação ou no parto, e o grau de imunidade da mãe é o fator determinante para o desenvolvimento da doença.

2. Ciclo biológico do *Plasmodium*

O ciclo biológico do *Plasmodium* (Figura 3) se inicia durante o repasto sanguíneo da fêmea infectada do mosquito *Anopheles*, com a inoculação de cerca de 10 a 100 esporozoítos na pele do hospedeiro. Os esporozoítos alcançam a circulação periférica e migram para o fígado, onde se replicam nos hepatócitos por reprodução assexuada, processo denominado esquizogonia, que resulta na formação de esquizontes hepáticos (Segurado e Di Santi, 2017). Essas células multiplicam-se formando merozoítos, que rompem os hepatócitos e são liberados na corrente sanguínea. O período em que o parasito permanece no fígado é conhecido como ciclo pré-eritrocítico, que normalmente dura 1–2 semanas antes do início do estágio sanguíneo, o ciclo eritrocítico (Josling e Llinás, 2015; Ashley et al., 2018). Os merozoítos invadem as hemácias, iniciando a segunda fase do ciclo através de nova reprodução assexuada, denominada esquizogonia sanguínea. No interior das hemácias, essas células se desenvolvem em trofozoítos, que dão origem aos esquizontes. Estes ao se romperem liberam novos merozoítos, que invadem novas hemácias. É na fase sanguínea que ocorrem as manifestações clínicas da malária. Após alguns ciclos assexuados alguns trofozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, e são ingeridos por outro vetor. No intestino do mosquito ocorre o ciclo sexuado, com a fecundação do gameta feminino pelo masculino. Por um processo chamado esporogonia ocorre o desenvolvimento de esporozoítos, que alcançam as glândulas salivares e são transmitidos a outro hospedeiro (Meibalan e Marti, 2017).

Os ciclos eritrocitários se repetem ao longo da infecção. Em casos de *P. vivax*, *P. ovale* e *P. falciparum* os ciclos se repetem a cada 48 horas, em *P. malariae* a cada 72 horas e em *P. knowlesi* a cada 24 horas. Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* nem todos os parasitos que invadem os hepatócitos evoluem no ciclo hepático. Alguns ficam em estado de latência, denominados hipnozoítos, e são responsáveis pelas recaídas da doença. Essa dormência pode ocorrer por períodos variáveis, habitualmente alguns meses após a infecção e o tratamento. Após esse período os hipnozoítos iniciam a esquizogonia hepática,

seguida da esquizogonia sanguínea, responsável pelo aparecimento de sintomas nas recaídas da infecção (Segurado e Di Santi, 2017).

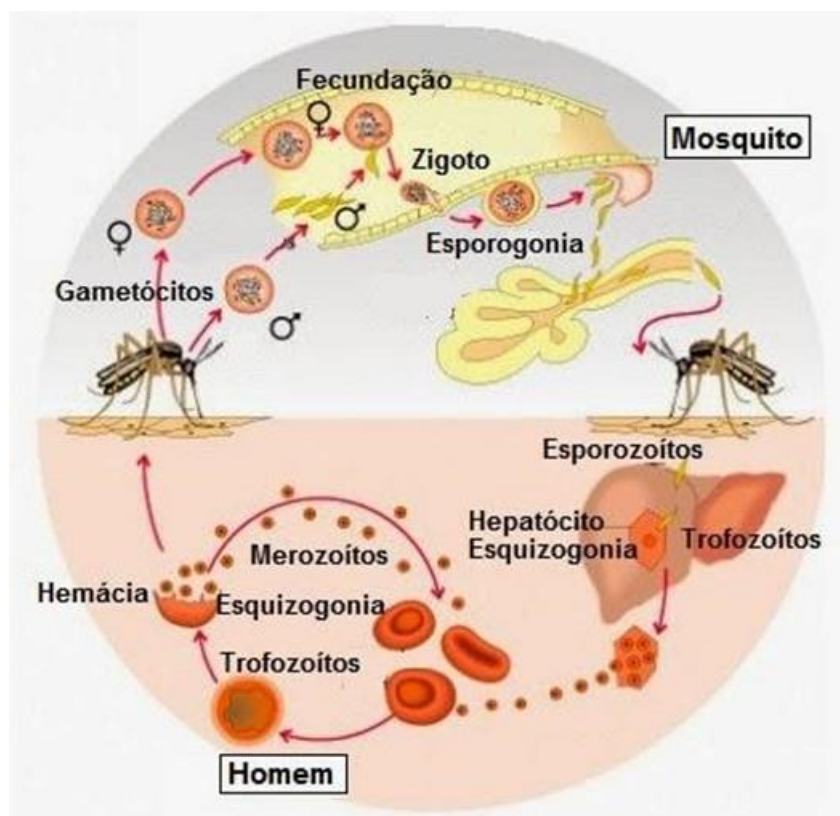


Figura 3. Ciclo biológico da malária

Fonte: http://negritosbio.blogspot.com.br/p/doencas-provocadas-por-protozoarios_6.html

3. Aspectos epidemiológicos da malária

Malária no mundo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que em 2020 ocorreram 241 milhões de casos no mundo, com 85 países endêmicos para malária (Figura 4). Acredita-se que o aumento de 6,2% em relação a 2019 pode estar relacionado com as interrupções que os serviços de saúde sofreram durante a pandemia de COVID-19. A região Africana da OMS foi a principal responsável pelo aumento desses casos, com uma estimativa de 228 milhões, representando 95% dos casos notificados no mundo (WHO, 2021a).

Em 2020 apenas 29 países responderam por 96% dos casos de malária no mundo, e seis contribuíram com mais da metade dos casos: Nigéria (27%), República Democrática do Congo (12%), Uganda (5%), Moçambique (4%), Angola (3,4%) e Burkina Faso (3,4%) (WHO, 2021a).

Entre 2000 e 2019, o número de mortes por malária apresentou uma queda constante, de 896 mil em 2000 para 558 mil em 2019. No entanto, com as interrupções dos sistemas de saúde no mundo devido a pandemia de COVID-19, houve um aumento de 12,4% em 2020 comparado a 2019, com 627 mil mortes. Estima-se que 47 mil (68%) das 69 mil mortes adicionais foram devido a pandemia. Com relação ao total de mortes em crianças menores de 5 anos, houve uma redução de 87% em 2000 para 77% em 2020 (WHO, 2021a).

De acordo com a OMS (2019), em 2018, o *P. falciparum* foi a espécie mais prevalente na África, com 99,7% dos casos, no Mediterrâneo Oriental (71%), na região do Pacífico Ocidental (65%) e no Sudeste Asiático (50%). Globalmente 53% dos casos de *P. vivax* estão no Sudeste Asiático, sendo 47% na Índia. *P. vivax* foi a espécie mais predominante nas Américas, representando 75% dos casos de malária. Entre 2000 e 2020 (WHO, 2021a), houve uma redução na proporção de casos de *P. vivax*, com a redução de 8% (18,5 milhões) para 2% (4,5 milhões) no mundo.

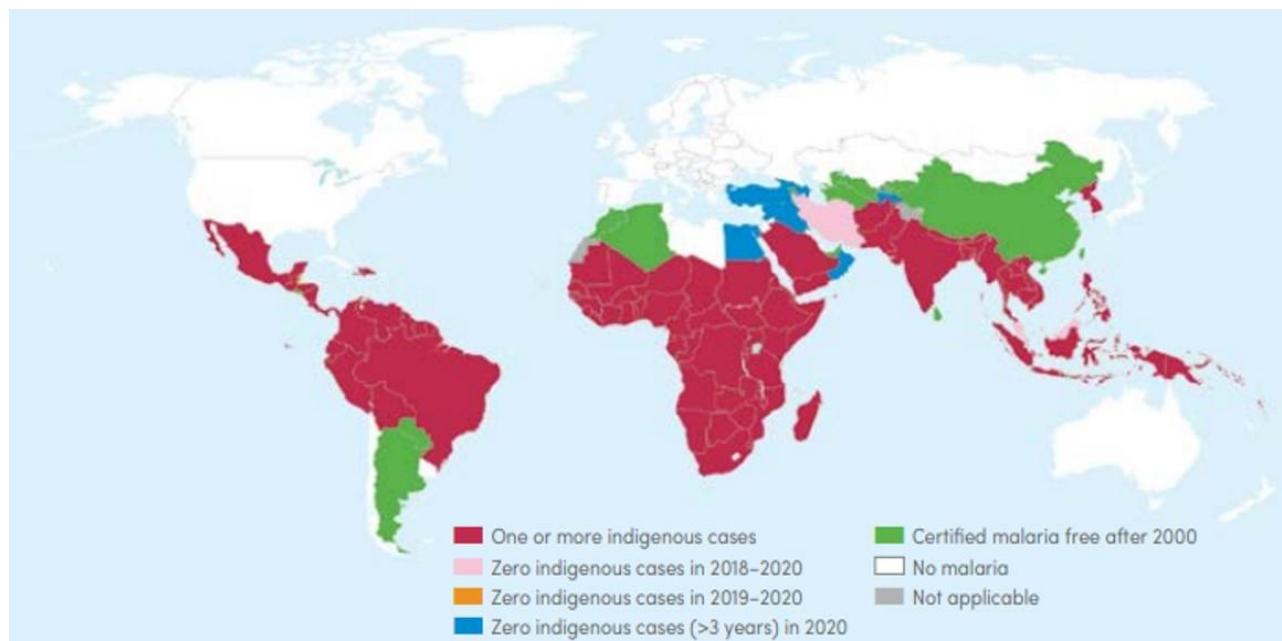


Figura 4. Países com casos autóctones em 2000 e sua situação em 2020. Os países que apresentarem zero casos autóctones por pelo menos 3 anos consecutivos, recebem o certificado de eliminação da malária

Fonte: Banco de dados da OMS (WHO, 2021a).

Consequências das interrupções dos sistemas de saúde durante a pandemia de COVID-19

De acordo com a OMS e instituições parceiras (WHO, 2021a), nos primeiros meses da pandemia foi projetado um panorama em que as interrupções dos serviços de saúde poderiam contribuir para um aumento no número de mortes por malária, e no pior cenário esse número poderia ser duplicado.

No entanto, com o apoio de parceiros globais, regionais e nacionais, os países buscaram manter os serviços essenciais para o diagnóstico e tratamento da malária durante a pandemia, conforme as orientações da OMS. Dados de pesquisa e de rotina mostram que a maioria dos países endêmicos para malária obteve níveis moderados de interrupções em 2020. Durante a pandemia, cerca de 122 milhões de pessoas em 21 países endêmicos para malária solicitaram algum tipo de ajuda para outras emergências humanitárias não relacionadas com a COVID-19 (WHO, 2021a).

Malária nas Américas

Nas Américas, 138 milhões de indivíduos vivem em áreas de risco para malária (OPAS, 2022). Em 2018, 929 mil casos e 577 mortes foram notificados (WHO, 2019). Entre os anos de 2000 e 2020, os casos de malária foram reduzidos em 58% (de 1,5 milhão para 650 mil) e a incidência em 67% (redução de 14 para 5). No entanto, nos últimos anos a República Bolivariana da Venezuela contribuiu com um grande aumento dos casos de malária, de 35.500 casos em 2000 para mais de 467.000 casos em 2019. Em 2020 houve uma redução para 232 mil casos, consequência das restrições à circulação durante a pandemia de COVID-19 e da escassez de combustível que afetou a mineração, principal atividade relacionada ao aumento da transmissão da malária no país (WHO, 2021a).

De acordo com a OMS (WHO, 2021a), em 2020 Haiti, Honduras, Nicarágua, Panamá e Estado Plurinacional da Bolívia, apresentaram um expressivo aumento no número de casos em comparação a 2019. República Bolivariana da Venezuela, Brasil e Colômbia foram os responsáveis por mais de 77% dos casos nesta região. Paraguai, Argentina e El Salvador receberam os certificados como livres de malária em 2018, 2019 e 2021, respectivamente. Pelo segundo ano consecutivo, Belize relatou zero casos de malária autóctone.

Malária no Brasil

No Brasil, são três as espécies causadoras de malária, *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. A região Amazônica é considerada área endêmica para malária, com 99,9% dos casos autóctones notificados. Os estados que compreendem essa região são: Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e parte do Maranhão. De acordo com o Ministério da Saúde, em 2021, 33 municípios dessa área contribuíram com 80% do total de casos autóctones de malária (Brasil, 2022a). Embora a região Amazônica responda pela maioria dos casos, apresenta baixa letalidade para malária (0,022/10.000 habitantes), enquanto que na região extra-Amazônica a letalidade chega a ser 18 vezes maior (Brasil, 2022a). Alguns fatores contribuem para esse quadro, como a dificuldade na suspeita da doença pelos profissionais de saúde e o

desconhecimento de viajantes para áreas endêmicas a respeito dos riscos, retardando o diagnóstico e o tratamento oportuno.

O risco de contrair a doença em área endêmica não é uniforme. Este risco é calculado para cada município da região através da Incidência Parasitária Anual (IPA) de acordo com o número de casos autóctones por mil habitantes, classificando as áreas de transmissão em alto (≥ 50), médio (<50 e ≥ 10), baixo risco (<10 e >1) e muito baixo risco (<1), apresentado na Figura 5 (Brasil, 2022b).

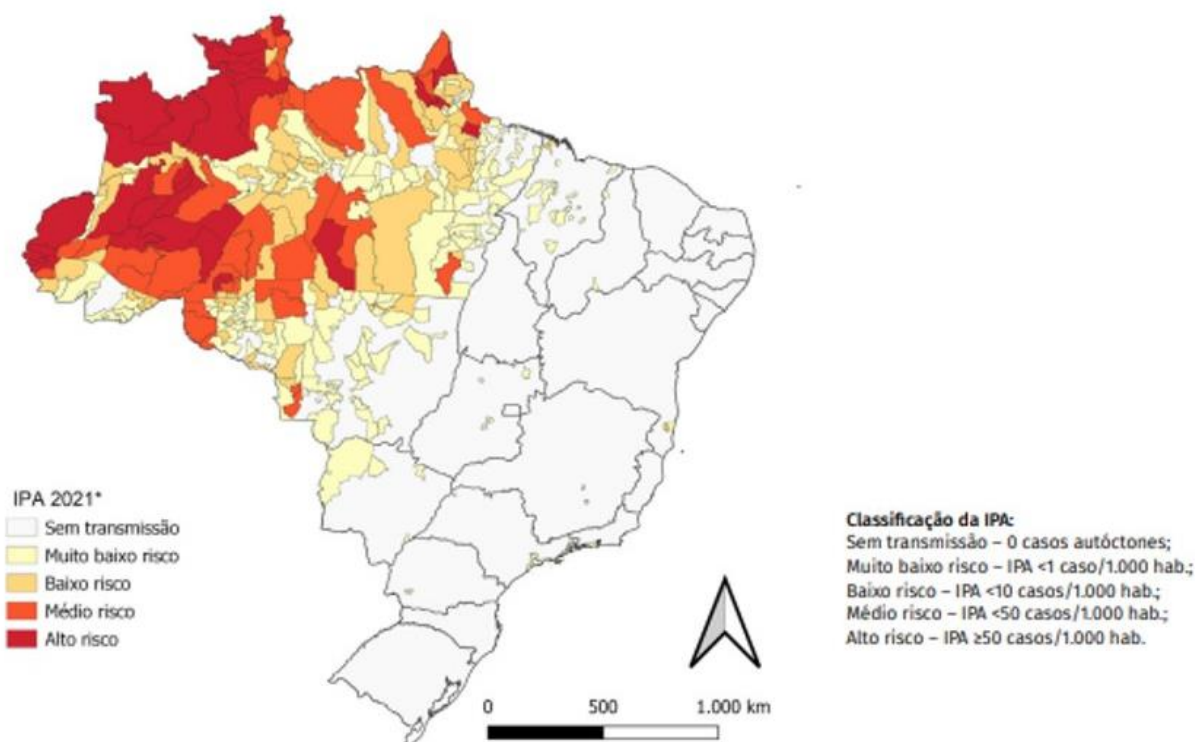


Figura 5. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2021

Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.

Segundo o Ministério da Saúde, de 2010 a 2016 houve redução no número de casos de malária. No entanto, em 2017 foi registrado um aumento de 52,7% nos casos autóctones, com nova redução no número de casos a partir de 2018. Em 2019 foram notificados 157.457 casos autóctones, uma queda de 18,4% em relação a 2018. Em 2020 foram registrados 145.205 casos de malária, 7,8% a menos comparado a 2019, conforme apresentado na Figura 6 (Brasil, 2022a).

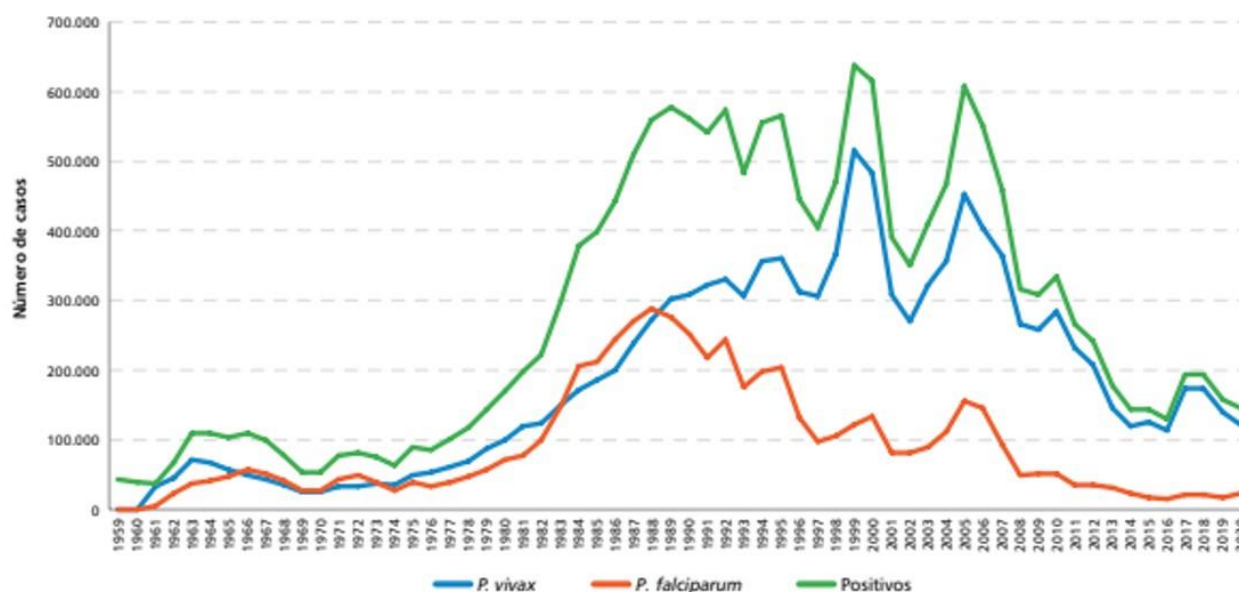


Figura 6. Série histórica de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020

Fonte: SHM, SISMAL, Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 17/8/2021. Dados do Sinan atualizados em: 26/7/2021.

Em 2021, houve uma redução de 4,1% em relação a 2020, com 139.211 casos notificados (Figura 7). Destes, 99% (137.857) foram autóctones sendo 83% (114.449) diagnosticados como *P. vivax* e 17% (23.408) como *P. falciparum* e malária mista e (Brasil, 2022b).

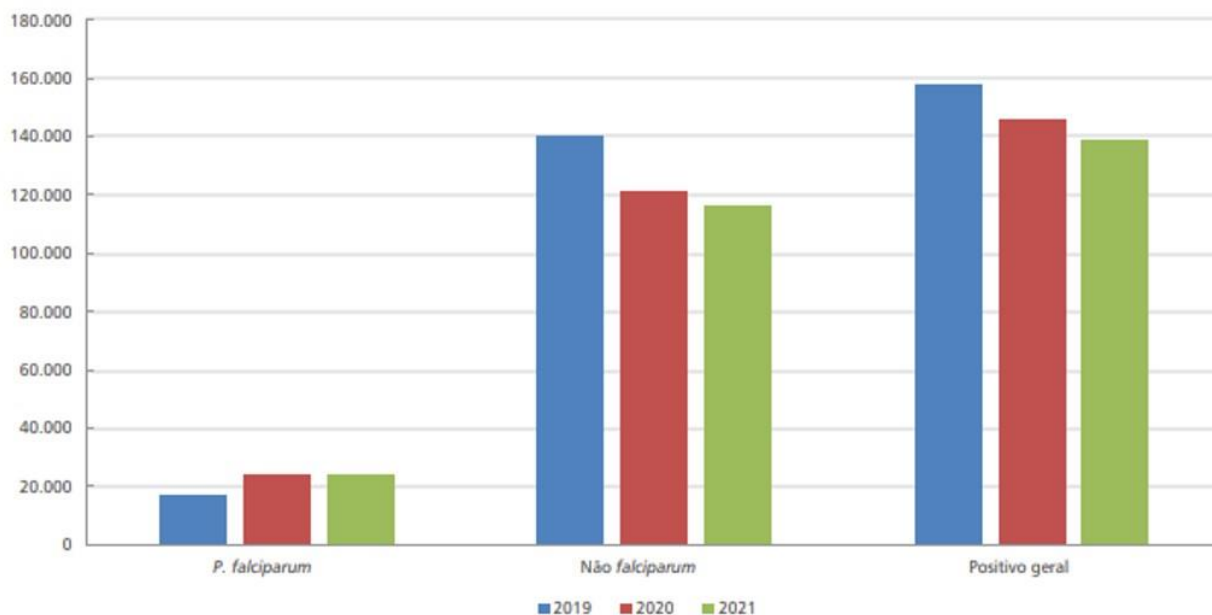


Figura 7. Casos de malária notificados segundo espécie parasitária, Brasil, 2019-2021

Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.

De acordo com Pina-Costa et al. (2014), a área não endêmica para malária compreende a região extra-Amazônica, que é constituída por 17 estados, Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Paraná, além de parte do Maranhão e Distrito Federal. Nesta área, mais de 80% dos casos registrados são originários da região Amazônica brasileira ou de outros países (Brasil, 2018). Esse processo de transmissão ocorre devido ao deslocamento de pessoas para regiões endêmicas, que se infectam e podem causar surtos da doença ao regressarem para seus locais de origem, sendo um alerta para o avanço da doença em áreas não endêmicas com presença do vetor, principalmente em áreas de Mata Atlântica (SP, MG, RJ e ES), onde há transmissão residual de malária (Couto et al., 2010).

Em 2018 e 2019, o número de casos notificados na região extra-amazônica foi de 735 e 540 casos, respectivamente (Figura 8). Em 2021, foram notificados 510 casos, sendo 114 autóctones (Brasil, 2022b), conforme Figura 9. O estado de São Paulo figura entre os que apresentam maior números de notificações. Em 2018 notificou 79 casos, sendo 11 autóctones; em 2019, dentre 72 casos notificados, 14 foram autóctones (Brasil, 2020a),

cuja transmissão se deve à presença de anofelinos do subgênero *Kerteszia* em áreas cobertas por Mata Atlântica (Couto et al., 2010). Os municípios com maior número de casos autóctones em 2019 foram Natividade da Serra, com três casos e Caraguatatuba, São Sebastião e Miracatu com dois casos cada um (CVE, 2020).

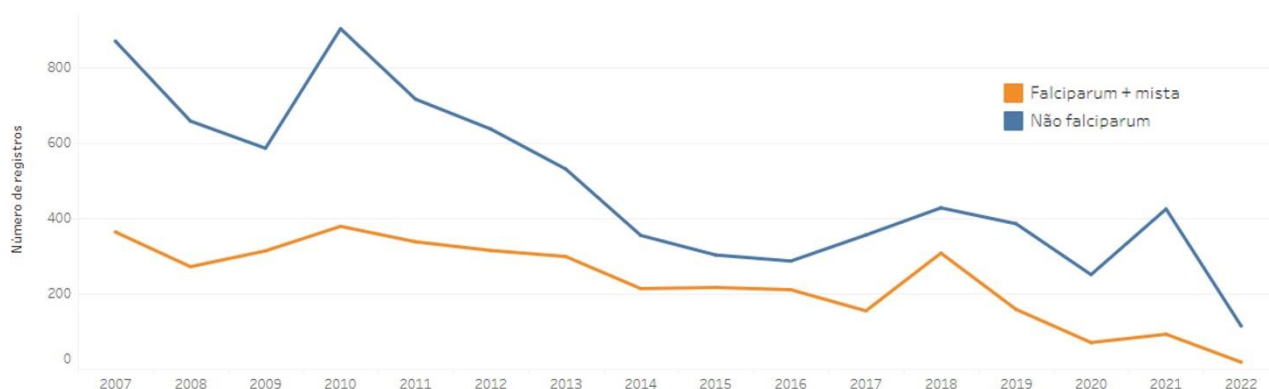


Figura 8. Casos de malária notificados na região extra-amazônica, por espécie parasitária, entre 2007 e 2022

Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 12/05/2022. Dados do Sinan atualizados em: 09/05/2022.

Região	UF	Casos importados de outras UF	Total de casos notificados	Percentual de casos importados de outra UF dentro o total de notificados	Casos exportados para outras UF	Total de casos autóctones	Percentual de casos exportados para outras UF
Região amazônica	AC	600	9.004	6,7%	168	8.459	2,0%
	AM	1.258	57.612	2,2%	4.243	60.380	7,0%
	AP	526	4.567	11,5%	55	4.067	1,4%
	MA	690	922	74,8%	1	99	1,0%
	MT	199	3.699	5,4%	758	4.300	17,6%
	PA	1.915	20.211	9,5%	1.828	20.133	9,1%
	RO	2.803	16.814	16,7%	400	14.388	2,8%
	RR	113	25.851	0,4%	656	25.917	2,5%
	TO	20	21	95,2%	0	0	-
Região amazônica		8.124	138.701	5,9%	8.109	137.743	5,9%
Região extra-amazônica	AL	5	7	71,4%	0	0	-
	BA	8	77	10,4%	0	67	0,0%
	CE	30	30	100,0%	0	0	-
	DF	12	18	66,7%	0	0	-
	ES	0	0	-	0	1	0,0%
	GO	71	78	91,0%	1	3	33,3%
	MG	16	27	59,3%	0	3	0,0%
	MS	13	15	86,7%	1	7	14,3%
	PB	6	6	100,0%	0	0	-
	PE	3	7	42,9%	0	0	-
	PI	20	40	50,0%	0	14	0,0%
	PR	35	40	87,5%	0	2	0,0%
	RJ	17	26	65,4%	1	3	33,3%
	RN	0	1	0,0%	0	0	-
	RS	12	14	85,7%	0	0	-
	SC	16	21	76,2%	0	0	-
	SE	2	2	100,0%	0	0	-
SP	55	101	54,5%	1	14	7,1%	
Região extra-amazônica		321	510	62,9%	4	114	3,5%
Total		8.445	139.211	6,1%	8.113	137.857	5,9%

Figura 9. Número e proporção de casos de malária por Unidade Federativa (UF) e região de acordo com o local provável de infecção, 2021

Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 14/3/2022. Dados do Sinan atualizados em: 10/3/2022.

A pandemia de COVID-19 impactou no número de casos de malária notificados na região extra-Amazônica. No período de janeiro de 2020 a junho de 2021, foram notificados 462 casos de malária (Brasil, 2021). Essa redução de casos em 2020, observada na Figura

10 (Brasil, 2022b), pode ter ocorrido devido ao isolamento social e às restrições de circulação da população entre os estados brasileiros e outros países.

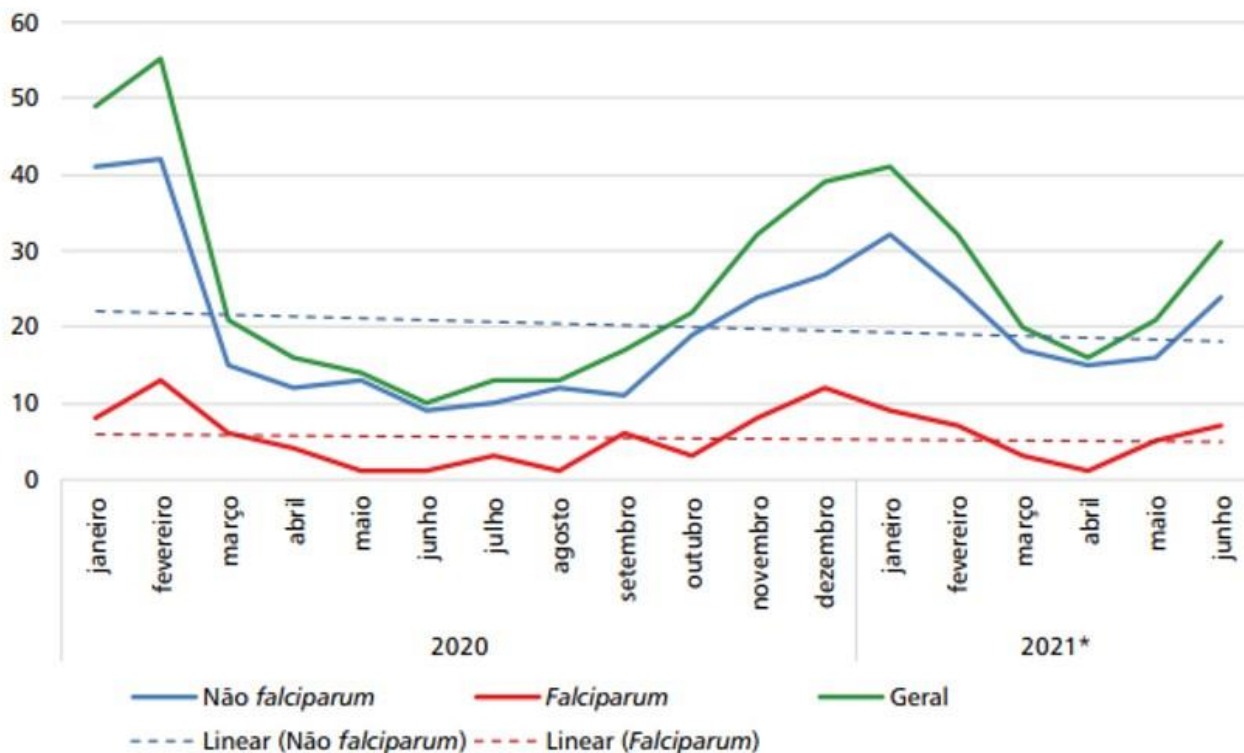


Figura 10. Número de casos notificados de malária na região extra-amazônica de acordo com a espécie parasitária e tendência, janeiro de 2020 a junho de 2021

Fonte: Sivep-Malária/SVS/MS e Sinan/SVS/MS. Dados do Sivep-Malária atualizados em: 17/8/2021. Dados do Sinan atualizados em: 26/7/2021.

4. Diagnóstico da malária

O diagnóstico da malária deve ser realizado em todos os pacientes que apresentem um quadro de síndrome febril e que relatem ter se deslocado para uma região com transmissão da doença. Assim, caso o paciente tenha confirmado sua permanência em área de risco, mesmo que por um curto período, não deve ser descartado o diagnóstico diferencial de malária através de exames laboratoriais específicos. Além dos sinais e sintomas atribuídos à malária, a suspeita pode ser reforçada por um quadro de anemia ou de hepatoesplenomegalia aguda (Segurado e Di Santi, 2017).

A OMS recomenda o diagnóstico imediato por microscopia, considerado o teste de referência para malária. Os testes de diagnóstico rápido (*rapid diagnostic tests* - RDTs), são indicados principalmente quando não há microscopista experiente ou infraestrutura mínima para o diagnóstico por gota espessa (GE). A oferta imediata do diagnóstico permite que todos os pacientes com suspeita de malária possam receber rapidamente o tratamento específico após a confirmação da suspeita e da espécie parasitária (WHO, 2022), fatores essenciais para o controle e eliminação da malária.

Também no Brasil o diagnóstico padrão ouro da malária é a gota espessa, exame microscópico do sangue preparado e corado por Giemsa (Moraes et al., 2013). Além da facilidade na confecção e baixo custo, esta técnica permite o encontro de *Plasmodium* no sangue periférico e a identificação da espécie do parasito infectante, bem como permite a quantificação da parasitemia. A identificação da espécie do parasito é essencial para orientar o tipo de tratamento, o prognóstico e o acompanhamento do paciente (Ashley et al., 2018). Porém, a sensibilidade varia muito, com limites de detecção entre cinco e 50 parasitos/ μ L, podendo atingir 500 parasitos/ μ L quando o exame é realizado por profissionais altamente capacitados (Milne et al., 1994; Moody, 2002). Além disso, o tempo de leitura médio para lâminas negativas ou com baixas parasitemias é de pelo menos 30 minutos, inviabilizando a aplicação da gota espessa em estudos com grande número de amostras.

Como uma alternativa à gota espessa, surgiram técnicas para a detecção de antígenos do parasito, como os RDTs, que utilizam imunocromatografia para a detecção de *histidine-rich protein 2* (HRP2), lactato desidrogenase (*p*LDH) ou aldolase do parasito (Ávila et al., 2002; Moraes et al., 2013). Porém seu alto custo e baixa sensibilidade restringem a sua aplicação em triagem de doadores (Seed et al., 2005).

Dentre os antígenos do parasito detectados pelos RDTs, a HRP2 é produzida exclusivamente por *P. falciparum* e a *p*LDH é produzida por todas as cinco espécies de *Plasmodium* humano. No entanto, os testes rápidos baseados em HRP2 podem resultar em falso-positivos devido à permanência do antígeno circulante, mesmo após a eliminação do parasito. Ainda, resultados falso-negativos podem ocorrer, causados pela presença de parasitos com deleção do gene *pfHRP2* (Di Santi et al., 2004; Saito et al., 2018).

Os ensaios sorológicos como o teste de imunofluorescência indireta (IFI), considerado anteriormente como referência na detecção de anticorpos anti-*Plasmodium* e

o teste imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), utilizados como alternativa na pesquisa de anticorpos (Ferreira e Sanchez, 1988) são ferramentas úteis para o controle e para os programas de eliminação da malária, pois através dessas técnicas é possível avaliar o nível de exposição ao parasito, podendo identificar populações de risco, principalmente em áreas de baixa transmissão onde a detecção da infecção presente é mais difícil (Cotter et al., 2013). De acordo com Labadie-Bracho e colaboradores (2020), os dados sorológicos podem ser úteis em países que estão em processo de eliminação da malária, pois permitem a compreensão da dinâmica de transmissão do *Plasmodium* em áreas com baixa endemicidade, onde anticorpos de longa duração são mais fáceis de detectar do que infecções assintomáticas ou sintomáticas. A proteína de superfície do merozoíto-1 de *Plasmodium* (MSP-1) é a mais abundante no parasito e é responsável pelo processo de invasão nos eritrócitos, por isso é uma importante ferramenta em levantamentos soropidemiológicos da malária (Monteiro et al., 2021).

Um dos desafios para os programas de vigilância e controle da malária são as infecções com baixa densidade do parasito, na sua grande maioria não detectadas nas rotinas pela microscopia e pelos RDTs (Barazorda et al., 2020). Essas metodologias apresentam limitações na detecção, permitindo a continuidade de infecções submicroscópicas, que podem contribuir para a sua manutenção em áreas endêmicas.

O diagnóstico molecular através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*-PCR) apresenta alta sensibilidade e especificidade, podendo também detectar infecções mistas ou parasitemias baixas no caso de assintomáticos (Britton et al., 2016). O limite de detecção, (*limit of detection*-LoD) é a menor quantidade de parasito que pode ser detectada durante um ensaio. De modo geral o LoD para PCR varia de 1-5 parasitos/ μ L comparado a 50-500 parasitos/ μ L para microscopia e mais de 100 parasitos/ μ L para RDTs (Kasetsirikul et al., 2016; Mathison et al., 2017; Leski et al., 2020). Dependendo do protocolo para PCR é possível determinar de forma precisa as espécies de *Plasmodium*, além de estimar a densidade parasitária.

Os protocolos convencionais de PCR, baseados na visualização da amplificação em gel de agarose, como as plataformas de *nested* e *semi-nested* PCR (Snounou et al., 1993; Rubio et al., 1999) apresentam boa sensibilidade e especificidade, porém são trabalhosos e demorados, não sendo adequados para processamento de grande número de amostras biológicas, além de apresentarem elevado risco de contaminação por *amplicons*. Técnicas

de PCR em tempo real (qPCR) têm vantagens por apresentarem processamento rápido, além de diminuir as possibilidades de contaminação, pois são realizadas em equipamento fechado, sem manipulação pós amplificação.

A técnica de qPCR pode ser utilizada como uma ferramenta para quantificação da parasitemia em amostras com níveis submicroscópicos. Com a detecção direta de DNA do parasito é possível a obtenção de resultados quantitativos através do valor de ciclos dado pelo *Cycle threshold* (*Ct*), que é inversamente proporcional à quantidade de DNA amplificado durante a reação, ou através de uma quantificação mais exata pela aplicação da curva padrão, que é uma diluição seriada conhecida de DNA alvo que permite a determinação do número de cópias do parasito por volume de amostra (Haanshuus et al., 2019). No entanto, seu uso na rotina é limitado, devido a desafios técnicos para a sua preparação e a necessidade de equipamentos altamente sofisticados e infraestrutura laboratorial.

Para que o diagnóstico baseado em PCR apresente alta sensibilidade e especificidade, a sua detecção depende da complementaridade das sequências entre o *primer* (sequência conhecida) e o DNA alvo. Desta forma, a eficiência da amplificação pode ser afetada pelo número de cópias do gene alvo ou da sequência de ácido nucleico presente no genoma do *Plasmodium*. O alvo mais utilizado para as técnicas moleculares é o gene 18S rRNA da subunidade menor ribossomal, composto por regiões altamente conservadas em todas as espécies de *Plasmodium* (Snounou et al., 1993) e que possui entre quatro e oito cópias por parasito (Steenkeste et al., 2009). O DNA mitocondrial, alvo também muito utilizado, está presente no parasito em grande quantidade, variando entre 30 e 100 cópias por parasito (Kasetsirikul et al., 2016). Protocolos para a amplificação do gene mitocondrial citocromo b são muito utilizados principalmente em estudos filogenéticos, por ser altamente conservado (Steenkeste et al., 2009).

O protocolo de Lima e colaboradores (2011) para detecção de gênero *Plasmodium* tem sido bastante utilizado, apresentando boa sensibilidade, com LoD de 1 parasito/ μ L. Porém, este protocolo exige a extração de DNA, o que pode acarretar grande volume de trabalho e alto custo no processamento em larga escala. Os protocolos gênero-específicos, embora não suficientes para a determinação das espécies de *Plasmodium* para fins de diagnóstico e tratamento, são indicados para casos em que a detecção de infecção é primordial, antes mesmo da determinação da espécie, como por exemplo, em triagem de

doadores de sangue, receptores e doadores em processos de transplantes e em estudos de vigilância epidemiológica. Neste sentido, a busca por protocolos moleculares *point-of-care* torna-se fundamental para viabilizar o diagnóstico acurado, mesmo em locais com pouca infraestrutura e disponibilidade de recursos humanos.

LAMP - loop-mediated isothermal amplification

Uma técnica molecular que realiza a amplificação isotérmica do DNA mediada por *loop*, conhecida pela sigla em inglês LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), é uma variação da reação da PCR convencional, porém a amplificação e a detecção do DNA ocorrem em etapa única à temperatura constante utilizando a enzima polimerase *Bst* (*Bacillus stearothermophilus*), que é ativada em temperaturas em torno de 60-65°C, deslocando o DNA sintetizado da fita molde sem a necessidade de desnaturação prévia do DNA (Sattabongkot et al., 2014; Aninagyei et al., 2019). Além de ser mais robusta, essa enzima minimiza a inibição, quando comparada com a *Taq* polimerase, comumente utilizada nos ensaios moleculares (Polley et al., 2010). Além disso, é um ensaio molecular *multi-primer* que apresenta alta especificidade, sensibilidade e rapidez, resultado do uso de seis *primers* que reconhecem oito regiões distintas do DNA alvo (FIND, ECC, HTD, 2012).

A técnica LAMP apresenta boa aplicabilidade, por se tratar de protocolo sensível e de fácil execução, exigindo o mínimo de treinamento e infraestrutura, com resultados em curto período, em torno de 45 minutos (Tambo et al., 2018) e boa estabilidade dos reagentes para uso em campo. Em um contexto de controle e eliminação da malária, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais simples e sensíveis para a detecção de parasitos torna-se uma prioridade. Estudos mostram que o protocolo LAMP é uma alternativa promissora para os ensaios moleculares, uma vez que é mais sensível que a microscopia e os RDTs, além de ser de fácil execução quando comparado aos ensaios de *nested* PCR ou mesmo qPCR (Barazorda et al., 2020).

A OMS preconiza que protocolos moleculares, para serem vantajosos com relação à microscopia, devem apresentar LoD mínimo de 2 parasitos/μL (WHO, 2014). O teste Alethia® Malaria LAMP (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH) constitui-se de protocolo molecular para detecção de gênero *Plasmodium*, baseado na mudança da turbidez na reação devido ao acúmulo de pirofosfato de magnésio, medido de forma qualitativa pelo

equipamento de leitura. O teste dispensa os passos de extração de DNA e a amplificação se dá em 40 minutos. A avaliação desta plataforma mostrou LoD de 2 parasitos/ μ L para *P. falciparum* e de 0,125 parasito/ μ L para *P. vivax* (Lucchi et al., 2016a). Vários estudos têm sido conduzidos utilizando LAMP como *point-of-care* para detecção de baixas parasitemias, principalmente em protocolos que utilizam como alvo genes mitocondriais. Estudos anteriores utilizando como alvo genes ribossomais mostraram uma sensibilidade de 100 parasitos/ μ L para *P. falciparum*, desempenho inferior comparado aos LoDs de protocolos com genes mitocondriais (Polley et al., 2010; Cook et al., 2015).

Ensaio colorimétrico têm sido propostos com base na plataforma LAMP, dispensando o uso de equipamentos, como o *Malachite Green LAMP* (MG LAMP), onde a amplificação de DNA é observada com base na coloração final, sendo verde azulada nos casos positivos e incolor nos negativos (Lucchi et al., 2016b). Esta técnica permite seu uso em grande número de amostras, visto que é processada em banho seco em temperatura constante. De acordo com Lucchi e colaboradores (2016b) o protocolo MG LAMP é gênero-específico e tem como alvo genes mitocondriais, apresentando um LoD de 4 parasitos/ μ L para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 8 parasitos/ μ L para *P. malariae*.

5. Infecções assintomáticas

O controle parasitário no hospedeiro se dá através da ação conjunta da resposta imunológica e do antimalárico administrado. O sistema imune não induz proteção imunológica contra reinfecções, embora realize uma interação com o parasito, produzindo uma resposta capaz de reduzir a morbidade e a mortalidade das infecções subsequentes. Tanto a imunidade inata como a adaptativa, seja pela resposta humoral ou celular, atuam na interação parasito-hospedeiro. Após a instalação da infecção no hospedeiro humano, a imunidade inata é ativada por meio de mastócitos, neutrófilos, células *natural killer* e células gama-delta. Antes da invasão das hemácias pelos parasitos não há uma resposta imune inata ou adaptativa importante. A partir do ciclo eritrocítico ocorre ativação celular, com resposta inflamatória sistêmica. Ao rompimento das hemácias infectadas, a liberação de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas induz ao quadro febril. A diversidade antigênica das proteínas expressas na superfície das hemácias infectadas impede a indução de resposta imune capaz de impedir novas infecções, porém infecções frequentes tornam o

hospedeiro semi-imune, o que contribui para o aparecimento de infecções assintomáticas, comuns em áreas endêmicas. No entanto, o diagnóstico baseado em ensaios moleculares, revelou que infecções assintomáticas também ocorrem em áreas de baixa transmissão (Okell et al, 2012; Segurado e Di Santi, 2017; Björkman, 2018).

Estudos descrevem que em ambientes de alta transmissão, com prevalência $\geq 75\%$ por microscopia, a proporção de infecções submicroscópicas pode atingir 20%. Por outro lado, em áreas de baixa transmissão, com prevalência $< 10\%$, a proporção de assintomáticos pode chegar a 70-80% (Okell et al., 2011), revisado em Bousema et al. (2014). As infecções assintomáticas se caracterizam como reservatórios invisíveis e contribuem para a transmissão da malária. Portanto, é necessário aplicar metodologias de diagnóstico ultrasensíveis para detecção de parasitemias submicroscópicas para o enfrentamento deste tipo de infecção (Pham et al., 2018) com base nas diretrizes da OMS, que são acesso universal à prevenção, diagnóstico e tratamento (WHO, 2015).

6. Malária autóctone na Mata Atlântica

No Brasil, a maioria dos casos notificados de malária se concentram na região Amazônica, porém casos residuais também são notificados fora dessa área. A região extra-amazônica, em todo a sua costa, apresenta um ecossistema próprio e coberto pela Mata Atlântica (Rezende et al., 2009). Nesta área a malária autóctone é conhecida como “malária bromélia” (Downs & Pittendrigh 1946; Rezende et al., 2009) e apresenta uma incidência muito baixa em vários estados ao longo do litoral atlântico.

Sabe-se que na região extra-amazônica a maioria dos casos de malária notificados são importados dos estados da área endêmica e países da África. Já os casos autóctones são esporádicos e restritos a áreas cobertas por Mata Atlântica, que estão relacionadas com a receptividade e vulnerabilidade desta área. A receptividade é mantida através da presença do vetor, da sua densidade e longevidade; a vulnerabilidade acontece com a entrada de indivíduos portadores de *Plasmodium* procedentes de regiões endêmicas. Consequentemente, por não haver um controle eficaz desses dois fatores sobre essa área é possível que haja a reintrodução da malária, além da possibilidade de ocorrência de surtos nesta região.

Embora o diagnóstico pela gota espessa em áreas com baixa endemicidade, como é o caso da região de Mata Atlântica, possa detectar baixas parasitemias em pacientes sintomáticos, sabe-se que a técnica apresenta pouca sensibilidade para detecção de casos assintomáticos, com parasitemias submicroscópicas, sendo necessário o uso de métodos moleculares mais sensíveis (de Alencar et al., 2017). Em área de Mata Atlântica, os casos notificados apresentam poucos sintomas clínicos e estão sobretudo relacionados ao *P. vivax* (Pina-Costa et al., 2014). Há também a participação de indivíduos assintomáticos e primatas não humanos na manutenção do ciclo de transmissão local, caracterizando então uma zoonose (Buery et al., 2017).

As características do bioma dessa área, como a grande densidade de bromélias, as altas temperaturas e a elevada umidade, são importantes para a proliferação do mosquito *Anopheles* (Pina-Costa et al., 2014). Os principais vetores encontrados nessa região são do subgênero *Kerteszia*, principalmente *Anopheles (Kerteszia) cruzii* (Figura 11), associado à transmissão da malária devido à presença de bromélias que servem como criadouros, ao comportamento acrodendrofílico e a dispersão vertical (Deane, 1992), esquematizado na Figura 12. De acordo com Laporta e colaboradores (2011) a presença desses vetores é bem ampla no Vale do Ribeira, sendo *An. (K.) cruzii* presente nas encostas florestais da Serra do Mar e *An. (K.) bellator* na região litorânea.



Figura 11. Mosquito transmissor da malária humana e símia em região de Mata Atlântica, *Anopheles (Kerteszia) cruzii*. Foto de Genilton Vieira

Fonte: Pina-Costa et al., 2014.



Figura 12. Esquema do comportamento alimentar de *An. (K.) cruzii* que ocorre tanto nas copas das árvores como próximo ao solo, favorecendo a transmissão do *Plasmodium* em primatas não humanos e humanos em locais próximos a fragmentos de florestas

Fonte: Pina-Costa et al., 2014.

O caráter zoonótico da malária nessa região é corroborado pela detecção de duas espécies de *Plasmodium* associados à malária simiana, *P. brasilianum* e *P. simium*. Estes parasitos podem infectar naturalmente macacos das famílias Atelidae e Cebidae. Casos autóctones dessa área relacionados à transmissão dentro da floresta, por *P. vivax* e *P. malariae*, podem ser resultado da transmissão de primatas não humanos infectados, caracterizando a malária zoonótica (Ribeiro et al., 2021). *P. simium* e *P. brasilianum* são semelhantes em nível morfológico, genético e imunológico com *P. vivax* e *P. malariae* humanos, respectivamente (Escalante et al., 1995; Yamasaki et al., 2011; Hristov et al., 2014).

7. Malária zoonótica envolvendo primatas não humanos

Além do homem, outros vertebrados podem ser infectados por diferentes espécies de *Plasmodium*, incluindo lagartos, pássaros, roedores, primatas não humanos e outros mamíferos. Estes parasitos podem ser específicos para uma espécie ou para mais de um hospedeiro, no entanto a maioria das informações biológicas a respeito dessa malária em outros animais é baseada em modelos experimentais (Perkins et al., 2007). São descritas

172 espécies de *Plasmodium* que infectam aves, répteis, roedores e primatas (Leclerc et al., 2004).

Atualmente, são conhecidas 22 espécies de *Plasmodium* que infectam primatas não humanos (Leclerc et al., 2004): duas espécies que infectam macacos do Novo Mundo da família Cebidae (*P. brasilianum* e *P. simium*), 11 que ocorrem em macacos do Velho Mundo da família Cercopithecidae (*P. knowlesi*, *P. cynomolgi*, *P. coatneyi*, *P. fieldi*, *P. fragile*, *P. gonderi*, *P. georgesii*, *P. inui*, *P. petersi*, *P. shortti* e *P. simiovale*), quatro em gibões da família Hylobatidae do Sudeste Asiático (*P. youngi*, *P. eylesi*, *P. hylobati*, *P. jefferyi*,) e cinco encontradas nos grandes símios como chimpanzé-comum e gorila-do-ocidente localizados na África Ocidental e Central (*P. reichenowi*, *P. rodhaini*, *P. schwetzi*) e orangotango-de-bornéu no sul da Ásia (*P. pitheci* e *P. silvaticum*).

O *P. knowlesi*, encontrado no Sudeste Asiático, atualmente é reconhecido como a quinta espécie de *Plasmodium* que causa a malária em humanos, no entanto essa espécie é adaptada ao macaco do Velho Mundo causando um parasitismo crônico de baixo nível nos hospedeiros naturais. Inicialmente, sabia-se que o *P. knowlesi* podia infectar humanos através de estudos experimentais e de terapêuticas com cepas adaptadas em laboratório. Em 1965, foi relatada uma infecção adquirida naturalmente em um viajante que esteve em área de floresta na região peninsular da Malásia (Cox-Singh, 2012). Além de *P. knowlesi*, há outras espécies de *Plasmodium* que infectam primatas não humanos e podem ser transmitidas ao homem, como *P. brasilianum* e *P. simium* presente nas Américas, e *P. cynomolgi* na Ásia (de Alvarenga et al., 2018).

Desta forma, a malária zoonótica é um grande desafio para a eliminação da malária, pois a presença de primatas não humanos em regiões com transmissão pode ser uma barreira, uma vez que eles podem atuar como reservatórios naturais para o parasito. Além disso, a semelhança genética entre *P. vivax* e *P. simium* e entre *P. malariae* e *P. brasilianum* reforça a possibilidade de uma zoonose (de Alencar et al., 2017). Portanto, a malária zoonótica e as implicações epidemiológicas da doença em humanos pode esclarecer os focos de casos autóctones de malária em áreas de Mata Atlântica (Cerutti et al., 2007; Duarte et al., 2008).

8. Transmissão da malária por transfusão sanguínea (TTS)

Os casos assintomáticos impactam não somente na transmissão vetorial, mas também nas infecções induzidas por transfusão sanguínea. Todas as cinco espécies de *Plasmodium* que causam a malária humana já foram relacionadas a eventos TTS (Sawyer et al., 1977; Scuracchio et al., 2011; Anthony et al., 2013; Bird et al., 2016; Zhang et al., 2020). Além disso, todas as espécies de *Plasmodium* são capazes de sobreviver no sangue armazenado por dias ou mesmo semanas a temperaturas de 2°C a 6°C. Os parasitos são transmitidos por hemácias infectadas, no entanto também podem transmitir a malária através da contaminação de plaquetas e leucócitos com eritrócitos residuais infectados (Sazama, 1991). A infecção adquirida de forma natural permite a ativação tanto das células da imunidade inata como da adaptativa na interação parasito-hospedeiro. Já a TTS transfere diretamente os parasitos na corrente sanguínea do receptor, desencadeando complicações de alto risco que podem levar a infecções fatais se não forem reconhecidas e tratadas rapidamente (Kirchgatter et al., 2005; Vareil et al., 2011; Verra et al., 2018).

A OMS recomenda que toda doação de sangue seja triada para malária, mas a falta de consenso sobre qual teste utilizar fragiliza esta normatização. Owusu-Ofori e colaboradores (2013) abordaram este tema em Gana e observaram que a PCR apresentou a maior sensibilidade (93,4%), comparada com a microscopia (23,7%). Em regiões não endêmicas o risco também foi observado em candidatos a doação de sangue assintomáticos com parasitemias submicroscópicas detectadas por qPCR (3,3%). Além disso, a alta prevalência de anticorpos antiplasmodiais, com 42,9% de positividade para ELISA-IgG anti *P. vivax* (*Pv-MSP-1*₁₉) e 15,4% para IFI (imunofluorescência indireta) para *P. malariae*, revelou a exposição a antígenos parasitários (Lima et al., 2018).

A necessidade de testes sensíveis para detecção de *Plasmodium* também foi observada em relato de TTS por *P. vivax* na Espanha: um doador foi diagnosticado com malária em novembro de 2011, 11 meses após viagem a Honduras em dezembro de 2010. Em julho de 2011 foi aceito como doador, visto que havia cumprido os seis meses de exclusão após o deslocamento para área de malária e apresentou testes sorológicos negativos. Anticorpos contra a fase sanguínea não foram detectados, provavelmente porque os parasitos permaneceram latentes no fígado na forma de hipnozoítos, com poucas formas na corrente circulatória com capacidade de induzir a resposta imune (Rubio et al.,

2016). O período de seis meses pode não ser suficiente para casos de infecções assintomáticas, que podem persistir por longos períodos (O'Brien et al., 2015).

A legislação brasileira estabelece critérios para triagem de doadores com relação à malária, tendo como referência a IPA do município. A Portaria Nº 158, de 04/02/2016 (Brasil, 2016) estabelece que:

- Em áreas endêmicas de malária, considera-se inapto o candidato que tenha tido malária nos 12 meses que antecedem a doação, com febre ou suspeita de malária nos últimos 30 dias, ou que tenha se deslocado ou que seja procedente de área de alto risco (IPA maior que 49,9) há menos de 30 dias;

- Em áreas não endêmicas de malária, considera-se inapto o candidato que tenha se deslocado ou que seja procedente de municípios de áreas endêmicas há menos de 30 dias; após este período, até 12 meses do deslocamento, será considerado apto se apresentar testes de detecção do plasmódio ou de antígenos plasmodiais negativos; também será considerado apto após 12 meses do deslocamento, sem necessidade de realização de testes de detecção ou após 12 meses se tiver apresentado malária e comprovado a cura.

*- Independentemente da endemicidade da área, será considerado inapto definitivo o candidato que teve infecção por *P. malariae*.*

Desta forma, são necessárias estratégias de diagnóstico para triagem de doadores com deslocamento por áreas de transmissão para detectar portadores assintomáticos e reduzir o risco de TTS.

9. Transmissão por transplante de órgãos ou tecidos

As infecções assintomáticas também podem significar risco para as práticas de transplante de órgãos e tecidos, quando doadores, mesmo sem sintomas clínicos de malária, tenham história progressiva da infecção ou deslocamentos por regiões endêmicas. Com relação aos receptores, a necessidade de imunossupressão pós-transplante pode acarretar o ressurgimento da doença em indivíduos portando o parasito de forma assintomática. Este risco foi reportado por Inoue e colaboradores (2010), reforçando a importância do monitoramento durante todo o processo de transplante. Neste evento, o doador de medula para um receptor com leucemia linfóide aguda, foi diagnosticado com *P.*

vivax antes do procedimento de doação, tendo sido tratado e apresentado exames de verificação de cura negativos. Após o transplante o doador apresentou recaída da infecção por *P. vivax*, detectada por PCR 20 dias após a doação e por gota espessa somente após 26 dias, o que motivou o monitoramento de ambos até 74 dias.

Com relação a órgãos sólidos, um relato de transmissão via transplante para dois receptores de um mesmo doador foi apresentado por Martín-Dávila e colaboradores (2018). Um dos receptores recebeu um rim e após 30 dias cursou com febre e calafrios e presença de *Plasmodium* no sangue periférico na lâmina de hemograma, porém com RDT negativo (SD BIOLINE Malaria Ag Pf/Pv) para *P. falciparum* e *P. vivax*. A PCR confirmou infecção por *P. malariae* e *P. ovale curtisi*. A doadora era proveniente da Guiné Equatorial, com GE e RDT negativos, não tendo sido solicitada PCR. Após a constatação da infecção no receptor, outros dois receptores (um segundo receptor renal e um receptor do fígado) foram testados por GE e RDT, ambos negativos e assintomáticos. A PCR resultou negativa para o receptor renal, porém positiva para *P. malariae* e *P. ovale curtisi* no receptor do fígado. Estes casos confirmam a importância de buscar protocolos com alta sensibilidade e aplicabilidade em pacientes e doadores com risco epidemiológico.

Dados de 2015 mostraram que a Região Amazônica, responsável por 99,8% dos casos de malária no Brasil, representou apenas 2% do suprimento de órgãos e práticas de transplante (ABTO, 2015). Malária pós-transplante raramente é reportada em áreas endêmicas, onde poucos transplantes são realizados (Pierrotti et al., 2018). No entanto, de acordo com o Registro Brasileiro de Transplantes da Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (RBT- ABTO), a Região Norte foi a que mais cresceu em número de doadores (25,6%) no primeiro trimestre de 2018, alcançando 4,9 doadores pmp (por milhão de população). Desde 2011 há procura de doadores em Rondônia e, em 2019, este estado superou a meta prevista de 10 pmp com 13,7 pmp de doadores efetivos. Em 2018, Roraima (15,3 pmp) e Tocantins (2,6 pmp) apresentaram pela primeira vez doadores efetivos (ABTO, 2018; ABTO, 2019). Em 2021, o Amazonas apresentou 28,3 pmp de notificações de doadores potenciais e 4,5 pmp de doadores efetivos (ABTO, 2021). Esses dados confirmam a importância da realização de exames altamente sensíveis pré e pós-transplante para a detecção de *Plasmodium* em órgãos ou tecidos de doadores e receptores, principalmente quando estes tenham histórico de infecção, forem residentes ou com deslocamentos por regiões endêmicas.

Os programas de controle da malária baseiam-se na integração entre diagnóstico precoce, tratamento rápido e específico e controle vetorial. Se por um lado, os desafios relacionados ao tratamento e controle vetorial se impõem em função da resistência de parasitos e vetores aos antimaláricos e inseticidas respectivamente, o diagnóstico laboratorial encontra também dificuldades com relação a sensibilidade e especificidade. Na rotina dos programas de controle a gota espessa e os RDTs são eleitos como alternativa possível de ser aplicada em campo e em áreas remotas. Porém, é certo que os dois métodos não se aplicam a infecções com baixas parasitemias, muitas vezes assintomáticas. Para dar suporte a este segmento, onde se encontram os indivíduos assintomáticos com parasitemias submicroscópicas que mantêm a transmissão, os candidatos a doadores de sangue e de órgãos e tecidos para transplantes, ou ainda receptores imunossuprimidos com história pregressa de malária ou deslocamentos por áreas endêmicas, é fundamental validar protocolos moleculares com robustez para o diagnóstico acurado. As técnicas disponíveis para detecção de infecções submicroscópicas, como qPCR e *nested* PCR, por sua complexidade na execução e por exigirem equipamentos sofisticados, não se aplicam ao diagnóstico de malária em segmentos da saúde de modo geral, mas apenas em centros de referência. Para superar estas dificuldades, é necessário validar protocolos *point-of-care*, com alta performance na detecção molecular de *Plasmodium*, capazes de ser implantados em serviços especializados como bancos de sangue e unidades de transplantes, bem como em atividades de vigilância epidemiológica desenvolvidas no campo.

OBJETIVOS

1. Geral

Avaliar a aplicabilidade dos ensaios moleculares *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) Alethia® Malaria LAMP e Malachite Green LAMP em comparação com a técnica de qPCR, para detecção de infecções assintomáticas por *Plasmodium* em amostras de candidatos a doadores de sangue e em doadores/receptores de órgãos ou tecidos para transplantes.

2. Específicos

1. Realizar qPCR para detecção de *Plasmodium* em candidatos a doadores de sangue, de acordo com as diretrizes para triagem em bancos de sangue, em região endêmica e não endêmica para malária.
2. Realizar qPCR para detecção de *Plasmodium* em doadores e/ou receptores de órgãos e/ou tecidos para transplantes, residentes ou com deslocamentos por áreas endêmicas para malária;
3. Realizar ensaios com o Alethia® Malaria LAMP para detecção de *Plasmodium* em candidatos a doadores de sangue, de acordo com as diretrizes para triagem em bancos de sangue, em região endêmica e não endêmica para malária;
4. Realizar ensaios com o Alethia® Malaria LAMP para detecção de *Plasmodium* em doadores e/ou receptores de órgãos e/ou tecidos para transplantes, residentes ou com deslocamentos por áreas endêmicas para malária;
5. Realizar ensaios com Malachite Green LAMP para detecção de *Plasmodium* em candidatos a doadores de sangue, de acordo com as diretrizes para triagem em bancos de sangue, em região endêmica e não endêmica para malária;
6. Realizar ensaios com Malachite Green LAMP para detecção de *Plasmodium* em doadores e/ou receptores de órgãos e/ou tecidos para transplantes, residentes ou com deslocamentos por áreas endêmicas para malária;
7. Realizar *nested* PCR para determinação das espécies nas amostras positivas para *Plasmodium*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Desenho do estudo

Trata-se de estudo analítico observacional transversal aplicado a candidatos a doadores de sangue em serviços de hemoterapia e a doadores e/ou receptores de órgãos ou tecidos para transplantes, utilizando diferentes metodologias moleculares.

2. Coleta de amostras

As amostras foram coletadas de candidatos a doadores de sangue em serviços de hemoterapia e de doadores e/ou receptores de órgãos ou tecidos para transplantes, após assinatura pelo candidato do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo I). Além deste documento, foi preenchida uma Ficha de Coleta (Anexo II) com as informações demográficas e com os deslocamentos realizados pelo candidato nos últimos cinco anos. Foram coletados 5 mL de sangue venoso periférico em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Aproximadamente 50 µL foram utilizados para preparar as gotas espessas e 50 µL para realizar o teste Alethia® Malaria LAMP. O restante foi centrifugado a 1500 rpm por 6 min para separação do concentrado de hemácias e do plasma, para utilização nos ensaios moleculares e no teste imunoenzimático (ELISA). O material foi armazenado em microtubos à -20°C até o momento do uso.

3. Coleta de amostras em bancos de sangue

Foram eleitos bancos de sangue de região não endêmica e endêmica para malária, conforme descrito a seguir. No estado de São Paulo foram realizadas coletas na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo localizada na capital e no Hemonúcleo de Santos. Na região endêmica as coletas foram realizadas no Hemoacre, localizado em Rio Branco, conforme representado na Figura 13. A amostragem proposta para o estudo é descrita abaixo.

Região não endêmica para malária

- Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPSH/SP)

- 250 amostras de sangue de candidatos a doadores moradores ou com deslocamentos para municípios localizados em Bioma de Mata Atlântica;

- 250 amostras de candidatos a doadores com deslocamentos para municípios de área endêmica, com indicação de realização de testes para detecção de *Plasmodium*, de acordo com a regulamentação brasileira (Brasil, 2016).

- Hemonúcleo de Santos

- 150 amostras de sangue de candidatos a doadores moradores ou com deslocamentos para municípios localizados em Bioma de Mata Atlântica;

- 150 amostras de candidatos a doadores com deslocamentos para municípios de área endêmica, com indicação de realização de testes para detecção de *Plasmodium*, de acordo com a regulamentação brasileira (Brasil, 2016).

Devido a pandemia de Covid-19 o número de doadores diminuiu consideravelmente, impactando na obtenção do número de amostras dos candidatos a doadores com deslocamentos para áreas endêmicas, face às restrições de viagens para outros estados ou países. Além disso, os protocolos estabelecidos para que as coletas ocorressem em segurança, como coletas com agendamento de horário, contribuíram para a diminuição do número de doadores. Desta forma, o número de amostras coletadas foi:

- Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo

- 251 amostras de sangue de candidatos a doadores moradores ou com deslocamentos para municípios localizados em Bioma de Mata Atlântica;

- 117 amostras de candidatos a doadores com deslocamentos para municípios de área endêmica, com indicação de realização de testes para detecção de *Plasmodium*.

- Hemonúcleo de Santos

- 181 amostras de sangue de candidatos a doadores moradores ou com deslocamentos para municípios localizados em Bioma de Mata Atlântica;

- Sete amostras de candidatos a doadores com deslocamentos para municípios de área endêmica, com indicação de realização de testes para detecção de *Plasmodium*.

Região endêmica para malária

- Hemoacre em Rio Branco/Acre

- 501 amostras de candidatos a doadores com resultado negativo no teste para detecção de *Plasmodium*, de acordo com a regulamentação brasileira (Brasil, 2016).



Figura 13. Mapa do Brasil com identificação das regiões endêmica e não endêmica para malária, com a localização dos bancos de sangue participantes do estudo

4. Coleta de amostras de doadores e/ou receptores de órgãos ou tecidos para transplante

Os locais eleitos para as coletas foram o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Grupo de Infecção em Pacientes Imunodeprimidos) e o Hospital Amaral Carvalho de Jaú, SP.

No desenho do estudo foi estabelecido que as amostras de sangue de doadores e/ou receptores de órgãos ou tecidos para transplantes de moradores ou com deslocamentos por áreas endêmicas de malária seriam coletadas com base em amostragem de conveniência.

Considerando os três bancos de sangue foram coletadas 1057 amostras de candidatos a doação de sangue. Três amostras foram desprezadas por coleta inadequada, totalizando 1054 amostras distribuídas conforme fluxograma na Figura 14.

As técnicas de microscopia e qPCR foram realizadas em todas as amostras (n=1054). Para o teste Alethia[®] Malaria LAMP foi elaborado um arranjo em *pool* de duas amostras (n=527). Malachite Green LAMP é um protocolo instituído por pesquisadores do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em Atlanta, GA, Estados Unidos. Na elaboração deste estudo foi estabelecida uma parceria com o CDC para analisar as amostras com essa metodologia. No entanto, com o fechamento das fronteiras e aeroportos devido a pandemia de COVID-19 não foi possível analisar as amostras no CDC. Como alternativa, o protocolo foi compartilhado e os ensaios foram realizados no Brasil. Com os atrasos na importação de insumos laboratoriais devido a pandemia de COVID-19 só foi possível iniciar os ensaios em junho de 2022. Por este motivo, optou-se por realizar o ensaio de MG LAMP em amostras sorteadas pelo programa Microsoft[®] Excel[®] 2016. O algoritmo para o sorteio considerou 10% das amostras negativas nos demais testes, para cada posto de coleta. Além disso, foram ensaiadas todas as amostras positivas em qualquer teste molecular e GE, totalizando 180 amostras.

Adicionalmente aos objetivos propostos para este estudo foram realizadas análises sorológicas utilizando o teste imunoenzimático (ELISA) para avaliar a exposição a antígenos parasitários, sendo analisadas as mesmas 180 amostras ensaiadas no MG LAMP. ELISA foi realizado com antígenos recombinantes de *P. vivax* e *P. malariae* para as 180 amostras e de *P. falciparum* somente para as amostras selecionadas do Hemoacre (n=87).

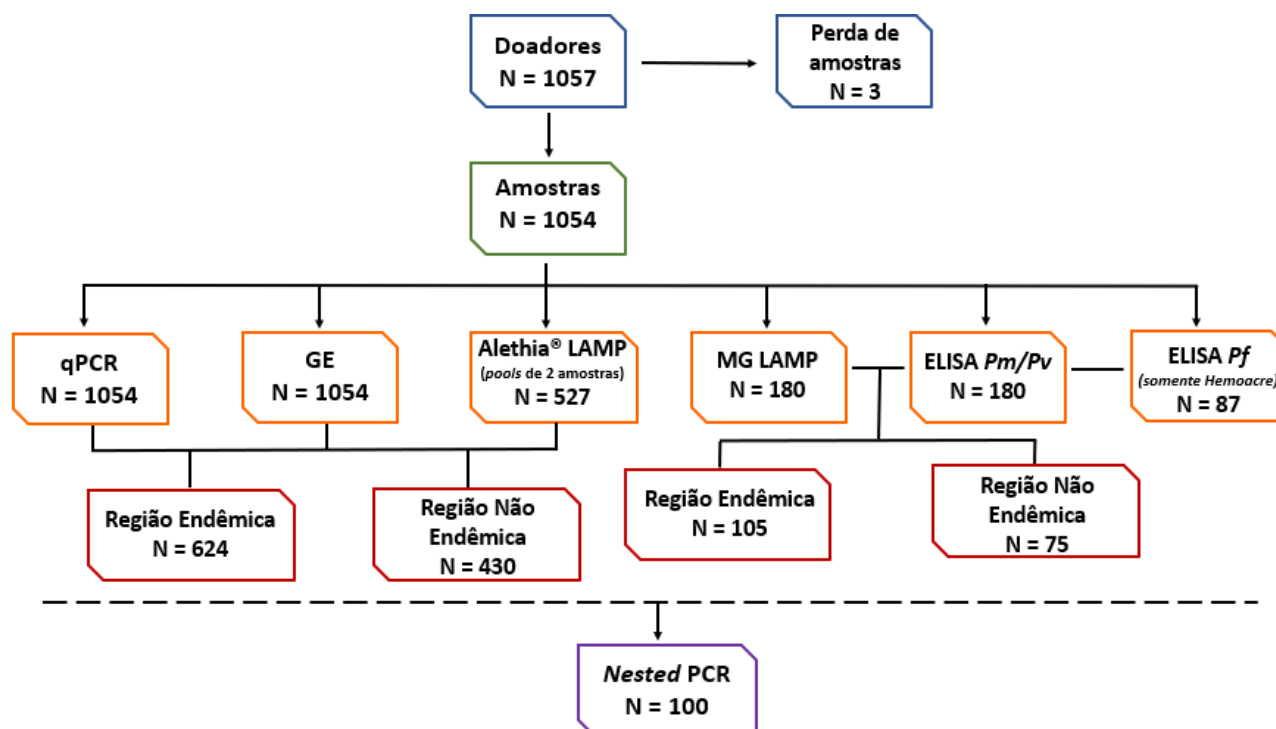


Figura 14. Fluxograma do estudo, apresentando o número total de amostras ensaiadas em cada protocolo. Para as técnicas de qPCR, GE e Alethia LAMP foram ensaiadas todas as amostras coletadas (n=1054), porém para o LAMP as reações foram realizadas em *pools* de duas amostras. Para o ensaio de MG LAMP foram sorteadas 10% das amostras negativas nos demais testes, para cada posto de coleta. Além disso, foram ensaiadas todas as amostras positivas em qualquer teste molecular e GE, totalizando 180 amostras. Essas mesmas amostras foram ensaiadas por ELISA *Pm/Pv*. ELISA *Pf* somente foi realizado com as amostras coletadas em área endêmica (n=87).

GE = gota espessa
MG = Malachite Green

5. Diagnóstico por gota espessa (GE)

A GE foi preparada com 25 µL de sangue periférico que foi depositado em dois pontos da lâmina histológica; após o preparo o material foi seco em um aquecedor de lâminas (Fisher Scientific Slide Warmer/Pittsburgh, PA). Em seguida, a lâmina foi mergulhada por 10 segundos em solução do corante azul de metileno fosfatado para a desmoglobinização/pré-coloração e corada com Giemsa para completar a coloração do

parasito. Após esse processo, todas as lâminas foram examinadas em objetiva de imersão 100x, em microscópio óptico.

6. Controles positivos e negativos para os testes moleculares

Para o protocolo de qPCR foram utilizadas amostras de *P. falciparum* de cultura, com parasitemias exatas calculadas com estágios em trofozoítos, para realização de curva padrão (Figura 15). Amostras das cinco espécies de *Plasmodium* que causam infecção humana, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, provenientes do painel de controle de qualidade da OMS (*WHO Global Malaria Programme external quality assessment scheme*), foram utilizadas como controles positivos para o *nested* PCR. Como controles negativos foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos sem deslocamento para áreas de malária, com resultado negativo para GE e qPCR.

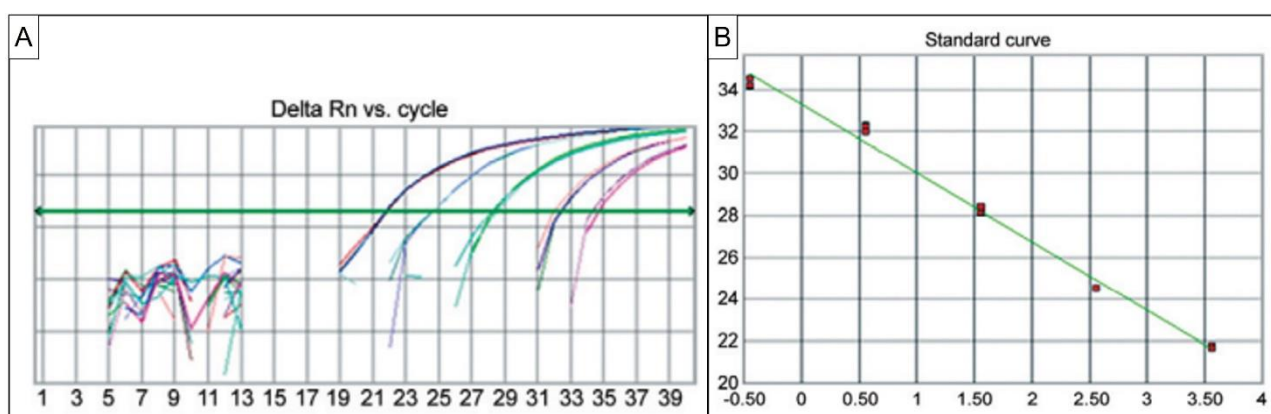


Figura 15. **A:** Amplificação da qPCR dos controles positivos de cultura de *P. falciparum* com diluições seriadas com parasitemias de 3.600 a 0,36 parasitos/ μ L e os valores do *Cycle threshold* (*Ct*) variando entre 21,7-34,3; **B:** Curva padrão mostrando o logaritmo da quantidade inicial do parasito (eixo x) em relação ao *Ct* (eixo y) com coeficiente de determinação (R^2) de 0,99 e inclinação -3,2

Nos ensaios do Alethia[®] Malaria LAMP foram utilizadas amostras de *P. falciparum* e *P. vivax*, com parasitemias representativas dos LoDs do teste, de 2 parasitos/ μ L e 0,125 parasito/ μ L, respectivamente. Para o MG LAMP foram utilizados controles obtidos por curva

padrão realizada com amostra de *P. falciparum* de cultura, com diluições seriadas com parasitemias de 38.162 parasitos/ μ L a 2,3 parasitos/ μ L (Figura 16).

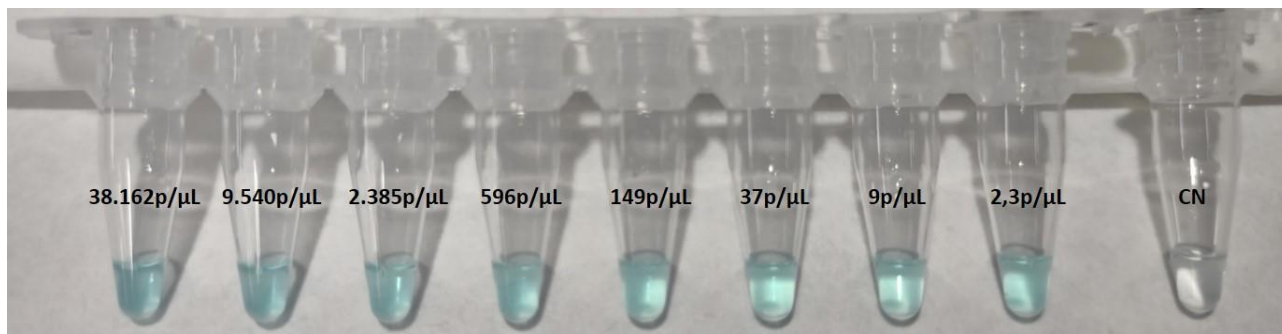


Figura 16. Curva padrão para MG LAMP com amostra de *P. falciparum* de cultura com diluições seriadas com parasitemias de 38.162 parasitos/ μ L a 2,3 parasitos/ μ L. CN: Controle negativo

7. Extração de DNA

De cada amostra de sangue foram utilizados 200 μ L para a extração do DNA genômico com QIAamp DNA Blood Mini Kit (QiAgen[®], Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído em volume final de 50 μ L e estocado a -20°C para os ensaios moleculares. Para o ensaio Alethia[®] Malaria LAMP não foi necessária a extração de DNA.

8. Análise molecular

qPCR

A técnica de qPCR para amplificação gênero-específica utilizada no estudo foi descrita por Lima et al. (2011). O protocolo utiliza os *primers* M60 e M61 além da sonda M62 marcada com FAM[™] (5-carboxifluoresceína) e TAMRA[™] (N, N, N, N-tetrameil-6-carboxirrodamina) (Applied Biosystems[™], Foster City, CA, EUA) para amplificação das sequências da subunidade ribossomal menor (*ssrRNA*) do gênero *Plasmodium* (Tabela 1).

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

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

Fonte: Lima et al., 2011.

A reação de qPCR foi preparada com 5 µL de DNA genômico adicionado a um volume de 20 µL por reação contendo 12,5µL de *TaqMan*® Universal PCR Master Mix 2x, 500 nM de cada *primer* gênero-específico M60 e M61, e 300 nM da sonda M62 marcada com FAM™ e TAMRA™. Amplificação e detecção foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 15 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras foram ensaiadas em duplicata no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EUA).

Nested PCR

O protocolo de *nested PCR* foi realizado nas amostras positivas em qualquer dos testes moleculares, na GE e nas amostras reagentes no ELISA. Essa técnica tem como alvo a amplificação de genes *ssrRNA* (Snounou et al., 1993). Na primeira reação foram utilizados os *primers* gênero-específicos rPLU6 e rPLU5, que amplificam fragmentos de 1,2Kb, e na segunda reação (*nested*) os *primers* espécie-específicos para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*, notificadas no Brasil (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência de *primers* gênero-específicos e espécie-específicos utilizados nas reações de *nested* PCR

Primers	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.

A reação foi preparada com 25 µL de volume total, sob as seguintes condições: a primeira reação com 250 nM de cada *primer* gênero-específico rPLU6 e rPLU5, 125 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3, 0,4 U de *Taq* polimerase e 2 µL de DNA genômico. A amplificação ocorreu com um ciclo inicial de denaturação a 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos, seguida de 24 ciclos a 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos, com um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos. A segunda reação seguiu o mesmo protocolo, porém com os *primers* espécie-específicos rVIV1/rVIV2, rMAL1/rMAL2 e rFAL1/rFAL2, acrescentando 2 µL do material amplificado da primeira reação. Para a segunda reação foram realizados 30 ciclos nas mesmas condições da primeira (Snounou et al., 1993). Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (2%) em tampão TBE e corados com Blue Green (LGC Biotecnologia Ltda., Cotia, SP, Brasil). Foi utilizado marcador de peso molecular 100-2000bp (Norgen Biotek Corp, Thorold, ON, Canadá).

Alethia[®] Malaria LAMP

O protocolo *Alethia*[®] Malaria LAMP (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH, EUA) foi realizado em duas etapas: a primeira etapa consistiu na preparação das amostras e a segunda na amplificação. Os kits foram gentilmente cedidos pela NL Diagnóstica, representante comercial no Brasil da Meridian Bioscience. As amostras foram agrupadas em *pools* de duas amostras, totalizando 527 *pools*. Foram transferidos 50 µL de cada uma

das amostras participantes do *pool* em um tubo limpo e o material homogeneizado em Vortex. Após a formação dos *pools*, 50 μ L da mistura foram transferidos para o tubo com tampão de lise (Buffer I), seguido de homogeneização em Vortex por 15 segundos e repouso por 2 minutos. Após este tempo, foram transferidos 50 μ L do lisado para a coluna SMP PREP IV e homogeneizados novamente em Vortex por 15 segundos. A tampa debaixo da coluna foi removida para coletar 10 gotas do filtrado dentro do tubo coletor (Tube I) limpo. Em seguida, foram transferidos 50 μ L da amostra final em duas câmaras contendo reagentes liofilizados para a reação de amplificação, com *primers* específicos para *Plasmodium* na câmara *TEST* e *primers* específicos de DNA mitocondrial humano (*housekeeping gene*) na câmara *CONTROL*. Em seguida, o dispositivo formado pelas duas câmaras foi inserido na Incubadora/Leitora Alethia™ (Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH, EUA), para amplificação a 63°C por 40 minutos (Figura 17). Todos os reagentes e suprimentos devem ser mantidos à temperatura ambiente (Lucchi et al., 2016a).

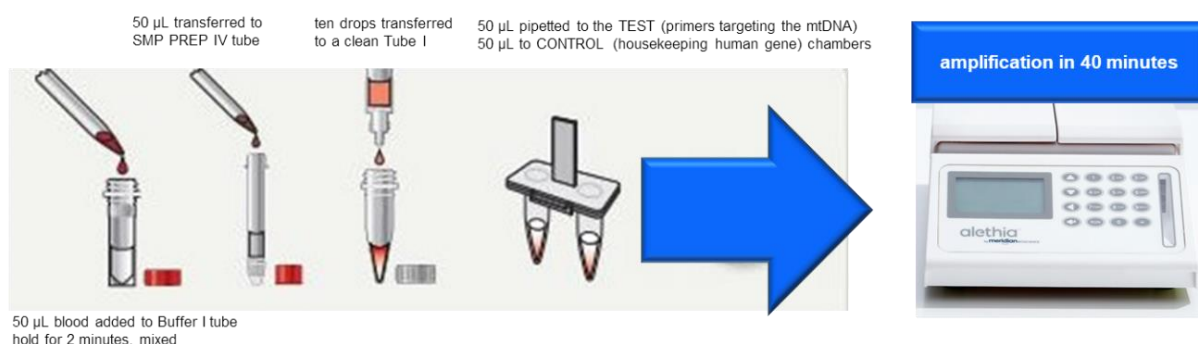


Figura 17. Esquema das etapas do Alethia® Malaria LAMP, incluindo um passo de preparação da amostra seguido de um passo de amplificação

Fonte: www.meridianbioscience.eu. Acessado em: 21/08/2020.

O resultado foi determinado qualitativamente através da presença de pirofosfato de magnésio, dado pela análise da absorbância pela Incubadora/Leitora Alethia™ através da turbidez da solução da reação. Para cada *pool* com resultado positivo foi realizada uma nova reação com as amostras individuais, para identificar a(s) amostra(s) positiva(s).

Malachite Green LAMP

O ensaio do MG LAMP foi realizado em um volume final de 20 μ L, contendo tampão 2X (40 mM Tris-HCL pH 8,8, 20 mM KCl, 16 mM MgSO₄, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2% Tween-20, 1,6 M Betaine, 2 mM de cada dNTP), 0,004% de MG, 8 unidades de *Bst* polimerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) e 5 μ L de DNA. Os *primers* tem como alvo o gene mitocondrial, específicos para o gênero *Plasmodium* (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos *primers* gênero-específicos para *Plasmodium* utilizados para a reação MG LAMP

Primers	Sequência 5' → 3'
<i>Forward</i> - PgMt19 F3	TCG CTT CTA ACG GTG AAC
<i>Reverse</i> - PgMt19 B3	AAT TGA TAG TAT CAG CTA TCC ATA G
<i>Forward</i> - PgMt19 FIP	GGT GGA ACA CAT TGT TTC ATT TGA TCT CAT TCC AAT GGA ACC TTG
<i>Reverse</i> - PgMt19 BIP	GTT TGC TTC TAA CAT TCC ACT TGC CCG TTT TGA CCG GTC ATT
<i>Forward</i> - PgMt19 LPF	CAC TAT ACC TTA CCA ATC TAT TTG AAC TTG
<i>Reverse</i> - PgMt19 LPB	TGG ACG TAA CCT CCA GGC

Fonte: Polley et al., 2010

MG = Malachite Green

A amplificação foi realizada a 63°C por 60 minutos no termociclador VeritiPro Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Após a reação, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente por 30 minutos para a leitura visual, que foi realizada sempre por 3 examinadores. As amostras positivas apresentaram coloração verde azulado devido a presença do verde de malaquita, e as negativas ficaram incolores (Lucchi et al., 2016b), conforme mostrado na Figura 18.

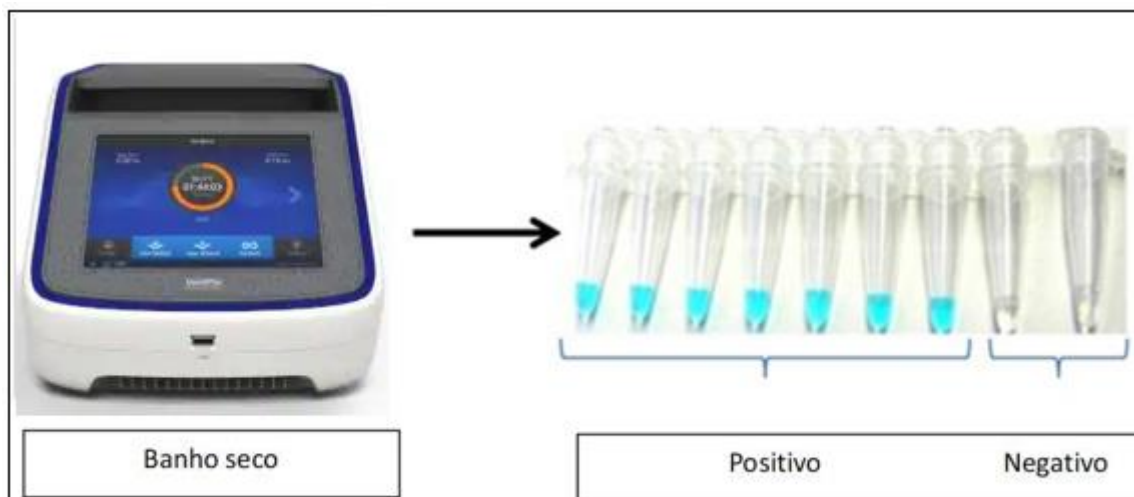


Figura 18. Esquema representativo do MG LAMP, com leitura visual dos resultados

Fonte: Lucchi et al, 2016b.
MG = Malaquite Green

9. Sorologia

Teste imunoenzimático - ELISA

As reações para detecção de anticorpos foram realizadas segundo o protocolo descrito por Sanchez (2014). Foram utilizados antígenos recombinantes para as espécies *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*, sendo His₆-Pv-MSP-1₁₉, GST-Pm-MSP-1₁₉ e GST-Pf-MSP-1₁₉, respectivamente. His₆-Pv-MSP-1₁₉ foi produzido por Arianni R. Sanchez, no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SORO/IMT/FMUSP). GST-Pm-MSP-1₁₉ e GST-Pf-MSP-1₁₉ foram produzidos por Eric Rogier (*Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Georgia, USA*). Os antígenos foram obtidos nas concentrações de 903,54 µg/mL para Pv-MSP-1₁₉, 290 µg/mL para Pm-MSP-1₁₉, e 620 µg/mL para Pf-MSP-1₁₉ e as reações foram realizadas no Laboratório SORO/IMT/FMUSP.

Para os ensaios com Pv-MSP-1₁₉ e Pm-MSP-1₁₉ foram utilizadas placas de poliestireno Costar 3690, *High Binding*, de fundo plano (Costar, Corning Incorporated, New York, EUA) e no protocolo com Pf-MSP-1₁₉ placas de poliestireno Costar 3590, *High Binding*, de fundo plano (Costar, Corning Incorporated, New York, EUA). Inicialmente, as

placas foram sensibilizadas separadamente com 50 μ L/poço de cada antígeno recombinante na concentração de 1 μ g/mL, diluído em tampão carbonato 0,05 M (pH 9,6). Após esse procedimento, as placas foram incubadas a 4°C em câmara úmida por 18 horas.

Após a incubação, as placas foram lavadas uma vez com solução de PBS 0,01 M (pH 7,2) contendo 0,05% de Tween 20 (Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) (PBS-T). Em seguida, foram bloqueadas com solução de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) a 5% em PBS-T (PBS-TL-5%), sendo 125 μ L/poço para *Pv*-MSP-1₁₉ e *Pm*-MSP-1₁₉ e 200 μ L/poço para *Pf*-MSP-1₁₉, incubadas a 37°C em câmara úmida por 2 horas, e então lavadas por três vezes com PBS-T. Após a lavagem, foram adicionados 50 μ L/poço das amostras de soro diluídas a 1/100 em leite desnatado a 5% em PBS (PBS-L-5%) em duplicata nas placas, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após a incubação, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T. Em seguida, foram adicionados 50 μ L/poço do conjugado enzimático anti-IgG humana-peroxidase (Sigma A-0170, Saint Louis, MO, EUA) diluído a 1/20.000 em PBS-L-5%, e as placas foram incubadas a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após este período, as placas foram lavadas novamente por cinco vezes com PBS-T e foi adicionada solução cromógena tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio - TMB/H₂O₂ (Novex-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), sendo 50 μ L/poço para *Pv*-MSP-1₁₉ e *Pm*-MSP-1₁₉ e 100 μ L/poço para *Pf*-MSP-1₁₉, seguindo-se incubação à temperatura ambiente por 7 minutos, ao abrigo da luz. Para interromper a reação, foram adicionados 25 μ L de H₂SO₄ 2 N por poço das placas. A leitura da reação foi realizada através da medida de absorbância em leitora de placas de ELISA (Multikan Go-Thermo Scientific, Finlândia) a 450 nm.

Os valores do *cut-off* utilizados no ensaio de ELISA com antígenos recombinantes de *Plasmodium* foram calculados através da Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Nas espécies *P. malariae* (ELISA-*Pm*) e *P. vivax* (ELISA-*Pv*) foram utilizadas 41 e 90 amostras de casos positivos, respectivamente, e 90 amostras de controle de indivíduos negativos; para *P. falciparum* (ELISA-*Pf*) foram utilizadas 46 amostras de casos positivos e 45 amostras de controle de indivíduos negativos. As curvas ROC foram construídas a partir dos valores das absorbâncias dos soros normalizadas em relação à absorbância do soro padrão positivo, que foi ensaiado em duplicata em todas as placas do teste ELISA. Portanto, para cada amostra foi calculada a “absorbância percentual do padrão positivo” (ABS%) (Fujimori et al., 2021):

$$\text{Absorbância \% do padrão positivo} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão positivo}} \times 100$$

Para calcular o índice de reatividade (IR) foram divididos os valores da “absorbância percentual do padrão positivo” de cada amostra pelo valor do *cut-off*. Para os valores de IR ≥ 1 considerou-se a amostra **reagente**, através da seguinte equação:

$$IR = \frac{\text{Absorbância \% do padrão positivo}}{\text{cut - off}}$$

10. Aspectos éticos da pesquisa

Durante todo o estudo foi garantido a preservação rigorosa do anonimato dos indivíduos envolvidos, bem como a conservação e utilização eticamente correta do material e das informações obtidas a partir dos resultados.

Todas as amostras de sangue coletadas obedeceram aos critérios estabelecidos pela resolução 466, de 12 de dezembro de 2012 e 441, de 12 de maio de 2011, do Conselho Nacional de Saúde.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - CAPPesq (Parecer 3.492.107).

11. Análise estatística

Os dados obtidos através de todos os métodos diagnósticos foram analisados utilizando os softwares MedCalc Software Ltd. (© 2022 MedCalc Software Ltd, <https://www.medcalc.org/calculator/>), GraphPad Software® (QuickCalcs) (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/confInterval1/>), R versão 4.2.1 e RStudio versão 2022.02.3. As frequências de positividade (%) e a sensibilidade foram calculadas, com

intervalos de confiança de 95% de probabilidade (IC 95%). O protocolo molecular qPCR foi considerado como teste de referência neste estudo. A comparação entre mais de duas proporções dependentes foi realizada pelo teste Q de *Cochran*, seguida do teste de McNemar pareado, considerando o valor de p ajustado, quando se detectou diferença estatisticamente significativa pelo teste Q. A comparação de duas proporções foi feita pelo teste de McNemar (amostras dependentes) e pelo teste exato de Fisher (amostras independentes). A concordância entre os testes (dois a dois) foi avaliada com índice *Kappa* (κ) (IC 95%). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de p foram menores que 0,05 ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

1. Amostras coletadas em bancos de sangue

No decorrer do estudo foram coletadas 1057 amostras, porém três foram descartadas por coleta inadequada. Assim, foram processadas 1054 amostras de doadores de sangue, sendo 365 amostras coletadas na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, 188 amostras no Hemonúcleo de Santos e 501 amostras do Hemoacre em Rio Branco – Acre, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Número de amostras processadas, apresentadas segundo o teste parasitológico, molecular ou sorológico realizado e o deslocamento para regiões endêmicas e não endêmicas

	Nº de amostras	região endêmica	região não endêmica
qPCR	1054	624	430
Alethia® LAMP	1054	624	430
MG LAMP	180	105	75
GE	1054	624	430
<i>nested</i> PCR	100	68	32
ELISA - <i>Pm</i>	180	105	75
ELISA - <i>Pv</i>	180	105	75
ELISA - <i>Pf</i>	87	87	-

MG LAMP: Malachite Green LAMP

GE: gota espessa

2. Positividade para *Plasmodium* ou para anticorpos anti-*Plasmodium* das amostras coletadas de doadores de sangue, para cada teste parasitológico, molecular ou sorológico realizado

Neste estudo a técnica de qPCR foi considerada como teste de referência para detecção de *Plasmodium*. Dentre as 1054 amostras coletadas, 56 resultaram positivas para qPCR, sendo sete com amplificação em duplicata e 49 com amplificação em simplicata, conforme o fluxograma representado na Figura 19. Do total de 1054 amostras, somente duas foram positivas para a GE. Em relação ao Alethia® LAMP, os ensaios foram realizados

em 527 *pools*, sendo obtidos 10 *pools* positivos e cinco amostras positivas individualmente, após abertura dos *pools*.

Para os ensaios de MG LAMP e ELISA foram utilizadas amostras negativas selecionadas por sorteio e as positivas em qualquer um dos testes (qPCR, Alethia® LAMP e GE), n=180. Cinco amostras foram positivas para o MG LAMP, seis positivas para ELISA-*Pm*, 13 para ELISA-*Pv* e três para ELISA-*Pf*. Para todas as amostras positivas em qualquer teste molecular utilizado neste estudo e/ou reagente no ELISA, foi realizado o *nested* PCR para a determinação das espécies. De um total de 100 amostras positivas, 11 foram positivas para *P. malariae* (Figura 19).

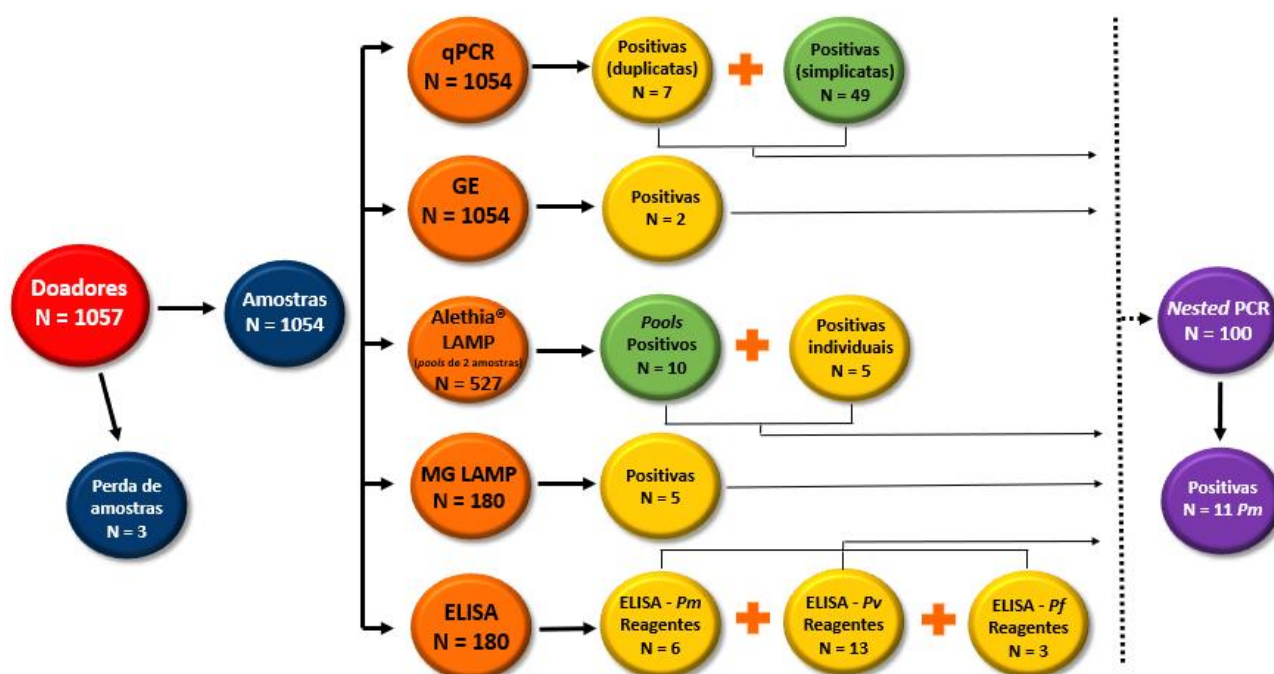


Figura 19. Fluxograma do estudo com os resultados obtidos em cada teste realizado: qPCR, gota espessa (GE), Alethia® LAMP, Malachite Green (MG) LAMP e ELISA

Considerando os testes que foram realizados com o total de amostras coletadas de doadores (n=1054), a positividade na qPCR foi de 5,3% (56/1054 [IC 95%: 4,0 - 6,9]), no Alethia® LAMP de 1,4% (15/1054 [IC 95%: 0,8 - 2,3]) e na GE de 0,2% (2/1054 [IC 95%: 0,0 - 0,7]). Para os ensaios que utilizaram as 180 amostras selecionadas, a positividade do MG LAMP foi de 2,8% (5/180 [IC 95%: 0,9 - 6,5]), no ELISA-*Pm* de 3,3% (6/180 [IC 95%:

1,2 - 7,2]), no ELISA–*Pv* DE 7,2% (13/180 [IC 95%: 3,8 - 12,3]) e no ELISA–*Pf* de 3,4% (3/87 [IC 95%: 0,7 - 10,1]), conforme Tabela 5.

Tabela 5. Positividade para *Plasmodium* ou para anticorpos anti-*Plasmodium* das amostras coletadas de doadores de sangue, para cada teste parasitológico, molecular ou sorológico realizado

	Positivo	Negativo	Positividade (%)	IC (95%)	Total
qPCR	56	998	5,3%	4,0 - 6,9	1054
Alethia® LAMP	15	1039	1,4%	0,8 - 2,3	1054
MG LAMP	5	175	2,8%	0,9 - 6,5	180
GE	2	1052	0,2%	0,0 - 0,7	1054
<i>nested</i> PCR	11	89	11%	5,5 – 19,7	100
ELISA - <i>Pm</i>	6	174	3,3%	1,2 - 7,2	180
ELISA - <i>Pv</i>	13	167	7,2%	3,8 - 12,3	180
ELISA - <i>Pf</i>	3	84	3,4%	0,7 - 10,1	87

MG LAMP: Malachite Green LAMP

GE: gota espessa

As positivities obtidas em cada banco de sangue, separando-se as amostras de acordo com o deslocamento para região endêmica e não endêmica, são apresentadas nas Tabelas 6, 7 e 8. Na FPSH/SP foram coletadas 365 amostras, sendo 116 de região endêmica e 249 de não endêmica. Para o teste de referência, qPCR, a positividade foi de 2,6% em região endêmica e de 4% em não endêmica; no Alethia® LAMP foi de 0,9% e 2,8% e na GE foi de 0,9% e 0,4%, respectivamente. Para os ensaios de MG LAMP e ELISA, o número total de amostras ensaiadas foi de 17 amostras para região endêmica e de 48 para não endêmica. Para o MG LAMP a positividade foi de 5,9% e 8,3%, respectivamente. Para o ELISA-*Pm* foi de 11,8% e 2,1% e para o ELISA-*Pv* foi de 5,9% e 4,2%, respectivamente. O *nested* PCR realizado com as amostras positivas detectou uma amostra para *P. malariae* para cada região (Tabela 6).

Tabela 6. Positividade para *Plasmodium* ou para anticorpos anti-*Plasmodium* das amostras coletadas na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (n=365) de acordo com o deslocamento para região endêmica (n=116) e não endêmica (n=249)

	Região Endêmica n=116					Região Não Endêmica n=249				
	(+)	(-)	%	IC (95%)	Total	(+)	(-)	%	IC (95%)	Total
qPCR	3	113	2,6%	0,5 - 7,5	116	10	239	4,0%	1,9 - 7,4	249
Alethia® LAMP	1	115	0,9%	0,0 - 4,8	116	7	242	2,8%	1,1 - 5,8	249
MG LAMP	1	16	5,9%	0,1 - 32,8	17	4	44	8,3%	2,3 - 21,3	48
GE	1	115	0,9%	0,0 - 4,8	116	1	248	0,4%	0,0 - 2,2	249
<i>nested</i> PCR	1	6	14,3%	0,4 - 79,6	7	1	39	2,5%	0,1 - 13,9	40
ELISA - <i>Pm</i>	2	15	11,8%	1,4 - 42,5	17	1	47	2,1%	0,0 - 11,6	48
ELISA - <i>Pv</i>	1	16	5,9%	0,1 - 32,8	17	2	46	4,2%	0,5 - 15,0	48
ELISA - <i>Pf</i>	NR	NR	NR		NR	NR	NR	NR		NR

MG LAMP: Malachite Green LAMP

GE: gota espessa

No Hemonúcleo de Santos foram coletadas 188 amostras no total, sendo sete de região endêmica e 181 de não endêmica. Todas as amostras de candidatos com deslocamentos para região endêmica foram negativas nos testes realizados no estudo. Para as amostras de candidatos com deslocamentos para região não endêmica a positividade foi de 1,7% na qPCR e no Alethia® LAMP e 3,7% no ELISA-*Pv*. Para os demais testes todas as amostras foram negativas (Tabela 7).

Tabela 7. Positividade para *Plasmodium* ou para anticorpos anti-*Plasmodium* das amostras coletadas no Hemonúcleo de Santos (n=188) de acordo com o deslocamento para região endêmica (n=7) e não endêmica (n=181)

	Região Endêmica n=7					Região Não Endêmica n=181				
	(+)	(-)	%	IC (95%)	Total	(+)	(-)	%	IC (95%)	Total
qPCR	0	7	0,0%		7	3	178	1,7%	0,3 - 4,8	181
Alethia® LAMP	0	7	0,0%		7	3	178	1,7%	0,3 - 4,8	181
MG LAMP	0	1	0,0%		1	0	27	0,0%		27
GE	0	7	0,0%		7	0	181	0,0%		181
<i>nested</i> PCR	NR	NR	NR		0	0	12	0,0%		12
ELISA - <i>Pm</i>	0	1	0,0%		1	0	27	0,0%		27
ELISA - <i>Pv</i>	0	1	0,0%		1	1	26	3,7%	0,1 - 20,6	27
ELISA - <i>Pf</i>	NR	NR	NR		NR	NR	NR	NR		NR

MG LAMP: Malachite Green LAMP

GE: gota espessa

NR: Não realizado

No Hemoacre, localizado em região endêmica para malária no Brasil, foram coletadas 501 amostras. A positividade foi de 8,0% no teste de referência, qPCR, 0,8% no Alethia® LAMP, 10,3% no ELISA-*Pv* e 3,4% no ELISA-*Pm* e no ELISA-*Pf*. Para os testes MG LAMP e GE todas as amostras foram negativas. Para as amostras positivas foi realizado o *nested* PCR para detectar as espécies e nove amostras foram positivas para *P. malariae* (Tabela 8).

Tabela 8. Positividade para *Plasmodium* ou para anticorpos anti-*Plasmodium* das amostras coletadas no Hemoacre em Rio Branco, AC (n=501)

Total n=501					
	(+)	(-)	%	IC (95%)	Total
qPCR	40	461	8,0%	5,7 - 10,9	501
Alethia® LAMP	4	497	0,8%	0,2 - 2,0	501
MG LAMP	0	87	0,0%		87
GE	0	501	0,0%		501
<i>nested</i> PCR	9	44	17,0%	7,8 - 32,2	53
ELISA - <i>Pm</i>	3	84	3,4%	0,7 - 10,1	87
ELISA - <i>Pv</i>	9	78	10,3%	4,7 - 19,6	87
ELISA - <i>Pf</i>	3	84	3,4%	0,7 - 10,1	87

MG LAMP: Malachite Green LAMP

GE: gota espessa

Considerando o número de amostras positivas em pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo em relação ao total de amostras coletadas (n=1054) a positividade foi de 7,4% (78/1054). A análise individual de cada banco de sangue revelou 9,8% de positividade (49/501) no Hemoacre, 6,0% (22/365) na FPSH/SP e 3,7% (7/188) no Hemonúcleo, conforme apresentado na Figura 20.



Figura 20. Positividade em pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo (qPCR, Alethia® LAMP, MG LAMP, GE, *nested* PCR e ELISA) em relação ao total de amostras coletadas em cada banco de sangue (Hemoacre, FPSH/SP, Hemonúcleo)

MG LAMP: Malachite Green LAMP
GE: gota espessa

Amostras positivas amplificadas em simplicata na qPCR

Com relação aos *C_t*s das 49 amostras que tiveram amplificação em simplicata, estes variaram de 37,83 a 39,98. Oito amostras foram positivas para *P. malariae* no *nested* PCR. Com relação ao teste ELISA, quatro amostras foram reagentes por ELISA-*Pv*, com variação do IR de 1,07 a 7,56; uma amostra foi reagente no ELISA-*Pv* (IR=3,67) e no ELISA-*Pm* (IR=1,63); uma para ELISA-*Pv* (IR=2,26) e ELISA-*Pf* (IR=1,28) e uma para ELISA-*Pf* (IR=3,09). Separando as amostras de doadores com deslocamento para região endêmica e não endêmica, 12/49 são de candidatos moradores ou com deslocamentos somente para

região não endêmica, sendo nove amostras coletadas na FPSH/SP e três no Hemonúcleo de Santos, com variação de *Ct* 38,54 a 39,91. Uma amostra foi reagente para ELISA-*Pv* (IR=4,07), sendo este doador morador de Juquitiba, SP. Das 37/49 amostras de candidatos com deslocamentos para região endêmica, duas foram coletadas na FPSH/SP e 35 no Hemoacre em Rio Branco, com variação de *Ct* 37,83 a 39,98. Dessas amostras, oito do Hemoacre foram positivas no *nested* PCR para *P. malariae*. Uma amostra coletada na FPSH/SP, cujo doador apresentou deslocamento para o Maranhão, foi reagente no ELISA-*Pv* (IR=3,67) e no ELISA-*Pm* (IR=1,63); uma coletada no Hemoacre foi reagente no ELISA-*Pv* (IR=2,26) e no ELISA-*Pf* (IR=1,28); três do Hemoacre foram reagentes no ELISA-*Pv* (IR=1,07, 1,18 e 7,56) e uma no ELISA-*Pf* (IR=3,09). As quatro primeiras amostras coletadas no Hemoacre são de moradores de Rio Branco (AC) e a última de Acrelândia (AC).

3. Comparação entre Alethia® LAMP e qPCR

Foram ensaiadas 1054 amostras pelas duas técnicas, e somente duas resultaram positivas em ambos os testes. A qPCR apresentou maior positividade em relação ao Alethia® LAMP (teste de McNemar: $p < 0,0001$), com baixa concordância entre os testes ($\kappa = 0,035$). Quando comparados separadamente os resultados obtidos nas duas técnicas para cada banco de sangue, nenhuma amostra colhida no Hemoacre e no Hemonúcleo de Santos foi positiva para ambas as técnicas (teste de McNemar: $p < 0,0001$) e não houve concordância entre eles ($\kappa = -0,015$ e $-0,016$, respectivamente). Já a FPSH/SP apresentou duas amostras positivas em ambos os testes e a positividade entre os resultados apresentou diferença estatística (teste de McNemar: $p < 0,0001$), com concordância mínima ($\kappa = 0,168$). Quando analisadas as amostras positivas em ambas as técnicas de acordo com os deslocamentos dos candidatos para região endêmica e não endêmica, para cada região apenas uma amostra foi positiva para os dois testes, apresentando diferença estatística (teste de McNemar: $p < 0,0001$), com concordância mínima entre os resultados ($\kappa = 0,028$ e $0,062$, respectivamente), conforme a Tabela 9.

Tabela 9. Concordância entre os resultados obtidos por qPCR e Alethia® LAMP utilizando os testes McNemar e *Kappa*

		qPCR						p McNemar	<i>Kappa</i>	IC (95%)
		(+)		(-)		Total				
		n	%	n	%	n	%			
Alethia® LAMP	(+)	2	0,2%	13	1,2%	15	1,4%	<0,0001	0,035	-0,040 - 0,109
	(-)	54	5,1%	985	93,5%	1039	98,6%			
	Total	56	5%	998	95%	1054	100,0%			
Hemoacre										
qPCR										
Alethia® LAMP	(+)	0	0,0%	4	0,8%	4	0,8%	<0,0001	-0,015	-0,028 - 0,001
	(-)	40	8,0%	457	91,2%	497	99,2%			
	Total	40	8%	461	92%	501	100,0%			
Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo										
qPCR										
Alethia® LAMP	(+)	2	0,5%	6	1,6%	8	2,2%	<0,0001	0,168	-0,061 - 0,397
	(-)	11	3,0%	346	94,8%	357	97,8%			
	Total	13	4%	352	96%	365	100,0%			
Hemonúcleo de Santos										
qPCR										
Alethia® LAMP	(+)	0	0,0%	3	1,6%	3	1,6%	<0,0001	-0,016	-0,029 - -0,003
	(-)	3	1,6%	182	96,8%	185	98,4%			
	Total	3	2%	185	98%	188	100,0%			
Região Endêmica										
qPCR										
Alethia® LAMP	(+)	1	0,2%	4	0,6%	5	0,8%	<0,0001	0,028	-0,049 - 0,104
	(-)	42	6,7%	577	92,5%	619	99,2%			
	Total	43	6,9%	581	93,1%	624	100,0%			
Região Não-Endêmica										
qPCR										
Alethia® LAMP	(+)	1	0,2%	9	2,1%	10	2,3%	<0,0001	0,062	-0,099 - 0,224
	(-)	12	2,8%	408	94,9%	420	97,7%			
	Total	13	3%	417	97%	430	100,0%			

4. Comparação entre qPCR, Alethia® e MG LAMP

Para a análise entre qPCR, Alethia® e MG LAMP, foram avaliados os resultados obtidos nas 180 amostras que incluem as negativas selecionadas por sorteio e as positivas em qualquer um dos testes (qPCR, Alethia® LAMP e GE). Duas amostras foram positivas,

com resultados coincidentes no Alethia[®], no MG LAMP e na qPCR, considerada o teste de referência. A análise da positividade dos três métodos mostrou diferença estatisticamente significativa (teste Q de Cochran: $p < 0,0001$), sendo que a qPCR apresentou maior positividade quando comparada aos dois protocolos de LAMP (teste de McNemar pareado: $p < 0,0001$) e sem concordância entre eles, com valores de *Kappa* de -0,086 entre Alethia[®] LAMP e qPCR e 0,015 entre MG LAMP e qPCR. Quando as técnicas foram comparadas de acordo com o deslocamento dos candidatos, duas amostras foram positivas no Alethia[®], no MG LAMP e na qPCR, sendo uma amostra de região endêmica e uma de não endêmica. Em relação à positividade, somente os resultados obtidos com candidatos com deslocamentos para região endêmica apresentaram diferença estatística (teste Q de Cochran: $p < 0,0001$ e teste de McNemar pareado: $p < 0,0001$), sem concordância entre os testes (*Kappa* -0,048 entre Alethia[®] LAMP e qPCR e 0,027 entre MG LAMP e qPCR). Para a região não endêmica não houve diferença estatística entre os três protocolos (teste Q de Cochran: $p = 0,0724$) e sem concordância entre os resultados (Tabela 10). Na comparação entre as técnicas de LAMP (Alethia[®] com MG LAMP) não houve diferença estatística no total de amostras (McNemar pareado: $p = 0,0124$) e nem nas amostras com deslocamento, seja para região endêmica (McNemar pareado: $p = 0,0455$) ou não endêmica (McNemar pareado: $p = 0,1250$).

Tabela 10. Concordância entre os resultados obtidos nas três técnicas (qPCR, Alethia[®] LAMP e MG LAMP) utilizando o teste Q de Cochran e comparação entres dois pares (McNemar pareado e *Kappa*)

		qPCR*						p McNemar	<i>Kappa</i>	IC (95%)
		(+)		(-)		Total				
		n	%	n	%	n	%			
Alethia [®] LAMP	(+)	2	1%	13	7%	15	8%	<0,0001	-0,086	-0,176 - 0,003
	(-)	54	30%	111	62%	165	92%			
	Total	56	31%	124	69%	180	100%			
MG LAMP	(+)	2	1%	3	2%	5	3%	<0,0001	0,015	-0,059 - 0,089
	(-)	54	30%	121	67%	175	97%			
	Total	56	31%	124	69%	180	100%			
Região Endêmica*										
		qPCR								
Alethia [®] LAMP	(+)	1	1%	4	4%	5	5%	<0,0001	-0,048	-0,135 - 0,040
	(-)	42	40%	58	55%	100	95%			
	Total	43	41%	62	59%	105	100%			
MG LAMP	(+)	1	1%	0	0%	1	1%	<0,0001	0,027	-0,026 - 0,080
	(-)	42	40%	62	59%	104	99%			
	Total	43	41%	62	59%	105	100%			
Região Não endêmica**										
		qPCR								
Alethia [®] LAMP	(+)	1	1%	9	12%	10	13%	0,5130	-0,075	-0,259 - 0,109
	(-)	12	16%	53	71%	65	87%			
	Total	13	17%	62	83%	75	100%			
MG LAMP	(+)	1	1%	3	4%	4	5%	0,0603	0,039	-0,172 - 0,251
	(-)	12	16%	59	79%	71	95%			
	Total	13	17%	62	83%	75	100%			

MG LAMP: Malachite Green LAMP

teste Q de Cochran:

* - $p < 0,0001$

** - $p = 0,0724$

5. Análises sorológicas - ELISA

Para o ensaio ELISA foram utilizadas 180 amostras negativas selecionadas por sorteio (n=96) e os casos positivos por qPCR, Alethia[®] LAMP e/ou GE (n=84). Quando comparados os resultados para ELISA entre o grupo das amostras sorteadas e o grupo das amostras positivas, não houve diferença estatística (teste exato de Fisher: $p = 0,0717$).

Também não houve diferença estatística quando a análise foi realizada separadamente para ELISA-*Pm* e ELISA-*Pv* (teste exato de Fisher: $p=0,4198$; $p=0,1469$, respectivamente), conforme descrito na Tabela 11. No entanto, quando separadas as amostras de acordo com o deslocamento dos candidatos para região endêmica e não endêmica, o ELISA total apresentou diferença entre as regiões (teste exato de Fisher: $p=0,0247$), com maior positividade na área endêmica. Para as espécies analisadas separadamente não houve diferença entre as regiões (teste exato de Fisher: $p=0,4030$ para ELISA-*Pm* e teste exato de Fisher: $p=0,2430$ para ELISA-*Pv*), conforme Tabela 11.

Tabela 11. Associação entre os resultados dos ensaios de ELISA com as amostras negativas selecionadas por sorteio ($n=96$) e os casos positivos por qPCR, Alethia® LAMP e/ou GE ($n=84$) e com as amostras dos candidatos com deslocamentos para região endêmica e não endêmica, utilizando teste exato de Fisher

	ELISA Total						p Fisher exact
	(+)		(-)		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Sorteadas	5	5,2%	91	94,8%	96	100,0%	0,07175
Positivas	11	13,1%	73	86,9%	84	100,0%	
<i>Elisa-Pm</i>							
Sorteadas	2	2,1%	94	97,9%	96	100,0%	0,4198
Positivas	4	4,8%	80	95,2%	84	100,0%	
<i>Elisa-Pv</i>							
Sorteadas	4	4,2%	92	95,8%	96	100,0%	0,1469
Positivas	9	10,7%	75	89,3%	84	100,0%	
ELISA total							
Endêmico	15	14,3%	90	85,7%	105	100,0%	0,0247
Não endêmico	3	4,0%	72	96,0%	75	100,0%	
<i>Elisa-Pm</i>							
Endêmico	5	4,8%	100	95,2%	105	100,0%	0,4030
Não endêmico	1	1,3%	74	98,7%	75	100,0%	
<i>Elisa-Pv</i>							
Endêmico	10	9,5%	95	90,5%	105	100,0%	0,2430
Não endêmico	3	4,0%	72	96,0%	75	100,0%	

GE: gota espessa

6. Resultados dos testes moleculares comparados aos testes sorológicos

Quando comparados os resultados obtidos em todos os testes moleculares realizados (qPCR, Alethia® e/ou MG LAMP) com o ensaio de ELISA realizado nas 180 amostras selecionadas, 12 amostras foram positivas nos ensaios moleculares e no ELISA, (Tabela 12), apresentando diferença estatística entre eles (teste de McNemar: $p < 0,0001$) e concordância mínima ($\kappa=0,127$). Quando os resultados foram analisados de acordo com os deslocamentos dos candidatos para área endêmica e não endêmica foi observada diferença estatística (teste de McNemar: $p < 0,0001$), porém a região endêmica apresentou 10 amostras positivas para os dois grupos de técnicas e a região não endêmica somente duas amostras positivas (Tabela 12).

Tabela 12. Concordância entre os resultados obtidos nos testes moleculares e ELISA em amostras negativas selecionadas por sorteio e os casos positivos (qPCR, Alethia® LAMP e/ou GE): análise total (n=180) e separada entre as amostras dos candidatos com deslocamentos para região endêmica (n=105) e não endêmica (n=75) utilizando os testes de McNemar e *Kappa*

		Teste molecular						<i>p</i> McNemar	Kappa	IC (95%)
		(+)		(-)		Total				
		n	%	n	%	n	%			
ELISA	(+)	12	6,7%	6	3,3%	18	10,0%	<0,0001	0,127	0,018 - 0,236
	(-)	60	33,3%	102	56,7%	162	90,0%			
	Total	72	40%	108	60%	180	100,0%			
Região Endêmica										
		Teste molecular						<0,0001	0,135	-0,012 - 0,282
		(+)		(-)		Total				
		n	%	n	%	n	%			
ELISA	(+)	10	9,5%	5	4,8%	15	14,3%	<0,0001	0,135	-0,012 - 0,282
	(-)	37	35,2%	53	50,5%	90	85,7%			
	Total	47	44,8%	58	55,2%	105	100,0%			
Região Não-Endêmica										
		Teste molecular						<0,0001	0,077	-0,067 - 0,221
		(+)		(-)		Total				
		n	%	n	%	n	%			
ELISA	(+)	2	2,7%	1	1,3%	3	4,0%	<0,0001	0,077	-0,067 - 0,221
	(-)	23	30,7%	49	65,3%	72	96,0%			
	Total	25	33%	50	67%	75	100,0%			

GE: gota espessa

7. Amostras positivas para *Plasmodium* e para anticorpos anti-*Plasmodium* de doadores de sangue, nos testes parasitológico, molecular e sorológico

Para todos os ensaios realizados, com exceção de ELISA-*Pv* e ELISA-*Pf*, duas amostras foram positivas nas técnicas moleculares gênero-específicas (qPCR, Alethia® LAMP e MG LAMP) e foram identificadas como *P. malariae* no *nested* PCR e ELISA-*Pm* com antígeno recombinante. Ambas foram coletadas na FPSH/SP, sendo uma de candidato com deslocamento para região endêmica, cujos testes apresentaram uma única estrutura sugestiva de *Plasmodium* na GE (Figura 21A) e amplificação por qPCR (Figura 21B), com valor médio de *Ct* 27,05, equivalente a 10 parasitos/ μ L de acordo com a curva padrão (10 – 100 parasitos/ μ L). Além disso, essa amostra apresentou amplificação no Alethia® LAMP em *pool* e individualmente (Figura 22A), no MG LAMP, com coloração levemente azul esverdeada (Figura 22D) e no *nested* PCR, com presença de banda na altura do peso molecular correspondente a *P. malariae*, de 144 pb (Figura 22C). Ainda, foi reagente no ELISA-*Pm* com valor de IR=8,49 (Figura 22B).

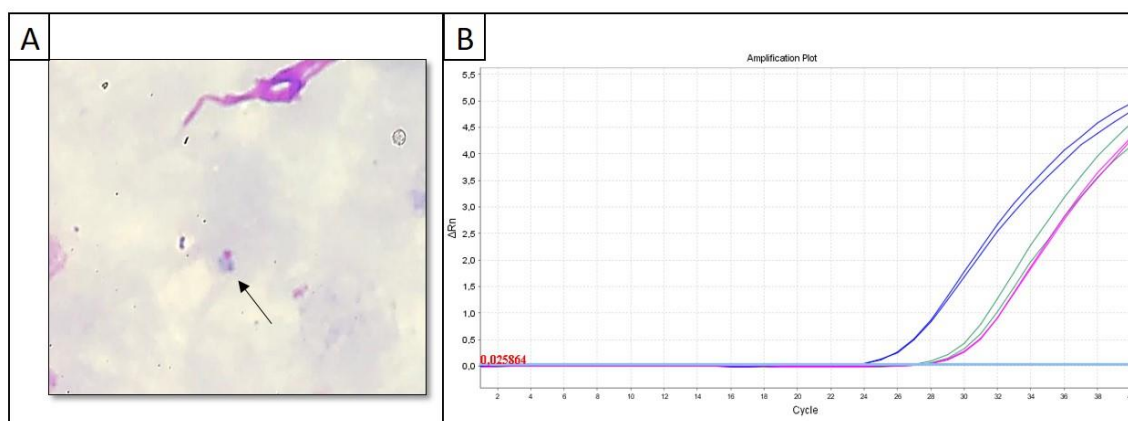


Figura 21. Caso positivo de candidato da FPSH/SP com deslocamento para área endêmica.

A: resultado da GE, mostrando estrutura semelhante a *Plasmodium*. **B:** amplificação pela qPCR, em que a curva azul é o controle positivo com 100 parasitos/ μ L, a curva verde o controle positivo com 10 parasito/ μ L e a curva rosa do doador de sangue

GE: gota espessa

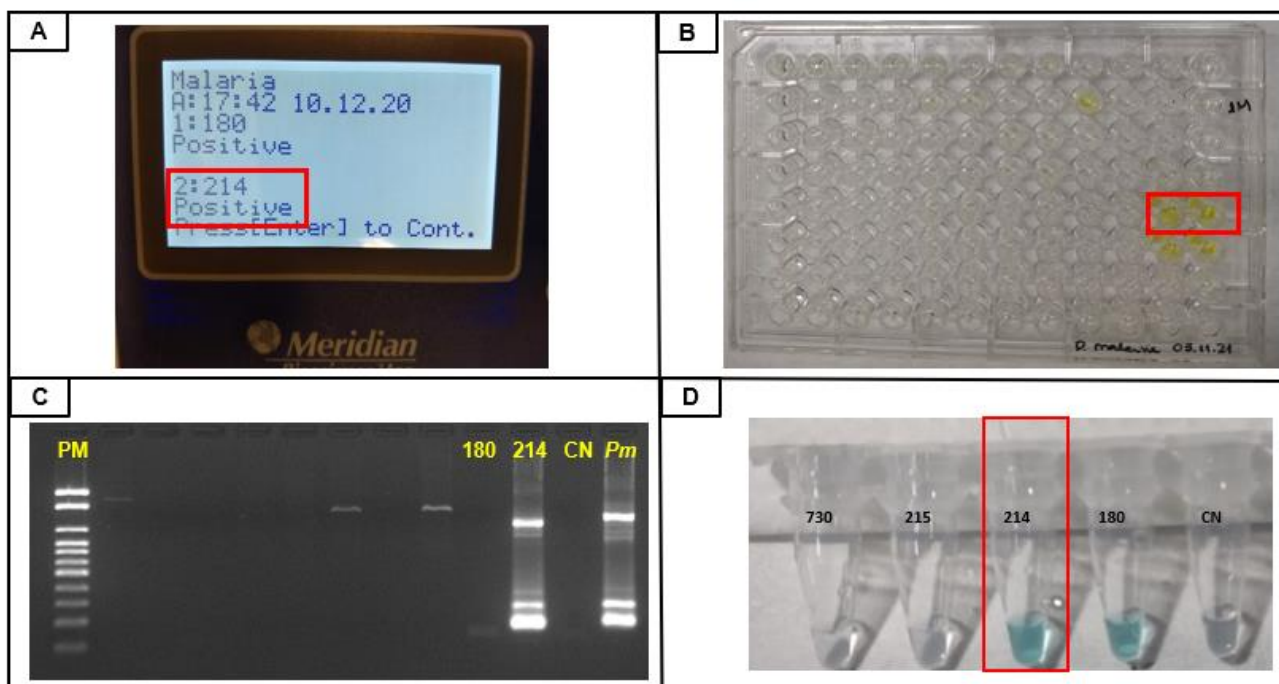


Figura 22. Caso positivo de candidato da FPSH/SP com deslocamento para área endêmica. **A:** Amplificação da amostra ensaiada individualmente no Alethia® LAMP para *Plasmodium*. **B:** ELISA reagente para *P. malariae*. **C:** Amplificação de DNA genômico por *nested* PCR, com banda de 144 pb correspondente a *P. malariae*, onde 214 = doador, CN = controle negativo e *Pm* = controle positivo para *P. malariae*. **D:** Amplificação para *Plasmodium* com coloração azul esverdeada no MG LAMP

MG LAMP: Malachite Green LAMP

A outra amostra positiva coletada na FPSH/SP foi obtida de candidato que apresentou deslocamento somente para região não endêmica para malária, em área de Mata Atlântica. A GE revelou uma única forma parasitária (Figura 23A). A qPCR amplificou em duplicata, com valor médio de *Ct* de 35,3 (Figura 23B), equivalente a 0,1 parasito/ μ L, de acordo com a curva padrão (1 – 100 parasitos/ μ L). Porém, no Alethia® LAMP apresentou amplificação somente quando ensaiada individualmente, sendo negativa em *pool* (Figura 24A). O teste MG LAMP apresentou coloração levemente azul esverdeada (Figura 24D). O *nested* PCR apresentou banda fraca na altura do peso molecular correspondente a *P. malariae*, 144 pb (Figura 24C). A sorologia foi reagente, com IR=23,37 para ELISA-*Pm* (Figura 24B) e IR=1,38 para ELISA-*Pv*.

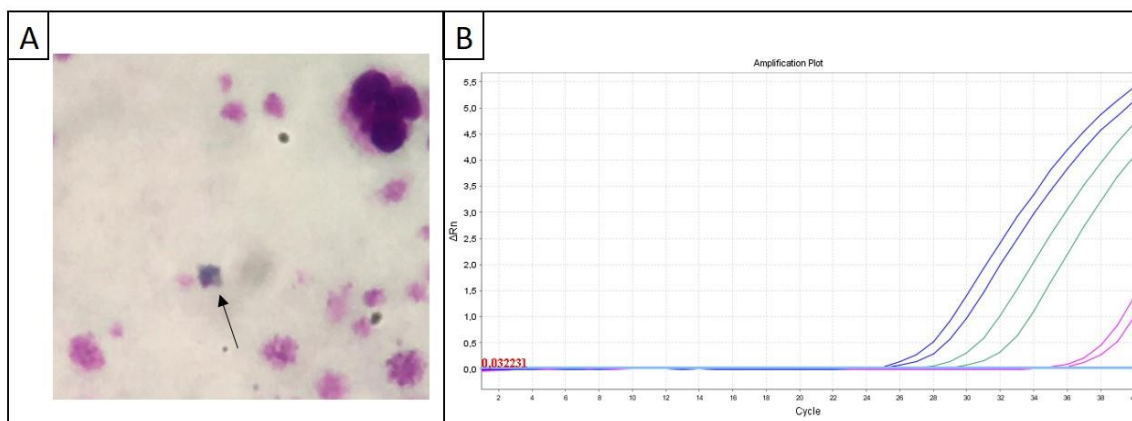


Figura 23. Caso positivo em doador da FPSH/SP com deslocamento para região de Mata Atlântica. **A**: resultado positivo da GE. **B**: amplificação pela qPCR, onde a curva azul é o controle positivo com 100 parasitos/ μL , curva verde o controle positivo com 1 parasito/ μL e curva rosa do doador de sangue

GE: gota espessa

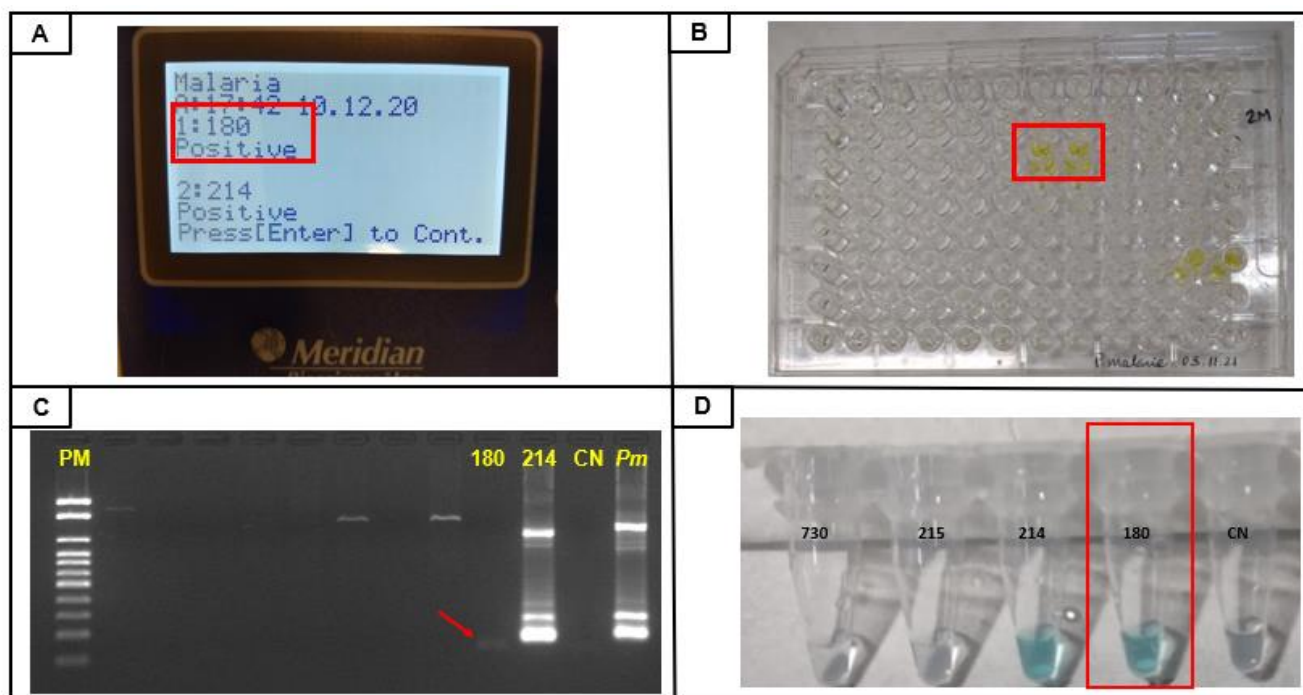


Figura 24. Caso positivo em doador da FPSH/SP com deslocamento para região de Mata Atlântica **A:** Amplificação da amostra individualmente no Alethia® LAMP para *Plasmodium*. **B:** ELISA reagente para *P. malariae*. **C:** Amplificação de DNA genômico por *nested PCR*, com banda de 144 pb correspondente a *P. malariae*, onde 180 = doador, CN = controle negativo e *Pm* = controle positivo para *P. malariae*. **D:** Amplificação para *Plasmodium* com coloração azul esverdeada no MG LAMP

MG LAMP: Malachite Green LAMP

8. Investigação epidemiológica dos dois casos positivos para *Plasmodium* e para anticorpos anti-*Plasmodium*

Durante a entrevista para preenchimento do TCLE (Anexo I) do candidato com deslocamento para região de Mata Atlântica, foi realizado um questionário (Anexo II). O candidato relatou frequentes viagens ao município de Jujutiba, SP, para visitar parentes, sem nenhum outro deslocamento para outro município de área de Mata Atlântica ou para região endêmica de malária. Após os resultados negativos de todos os exames laboratoriais exigidos pelo Ministério da Saúde realizado pelo banco de sangue, de acordo com a Portaria Nº 158, de 04 de fevereiro de 2016 (Brasil, 2016), a bolsa de sangue do doador foi

transfundida para um receptor admitido com traumatismo cranioencefálico e acidente vascular cerebral isquêmico. Após seis dias da transfusão, o receptor faleceu, minimizando a hipótese de TTS em função do curto período de incubação para um acidente transfusional e pelo fato de ter apresentado quadro infeccioso com sepse no dia da transfusão. Em razão do quadro infeccioso, não houve doação de órgãos.

O candidato com deslocamento para região endêmica, havia relatado uma viagem a trabalho para área urbana de Cuiabá, oito meses antes do comparecimento para doação de sangue. Portanto, de acordo com a Portaria Nº 158, de 04 de fevereiro de 2016, o candidato realizou o exame para detecção de *Plasmodium* por microscopia. Durante o exame foi identificada uma estrutura semelhante a *Plasmodium*, conforme apresentado na Figura 21A, inviabilizando a doação. Para confirmar a suspeita de baixa parasitemia foi realizado qPCR, que resultou positivo, e *nested* PCR para identificação da espécie. No atendimento para tratamento e investigação epidemiológica, o candidato relatou frequentes viagens para Paraibuna, município localizado na região de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, para atividades de lazer. Com base nas características epidemiológicas de ambas as localidades, o provável local de infecção (LPI) foi definido como Paraibuna, o que reforça a importância de se considerar a presença de indivíduos assintomáticos infectados em áreas de baixa transmissão.

A investigação epidemiológica desses dois casos positivos em todos os testes foi realizada após a convocação desses doadores pela direção da FPSH/SP e comparecimento ao Centro de Referência em Malária (SUCEN/HCFMUSP) para a realização do tratamento de malária conforme as diretrizes do Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2020b). Além disso, os demais resultados positivos em pelo menos uma das técnicas utilizadas no estudo também foram informados aos bancos de sangue para convocação desses doadores a um centro de referência em malária mais próximo para receber o tratamento de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2020b).

9. Amostras coletadas de doadores/receptores de órgãos ou tecidos para transplantes

Devido a pandemia de COVID-19 o número de cirurgias para transplante de órgãos ou tecidos diminuiu consideravelmente, e como o desenho do estudo considerou uma amostragem de conveniência para doadores e receptores em eventos de transplantes, somente 19 amostras foram coletadas. Algumas amostras recebidas continham pouco material, impossibilitando a realização do seu processamento em todas as técnicas abordadas neste estudo. Todas as amostras foram negativas em todas as técnicas. Para essas amostras não foi possível a realização de ELISA (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado das amostras coletadas de doadores/receptores para transplante de órgãos ou tecidos, ensaiadas por qPCR, Alethia® LAMP, MG LAMP, GE e *nested* PCR

Total n= 19					
	(+)	(-)	%	IC (95%)	Total
qPCR	0	18	0,0%		18
Alethia® LAMP	0	18	0,0%		18
MG LAMP	0	15	0,0%		15
GE	0	17	0,0%		17
<i>nested</i> PCR	NR	NR			

MG LAMP: Malachite Green LAMP

GE: gota espessa

DISCUSSÃO

A segurança transfusional é uma questão de saúde pública e estratégias para evitar riscos devem ser rigorosas. A TTS de malária é um desafio aos serviços de hemoterapia em regiões endêmicas e não endêmicas, visto que a seleção de doadores não é capaz de detectar indivíduos semi-imunes, que podem ser portadores assintomáticos com parasitemias baixas, de difícil detecção pelos métodos de diagnóstico direto como a GE. A microscopia é o diagnóstico padrão ouro para malária e apresenta sensibilidade limitada na detecção dessas infecções assintomáticas. Neste abrangente estudo, realizado com 1054 amostras de bancos de sangue localizados em área endêmica e não endêmica para malária, a positividade da GE foi de 0,2% [IC 95% 0,0 - 0,7], muito inferior à positividade das técnicas moleculares, de 5,3% [IC 95% 4,0 - 6,9] para qPCR e 1,4% [IC 95% 0,8 - 2,3] para Alethia® LAMP. Os resultados corroboram com os obtidos por Schindler e colaboradores (2019) em doadores de sangue da Guiné Equatorial, que mostraram a positividade da GE muito inferior (2%) que a qPCR (26%). Com relação ao Alethia® LAMP, o uso desta plataforma em candidatos a doadores de sangue é inédito, porém seu desempenho superior à GE foi demonstrado em estudo com amostras clínicas (Lucchi et al, 2016a). A detecção de candidatos a doação de sangue assintomáticos positivos é ainda mais preocupante no contexto de doações de sangue em nível mundial. De acordo com o relatório global sobre segurança e disponibilidade do sangue da OMS (WHO, 2021b), 171 dos 194 Estados-Membros do Banco de Dados Global sobre Segurança do Sangue (GDBS) informaram que foram realizadas 118,5 milhões de doações de sangue entre os anos 2017 e 2020. Destes, 106,1 milhões foram doações de sangue total e 12,4 milhões por aférese. A doação de sangue é um ato que traz muitos benefícios a toda a humanidade. No entanto, a triagem deve ser rigorosa a fim de minimizar o risco de transmissão de patógenos aos receptores, principalmente os imunossuprimidos (Bhatti et al., 2022).

A TTS de malária pode ser facilmente transmitida pela bolsa de sangue coletada de doadores assintomáticos, pois os parasitos podem se manter viáveis por pelo menos 18 dias quando armazenados a 4°C e por um período maior quando congelados (WHO, 2009). Os doadores podem permanecer infecciosos por longos períodos, com relatos de persistência de parasitemia por 5 anos para *P. falciparum* e *P. vivax*, 7 anos para *P. ovale*

(Faruk, 2016), por décadas para *P. malariae* (Pulvirenti et al., 2021), porém é importante ressaltar que a infecção pode persistir muito além do esperado (O'Brien et al., 2015).

Em áreas endêmicas para malária a diferenciação entre casos de TTS e infecções naturais torna-se mais difícil pela presença do vetor. Doadores residentes nessas regiões apresentam alto risco de infecção, o que torna imprescindível minimamente a realização da GE corada por Giemsa e/ou de RDTs para a identificação de doadores com parasitemia dentro do LoD destas técnicas, o que não impede a TTS em doadores com parasitemias submicroscópicas (Kitchen e Chiodini, 2006). Neste estudo, a comparação entre o número de amostras positivas em pelo menos uma das técnicas em cada local de coleta, revelou que o banco de sangue Hemoacre, localizado na região amazônica, apresentou 49 amostras positivas (9,8%), enquanto nos bancos de sangue localizados na região extra-amazônica o número de amostras positivas foi de 22 (6,0%) na FPSH/SP e de sete (3,7%) no Hemonúcleo de Santos.

O risco de malária transfusional deve ser considerado sob dois aspectos principais: o primeiro é o risco de malária associado a qualquer candidato a doação e o segundo é a capacidade do sistema e do método de diagnóstico de identificar e gerenciar o doador e a doação (Kitchen e Chiodini, 2006). Por isso, é importante considerar que as abordagens adotadas em cada região e por diferentes serviços de hemoterapia, devem ser acompanhadas com a epidemiologia dos deslocamentos ou da residência dos doadores.

Mais de 99% dos casos de malária transmitidos no Brasil estão concentrados na região amazônica, no entanto casos residuais foram relatados em vários estados localizados em áreas de Mata Atlântica (Cerutti et al., 2007; Hristov et al., 2014; de Alencar et al., 2018). Nessas regiões geralmente não ocorrem surtos de grandes proporções, os sintomas clínicos quando existentes são leves, a incidência e a parasitemia são baixas, e as espécies relacionadas às infecções são *P. vivax* e *P. malariae* (de Alencar et al., 2018). Neste estudo foram detectados 11 candidatos a doadores de sangue positivos para *P. malariae*, confirmando a importância desta espécie nas infecções assintomáticas relacionadas ao risco de TTS de malária (Lima et al., 2018, Aschar et al., 2020). É importante ressaltar que neste estudo os candidatos não apresentaram sinais ou sintomas de malária, o que é comum em infecções com baixa parasitemia causadas por *P. malariae* (Collins et al., 2007). Esta espécie tem características biológicas que contribuem para este comportamento adaptativo do hospedeiro à presença do parasito. *P. malariae* invade

eritrócitos senescentes, que representam 0,1% do total de hemácias no sangue circulante. Além disso, na esquizogonia pré-eritrocítica a produção de merozoítos é bastante modesta, em torno de 2.000, bem como na eritrocítica, de 6-12 merozoítos a cada ruptura do esquizonte (Brasil, 2005). Para os dois casos positivos em todos os testes, após a investigação epidemiológica foi confirmado que os dois candidatos foram infectados nos municípios de Paraibuna e Juquitiba, ambos localizados em região de Mata Atlântica do estado de São Paulo, onde já foram descritas infecções assintomáticas por *P. vivax* e *P. malariae* (Hristov et al, 2014). De acordo com Couto et al. (2010), o ecossistema de Mata Atlântica apresenta grande densidade de vetores *Anopheles* do subgênero *Kerteszia*, que contribuem para a manutenção da transmissão, pois sua dispersão vertical permite que se alimentem no solo e na copa das árvores. A oviposição deste subgênero se dá na água contida nas bromélias, abundantes na região (Deane, 1992).

A malária em primatas não humanos também ocorre nessas regiões, sendo transmitida pelos mesmos vetores (Neves et al., 2013). Apesar dessas características oferecerem forte suporte à hipótese de transmissão zoonótica, deve-se considerar a presença de portadores assintomáticos na manutenção da baixa incidência da malária nessas áreas. Neste estudo, em doadores da FPSH/SP com deslocamento somente para região de Mata Atlântica, obteve-se positividade para *Plasmodium* de 4,0% na qPCR, 2,8% no Alethia® LAMP e 8,3% no MG LAMP; no Hemonúcleo de Santos somente os testes qPCR e Alethia® LAMP detectaram *Plasmodium*, com positividade de 1,7% em ambos os testes. Estes valores são semelhantes ao que foi relatado por Alencar e colaboradores (2018) em um estudo com indivíduos residentes em área extra-amazônica do Brasil, com prevalência de 3,4% de portadores assintomáticos por PCR. Em um estudo anterior, realizado também em região da Mata Atlântica no estado do Espírito Santo, foram investigados 1.527 moradores utilizando multiplex PCR, obtendo-se 1,5% de positividade para *P. vivax* e 0,9% para *P. malariae* (Cerutti et al., 2007).

Durante a TTS os parasitos são liberados diretamente na corrente sanguínea do receptor, o que aumenta o risco de infecção grave e morte, principalmente em indivíduos sem exposição prévia à malária ou em pacientes imunocomprometidos (Verra et al., 2018; Rocha et al., 2020). Alho e colaboradores (2017) em uma revisão sistemática baseada nas características epidemiológicas da TTS nas Américas entre 1971 e 2016, relataram 63 publicações sobre o tema, com 422 relatos de casos de TTS. No entanto, faltam estudos

demonstrando técnicas diagnósticas sensíveis, práticas e acessíveis que possam ser utilizadas em bancos de sangue na América Latina para a triagem segura de indivíduos assintomáticos para malária. Ainda de acordo com o estudo, 58,4% dos casos de TTS foram por *P. malariae*, 20,7% por *P. vivax* e 17,9% por *P. falciparum*, sendo que 50,7% dos casos ocorreram no México, 40,3% nos Estados Unidos da América e 6,6% no Brasil.

Neste estudo foram avaliados dois protocolos moleculares *point-of-care*, Alethia® Malaria LAMP e MG LAMP, como alternativa para detecção de *Plasmodium* na triagem de infecções assintomáticas em doadores de sangue e em doadores/receptores de órgãos ou tecidos para transplantes. Para isso foram comparadas as positivities de cada teste com qPCR, utilizada como referência. Os resultados revelaram positividade de 5,3% (56/1054) para qPCR, 1,4% (15/1054) para Alethia® LAMP e 2,8% (5/180) para MG LAMP. Das 56 amostras positivas para qPCR, 49 apresentaram amplificação em *simplicata*, com variação dos *Cts* de 37,83 a 39,98, o que indica uma parasitemia extremamente baixa.

Devido às parasitemias submicroscópicas e o perfil assintomático dos candidatos, o diagnóstico pela gota espessa apresentou baixa positividade reforçando a necessidade de diagnóstico mais sensível e específico, como os ensaios moleculares. No entanto, mesmo com o uso de PCR com protocolos bem descritos na literatura e com boa sensibilidade, algumas amostras apresentaram amplificação somente em *simplicata*. Em um estudo com infecções submicroscópicas por *Plasmodium*, Costa e colaboradores (2014), testaram a reprodutibilidade de dois protocolos moleculares bem estabelecidos, em um painel com 34 amostras de sangue de indivíduos assintomáticos para malária e negativos pela microscopia, observando grande variação entre as réplicas de PCR, com 38% das amostras alternando os resultados entre positivo e negativo. Resultados semelhantes foram observados em amostras com baixas parasitemias ou no limite de detecção do ensaio, testadas mais de uma vez com o MG LAMP, variando entre positivo e negativo (Lucchi et al., 2016b). Estas limitações podem ser motivadas por vários fatores, como a qualidade e o tipo da amostra biológica, a concentração de DNA genômico, variações nas condições de amplificação e a qualidade dos reagentes de PCR (Costa et al., 2014).

Neste estudo, as duas amostras positivas em todos os ensaios apresentaram amplificações por qPCR com parasitemias equivalentes a 0,1 parasito/ μ L e 10 parasitos/ μ L conforme curva padrão. Os LoDs para detecção de *Plasmodium* nos três testes moleculares são 1 parasito/ μ L na qPCR (Lima et al., 2011), 2 parasitos/ μ L para *P. falciparum* e 0,125

parasito/ μL para *P. vivax* no Alethia[®] LAMP (Lucchi et al., 2016a), e 4 parasitos/ μL para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 8 parasitos/ μL para *P. malariae* no MG LAMP (Lucchi et al., 2016b). Embora os ensaios sejam gênero-específicos, o LoD pode variar dependendo da espécie. Desta forma, os resultados obtidos para o Alethia[®] LAMP para as duas amostras apresentaram boa sensibilidade, corroborando com o encontrado por Lucchi e colaboradores (2016a) em ensaios com *Illumigene* Malaria LAMP, mesmo kit do Alethia[®] LAMP, entretanto com nome antigo. Para este teste há LoDs estabelecidos somente para as espécies *P. falciparum* (2p/ μL) e *P. vivax* (0,125p/ μL), então nossos resultados sugerem que o LoD para *P. malariae* pode ser o mesmo que para *P. vivax*, visto que o Alethia[®] LAMP foi positivo em amostra com 0,1 parasito/ μL quando testada pela qPCR, considerada como referência molecular neste estudo. Para o MG LAMP os resultados obtidos nas duas amostras apresentaram LoD menor que o encontrado por Lucchi e colaboradores (2016b), que detectaram amostras com 1 parasito/ μL para *P. vivax*, 4 parasitos/ μL para *P. falciparum* e *P. ovale* e 8 parasitos/ μL para *P. malariae*. Neste estudo as duas amostras positivas no MG LAMP eram *P. malariae*, com parasitemias equivalentes a 0,1 parasito/ μL e 10 parasitos/ μL pela qPCR. Adicionalmente essas duas amostras foram ensaiadas com um protocolo multiplex para PCR em tempo real (mqPCR, Altona Diagnostics, Hamburgo, Alemanha) com sensibilidade analítica de 0,8 parasito/ μL para *P. vivax* e 0,36 parasito/ μL para *P. malariae* (Aschar et al., 2022), apresentando resultado positivo para *P. malariae*, com *C_t*s muito próximos aos obtidos na qPCR, sendo 33,21 e 28,04 para as amostras com parasitemias equivalentes a 0,1p/ μL (35,3 na qPCR) e 10p/ μL (27,05 na qPCR), respectivamente. O ensaio das duas amostras por mqPCR foi parte integrante de um estudo para avaliação deste protocolo (Aschar et al., 2022), e por isso não foi aplicado às demais amostras deste estudo.

Com relação a concordância entre os testes moleculares, somente duas amostras foram positivas nos três testes, Alethia[®], MG LAMP e qPCR, com diferença significativa entre eles ($p < 0,0001$). Analisando separadamente as regiões epidemiológicas para as três técnicas ($n=180$ amostras), para a região endêmica somente uma amostra foi positiva nos três testes, com diferença significativa quando comparado cada protocolo LAMP à qPCR ($p < 0,0001$). Também para a região não endêmica, somente uma amostra foi positiva nos três testes, porém, seguindo o mesmo critério de análise não houve diferença estatística

(Alethia[®] LAMP com qPCR $p=0,5130$; MG LAMP com qPCR $p=0,0603$; Alethia[®] LAMP com MG LAMP $p=0,1250$).

Neste estudo 100 amostras foram positivas em pelo menos um dos seguintes testes: qPCR, GE, Alethia[®] LAMP, MG LAMP ou ELISA e todas foram ensaiadas pelo protocolo de *nested* PCR para detecção de espécies (Snounou et al., 1993). Este protocolo é baseado na amplificação de genes ribossomais e bastante utilizado por sua alta especificidade na identificação de espécies de *Plasmodium*. O LoD deste protocolo é de 10 parasitos/ μ L, o que justifica a detecção de somente 11 amostras positivas dentre as 100, todas identificadas como *P. malariae*.

Vários protocolos moleculares são aplicados ao diagnóstico da malária, sendo qPCR um dos que apresentam maior sensibilidade (Rougemont et al., 2004; Lima et al., 2011). Além disso, são disponíveis protocolos de *nested* PCR com boa sensibilidade e especificidade, muito utilizados na determinação de espécies de *Plasmodium* (Snounou et al., 1993; Tanomsing et al., 2010). Porém, dependem de protocolos prévios de extração de DNA, amplificação em equipamentos sofisticados e locais com infraestrutura adequada, além da necessidade de eletroforese na PCR convencional, como a *nested* PCR (Polley et al., 2010). Os ensaios LAMP apresentam vantagens como: as reações ocorrem em sistema fechado impedindo a contaminação por *amplicons*, como pode ocorrer com a *nested* PCR; não exigem equipamentos sofisticados para a amplificação, por serem técnicas isotérmicas (entre 60 e 65°C); além disso, a enzima *Bst* DNA polimerase utilizada nas reações de LAMP é mais estável e resistente aos inibidores de PCR, permitindo o uso de amostras com preparo mínimo como sugerido em literatura, através do protocolo de fervura e centrifugação, *boil and spin method* - B&S (Lucchi et al., 2016b; Barazorda et al., 2021); a reação ocorre em torno de uma hora e o resultado é analisado em equipamento de leitura pela formação de pirofosfato de magnésio ou visualmente quando o protocolo utiliza corantes especializados como o verde de malaquita (Zainabadi et al., 2021), permitindo o diagnóstico mais rápido, com infraestrutura mais simples.

Neste estudo, foram utilizadas 180 amostras para o ensaio de ELISA, sendo 96 sorteadas entre as negativas pelos testes moleculares e 84 positivas em pelo menos uma das técnicas qPCR, Alethia[®] LAMP e GE. Os resultados do ELISA mostraram cinco amostras reagentes dentre as negativas selecionadas por sorteio e 11 dentre as positivas, sem diferença estatística ($p=0,07175$), mesmo quando separadas em ELISA-*Pm* e ELISA-

Pv. Quando analisadas as amostras separadas por região, a endêmica apresentou 15 amostras reagentes e a não endêmica somente três ($p=0,0247$). Os antígenos recombinantes utilizados neste estudo fornecem uma resposta específica de anticorpos contra a proteína MSP-1 que está presente no estágio sanguíneo do *Plasmodium*, indicando o desenvolvimento de uma infecção intra-eritrocítica no hospedeiro e não somente uma resposta à inoculação de esporozoítos, como nas reações com antígenos de proteína circumsporozoíta (CSP) utilizados em outros protocolos ELISA (Hristov et al., 2014).

A OMS recomenda diferentes estratégias de triagem de candidatos a doação de sangue: para as áreas endêmicas são considerados parâmetros como a sazonalidade da malária, área geográfica e exames laboratoriais; para as áreas não endêmicas preconiza a recusa por seis meses após o deslocamento combinada com testes para anticorpos, para prevenir malária transfusional (WHO, 2009). No entanto, essa recomendação é baseada em alguns testes que apresentaram maior sensibilidade da sorologia em relação à detecção pela microscopia. Porém, a determinação da sensibilidade em ensaios sorológicos é desafiadora, pois a intensidade e a duração da resposta de anticorpos específico anti-*Plasmodium* podem variar de acordo com as características do hospedeiro (idade e tempo de moradia em região endêmica), tipo de parasito (espécie, cepa e antígeno) e fatores ambientais que influenciam o nível de transmissão (Mangano et al., 2019). Os testes sorológicos apresentam boa sensibilidade para detectar indivíduos imunes em estudos epidemiológicos e para mapeamento de áreas de risco de transmissão. Como estratégia de triagem de candidatos para doação de sangue em área endêmica não são adequados, mas por outro lado, em áreas não endêmicas ou de baixa prevalência, testes moleculares associados a testes sorológicos podem ser altamente benéficos aumentando mais a sensibilidade em casos de surtos e para triagem de doadores (Lima et al., 2011).

Em 31 de dezembro de 2019, a OMS foi alertada sobre a ocorrência de casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, na República Popular da China. Tratava-se de uma nova cepa da família de coronavírus que ainda não havia sido identificada em humanos (OPAS, 2020). Em 30 de janeiro de 2020, a OMS declarou como uma Emergência de Saúde Pública de Âmbito Internacional o surto do novo coronavírus (WHO, 2020). Essa decisão possibilitou maior coordenação, cooperação e solidariedade global para interromper a propagação do vírus. Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi

caracterizada pela OMS como uma pandemia. O surgimento da COVID-19 e a sua rápida disseminação em todo o mundo, criou enormes interrupções globais, impactando de forma preocupante os sistemas de saúde (Rahi et al., 2020), serviços sociais e atividades econômicas em todos os países com transmissão da doença. Os países em desenvolvimento apresentaram maior dificuldade em controlar a doença, com maior impacto na saúde pública e na economia.

O Brasil ocupa o segundo lugar no mundo em número de transplantes. Durante a pandemia por Covid-19, devido às interrupções do sistema de saúde para tratamento de outras doenças e a grave crise econômica no país, os procedimentos de doação órgãos e transplante foram afetados. Em 2021, a taxa de notificação de potenciais doadores (57,7 pmp - por milhão de população) aumentou, sendo 5,5% maior que em 2019 e 14% maior que em 2020. Entretanto, a taxa de doadores efetivos em 2021 (15,1 pmp) foi 17% menor que em 2019 (18,1 pmp) e 4,5% inferior a 2020 (15,8 pmp) (ABTO, 2021). O grande responsável pela diminuição na taxa de efetivação da doação foi o aumento em 60% da taxa de contraindicação à doação, que passou de 15% em 2019 para 24% em 2021. Essas medidas foram tomadas visando evitar a transmissão da Covid-19 via transplante, pois até aquele momento não se conheciam os riscos de transmissão do vírus durante o procedimento. Entretanto, atualmente, há dados suficientes na literatura que revelam risco mínimo ou ausente, com exceção do transplante de pulmão (ABTO, 2021). No primeiro trimestre de 2022, as taxas de doação e de transplante continuaram em queda. Em comparação ao ano de 2021 houve diminuição de 8,6% na taxa de doadores, com 37,5% de diminuição nos transplantes de pâncreas, 25% de pulmão, 13,8% de rim, 12,5% de coração, 11,5% de fígado, 7,1% de córneas e 12,2% de células hematopoiéticas (ABTO, 2022). Desta forma, as restrições impactaram no que foi proposto para o estudo, baseado em amostragem de conveniência. Neste cenário, foi possível a obtenção de 19 amostras de doadores e/ou receptores provenientes de áreas com transmissão de malária, todas com resultado negativo nos testes realizados (GE, qPCR, Alethia® LAMP e MG LAMP).

Algumas limitações podem ser apontadas neste estudo. A amostragem proposta de 1300 doadores (500 na FPSH/SP, 300 no Hemonúcleo e 500 no Hemoacre) não pode ser completada em função da pandemia de COVID-19, que impactou na inclusão de doadores com deslocamentos para áreas endêmicas, porém sem prejuízo da análise estatística. Outra limitação está relacionada ao fato de que o processamento dos testes Alethia® LAMP

e MG LAMP, desenvolvidos para uso *point-of-care*, não são realizados em duplicata, distintamente da qPCR, o que pode ter implicado em menor positividade.

No Brasil, as infecções por *P. malariae* podem ocorrer em áreas endêmicas da região amazônica e em áreas não endêmicas em Bioma de Mata Atlântica. De acordo com a literatura, os relatos de casos de TTS a partir de doadores assintomáticos portadores de *P. malariae* tem aumentado, representando um risco aos bancos de sangue e aos programas de segurança transfusional. A detecção destes casos somente foi possível mediante estudos para o desenvolvimento de protocolos moleculares mais sensíveis de diagnóstico de malária, que podem ser aplicados aos serviços de hemoterapia e transplante de órgãos e tecidos, contribuindo para evitar a transmissão de malária nestes procedimentos (Aschar et al., 2020; dos Santos et al., 2020). A abordagem de metodologia diagnóstica de fácil aplicação como as plataformas *point-of-care* pode servir como ferramenta para triagem em bancos de sangue e em unidades de transplantes. O desempenho dos protocolos LAMP foi satisfatório, atendendo as recomendações da OMS, que preconiza testes moleculares com LoD de no mínimo 2 parasitos/ μ L (WHO, 2014) e de outros órgãos de vigilância garantindo a segurança do sangue, órgãos e tecidos.

Os resultados obtidos neste estudo revelam o risco de TTS de malária independentemente da endemicidade, reforçando a necessidade de revisão das diretrizes dos regulamentos técnicos de procedimentos hemoterápicos e de transplantes, contribuindo para a segurança de receptores de sangue, de órgão e de tecidos.

CONCLUSÕES

1. A aplicabilidade dos ensaios moleculares *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) Alethia® Malaria LAMP e *Malachite Green* LAMP foi avaliada em amostras de candidatos a doadores de sangue coletadas em bancos de sangue localizados em área endêmica e não endêmica para malária e em doadores/receptores de órgãos ou tecidos para transplantes, em comparação com a técnica de qPCR.
2. A qPCR foi realizada em 1054 amostras de candidatos a doadores de sangue coletadas em bancos de sangue localizados em área endêmica e não endêmica para malária, com positividade de 5,3%.
3. O Alethia® Malaria LAMP foi realizado em 1054 amostras com arranjo em *pool* de duas amostras, e abertura dos *pools* positivos, apresentando positividade de 1,4%.
4. O MG LAMP foi realizado em 180 amostras obtidas por sorteio entre as negativas em todas as técnicas e as positivas em qualquer das técnicas, apresentando positividade de 2,8%.
5. Foram detectadas infecções assintomáticas por *Plasmodium* em 7,4% das amostras, considerando as amostras positivas em pelo menos umas das técnicas utilizadas.
6. Foram identificados 11 casos de candidatos a doadores de sangue positivos para *P. malariae* diagnosticados por *nested* PCR, sendo nove coletados em banco de sangue de área endêmica e dois de área não endêmica para malária.
7. Foi realizada sorologia por ELISA em 180 amostras obtidas por sorteio entre as negativas em todas as técnicas e as positivas em qualquer das técnicas, apresentando positividade de 3,3% para ELISA-*Pm*, 7,2% para ELISA-*Pv* e 3,4% para ELISA-*Pf*, este último só realizado com candidatos do banco de sangue de área endêmica.
8. Os ensaios de qPCR, Alethia® Malaria LAMP e MG LAMP foram realizados em 19 amostras de doadores/receptores de órgãos ou tecidos para transplantes, com resultado negativo em todos os casos.
9. A utilização dos protocolos *point-of-care* Alethia® Malaria LAMP e MG LAMP mostrou-se aplicável como método de triagem de sangue em serviços de hemoterapia, para aumentar a segurança transfusional.

REFERÊNCIAS

- ABTO. Associação Brasileira de Transplante de Órgão. Registro Brasileiro de Transplante. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado, 2008-2015. Ano XXI Nº 4, 2015.
- ABTO. Associação Brasileira de Transplante de Órgão. Registro Brasileiro de Transplante. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2011-2018). Ano XXIV Nº 4, 2018.
- ABTO. Associação Brasileira de Transplante de Órgão. Registro Brasileiro de Transplantes. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2012-2019). Ano XXV Nº 4, 2019.
- ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2014-2021). Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Ano XXVIII Nº 4. 2021.
- ABTO. Registro Brasileiro de Transplantes. Janeiro / março - 2022. Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO). Ano XXVIII Nº 1. 2022.
- Alho RM, Machado KVM, Val FFA, Fraiji NA, Alexandre MAA, Melo GC, Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Lacerda MVG. Alternative transmission routes in the Malaria elimination era: an overview of transfusion-transmitted malaria in the Americas. *Malar J.* 2017; 16(1): 78.
- Aninagyei E, Smith-Graham S, Boye A, Egyir-Yawson A, Acheampong DO. Evaluating 18s-rRNA LAMP and selective whole genome amplification (sWGA) assay in detecting asymptomatic Plasmodium falciparum infections in blood donors. *Malar J.* 2019 Jun 24;18(1):214.
- Anthony CN, Lau YL, Sum JS, et al. Malaysian child infected with Plasmodium vivax via blood transfusion: a case report. *Malar J.* 2013;12:308.
- 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;62:e100.
- Aschar M, Sanchez MCA, Costa-Nascimento MJ, Farinas MLRN, Hristov AD, Lima GFMC, Inoue J, Levi JE, Di Santi SM. Ultrasensitive molecular tests for Plasmodium detection: applicability in control and elimination programs and reference laboratories. *Rev Panam Salud Publica.* 2022;46:e11.
- Ashley EA, Phyto AP, Woodrow CJ. Malaria. *Lancet.* 2018; 391: 1608–21.
- Ávila PE, Kirchgatter K, Brunialti KCS, Oliveira AM, Siciliano RF, Di Santi SM. Evaluation of a rapid dipstick test, Malar-Check™, for the diagnosis of Plasmodium falciparum malaria in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2002; 44: 293-6.
- Barazorda KA, Salas CJ, Bishop DK, Lucchi N, Valdivia HO. Comparison of real time and malachite-green based loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of Plasmodium vivax and P. falciparum. *PLoS One.* 2020;15(6): e0234263.

- Barazorda KA, Salas CJ, Braga G, Ricopa L, Ampuero JS, Siles C, et al. Validation study of Boil & Spin Malachite Green Loop Mediated Isothermal Amplification (B&S MG-LAMP) versus microscopy for malaria detection in the Peruvian Amazon. PLoS ONE. 2021; 16(10): e0258722.
- Bhatti MM, Junaid A, Sadiq F. The Prevalence of Transfusion Transmitted Infections among Blood Donors in Pakistan: A Retrospective Study. Oman Med J. 2022 May 31;37(3):e386.
- Bird EM, Parameswaran U, William T, et al. Transfusion-transmitted severe Plasmodium knowlesi malaria in a splenectomized patient with beta-thalassaemia major in Sabah, Malaysia: a case report. Malar J. 2016;15(1):357.
- Björkman AB. Asymptomatic low-density malaria infections: a parasite survival strategy? Lancet Infect Dis. 2018;18(5):485-486.
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, 2016 a 2018. Brasília, 2018.
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Malária. Número Especial. 2021
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde [12/06/2022a]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/malaria>.
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Panorama epidemiológico da malária em 2021: buscando o caminho para a eliminação da malária no Brasil. Volume 53. Brasília, 2022b.
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados, boletins e mapas interativos [21/08/2020a]. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/BoletimregiaoExtra-Amazonica_23_07_2020/SrieHist.
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de tratamento da malária no Brasil [25/08/2020b]. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/21/guia-tratamento-malaria-14ago20-isbn.pdf>.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 112 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)
- Brasil. Ministério da Saúde do Brasil. Portaria Nº 158, de 04 de fevereiro de 2016. Redefine o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. Diário Oficial da União nº 221, de 13 de novembro de 2013, Seção 1, página 106.
- Britton S, Cheng Q, McCarthy JS. Novel molecular diagnostic tools for malaria elimination: a review of options from the point of view of high-throughput and applicability in resource limited settings. Malar J. 2016; 15:88.
- Bousema, T., Okell, L., Felger, I., Drakeley, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. Nat. Rev. Microbiol. 2014; 12 (12), 833–840 Nature Publishing Group.

- Buery JC, Rodrigues PT, Natal L, Salla LC, Loss AC, Vicente CR, Rezende HR, Duarte AMRC, Fux B, Malafronte RDS, Falqueto A, Cerutti C Jr. Mitochondrial genome of *Plasmodium vivax/simum* detected in an endemic region for malaria in the Atlantic Forest of Espírito Santo state, Brazil: do mosquitoes, simians and humans harbour the same parasite? *Malar J.* 2017 Oct 30;16(1):437.
- Cerutti C Jr, Boulos M, Coutinho AF, Hatab Mdo C, Falqueto A, Rezende HR, Duarte AM, Collins W, Malafronte RS. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malar J.* 2007 Mar 19;6:33.
- Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 579–92.
- Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, Msellem M, Ali A, Abass AK, Mårtensson A, Björkman A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015; 14: 43.
- Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(1):21-28.
- Cotter C, Sturrock HJ, Hsiang MS, Liu J, Phillips AA, Hwang J, Gueye CS, Fullman N, Gosling RD, Feachem RG. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet.* 2013;382(9895):900-11.
- Couto RD, Latorre MR; 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 (1): 52-8.
- Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit Vectors.* 2010 Feb 1;3(1):5.
- Cox-Singh, J. Zoonotic malaria: *Plasmodium knowlesi*, an emerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis.* 2012. 25, 530–536.
- CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. SINAN-NET/Divisão de Zoonoses – CVE [21/08/2020]. Disponível em: http://homologacaoportal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/malaria/malaria_cautoctone.pdf.
- de Alencar FEC, Malafronte RDS, Cerutti C Jr, Natal Fernandes L, 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(1):452.
- de 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 Mar 14;17(1):113.
- de 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. Jan 8;8(1):86.

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

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 São Paulo*. 2004; 46 (4): 183-7.

Dos Santos EH, Yamamoto L, Domingues W, di Santi SM, Kanunfre KA, Okay TS. A new Real Time PCR with species-specific primers from *Plasmodium malariae*/*P. brasilianum* mitochondrial cytochrome b gene. *Parasitol Int*. 2020; 76: 102069.

Downs W G, Pittendrigh C S (1946) Bromelian malaria in Trinidad, British West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 26: 47-66.

Duarte AM, Malafronte Rdos S, Cerutti C Jr, Curado I, de Paiva BR, Maeda AY, Yamasaki T, Summa ME, Neves Ddo V, de Oliveira SG, Gomes Ade C. Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta Trop*. 2008 Aug;107(2):179-85.

Escalante AA, Barrio E, Ayala FJ. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol*. 1995 Jul;12(4):616-26.

Faruk JA. Blood transfusion malaria: A literature review. *Ann Nigerian Med* 2016;10:49-57.

Ferrarini MAG, Lazzetti AV, Ferreira S, Di Santi SM, Wigman LT, Silveira MBV. Malária congênita: descrição de um caso e revisão da literatura. *J Pediatr*. 2009; 140 - 145.

Ferreira AW, Sanchez MC. Human malaria: evaluation of serological tests in seroepidemiological surveys, individual diagnosis and for blood banks screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1988; 1:476-7.

FIND, ECC, HTD. Foundation for Innovative New Diagnostics, Eiken Chemicals Co., Ltd., Hospital for Tropical Disease (HTD). Manual of Standard Operating Procedures for malaria LAMP. Version 1, 2012.

Fujimori M, de Almeida ADBPF, Barrouin-Melo SM, Cortez LRPB, Duthie MS, Hiramoto RM, de Pinho FA, Reed SG, Sousa VRF, Souza NF, Soares RM, Tolezano JE, Sanchez MCA, Goto H. Validation of ELISA with recombinant antigens in serological diagnosis of canine *Leishmania infantum* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021 Mar 12;116:e200428.

Haanshuus CG, Mørch K, Blomberg B, Strøm GEA, Langeland N, Hanevik K, Mohn SC. Assessment of malaria real-time PCR methods and application with focus on low-level parasitaemia. *PLoS One*. 2019 Jul 5;14(7):e0218982.

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 Dec;109(8):1014-20.

- Inoue J, Machado CM, Lima GF, Nascimento MJ, Colturato VR, Di Santi SM. The monitoring of hematopoietic stem cell transplant donors and recipients from endemic areas for malaria. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010; 52(5): 281-4.
- Josling GA, Llinás M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(9):573-587.
- Kasetsirikul S, Buranapong J, Srituravanich W, Kaewthamasorn M, Pimpin A. The development of malaria diagnostic techniques: a review of the approaches with focus on dielectrophoretic and magnetophoretic methods. *Malar J*. 2016;15:358.
- Kirchgatter K, Nogueira SL, Padilha A, Curado I, Boulos M, Di Santi SM. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. *BMJ*. 2005; 331:576-b.
- Kitchen AD, Chiodini PL. Malaria and blood transfusion. *Vox Sang*. 2006;90(2):77-84.
- Labadie-Bracho MY, van Genderen FT, Adhin MR. Malaria serology data from the Guiana shield: first insight in IgG antibody responses to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* antigens in Suriname. *Malar J*. 2020;19(1):360.
- Laporta GZ, Ramos DG, Ribeiro MC, Sallum MA. Habitat suitability of *Anopheles* vector species and association with human malaria in the Atlantic Forest in south-eastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011 Aug;106 Suppl 1:239-45.
- Leclerc MC, Hugot JP, Durand P, Renaud F. Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old-world primates (including humans): an 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology*. 2004 Dec;129(Pt 6):677-84.
- Leski TA, Taitt CR, Swaray AG, Bangura U, Reynolds ND, Holtz A, Yasuda C, Lahai J, Lamin JM, Baio V, Jacobsen KH, Ansumana R, Stenger DA. Use of real-time multiplex PCR, malaria rapid diagnostic test and microscopy to investigate the prevalence of *Plasmodium* species among febrile hospital patients in Sierra Leone. *Malar J*. 2020;19(1):84.
- 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, São Paulo*. 2011; 106 (6): 691-700.
- Lima GFMC, Arroyo Sanchez MC, Levi JE, Fujimori M, Da Cruz Caramelo L, Sanchez AR, Ramos-Sanchez EM, Inoue J, De Jesus Costa-Nascimento M, Mendrone Junior A, Di Santi SM. Asymptomatic infections in blood donors harbouring *Plasmodium*: an invisible risk detected by molecular and serological tools. *Blood Transfus*. 2018. 16(1): 17-25.
- Lucchi NW, Gaye M, Diallo MA, Goldman IF, Ljolje D, Deme AB, Badiane A, Ndiaye YD, Barnwell JW, Udhayakumar V, Ndiaye D. Evaluation of the Illumigene Malaria LAMP: a robust molecular diagnostic tool for malaria parasites. *Sci Rep*. 2016a; 9 (6): 36808.
- Lucchi NW, Ljolje D, Silva-Flannery L, Udhayakumar V. Use of Malachite Green-Loop Mediated Isothermal Amplification for detection of *Plasmodium* spp. *Parasites*. *PLoS One*. 2016b; 11(3):e0151437.

- Mangano VD, Perandin F, Tiberti N, Guerriero M, Migliaccio F, Prato M, Bargagna L, Tais S, Degani M, Verra F, Bisoffi Z, Bruschi F. Risk of transfusion-transmitted malaria: evaluation of commercial ELISA kits for the detection of anti-Plasmodium antibodies in candidate blood donors. *Malar J.* 2019 Jan 22;18(1):17.
- Martín-Dávila P, Norman F, Fortún-Abete J, Píris M, Lovatti R, Rubio JM, Martínez-Pérez A, Graus J, Ta G, Villarubia J, Mahillo B, López-Vélez R. Donor-derived multiorgan transmission of mixed *P. malariae* and *P. ovale* infection: Impact of globalization on post-transplant infections. *Transpl Infect Dis.* 2018; 4:e12938.
- Mathison BA, Pritt BS. Update on malaria diagnostics and test utilization. *J Clin Microbiol.* 2017;55:2009–17.
- Meibalan E, Marti M. Biology of Malaria Transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(3):a025452.
- Miguel-Oteo M, Jiram AI, Ta-Tang TH, Lanza M, Hisam S, Rubio JM. Nested multiplex PCR for identification and detection of human Plasmodium species including Plasmodium knowlesi. *Asian Pac J Trop Dis.* 2017; 10(3): 299-304.
- 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.
- Monteiro EF, Fernandez-Becerra C, Curado I, Wunderlich G, Hiyane MI, Kirchgatter K. Antibody Profile Comparison against MSP1 Antigens of Multiple Plasmodium Species in Human Serum Samples from Two Different Brazilian Populations Using a Multiplex Serological Assay. *Pathogens.* 2021;10(9):1138.
- Moody A. Rapid diagnostic test for parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(1): 66-78.
- Moraes SL, Di Santi SM, Sanchez MCA. Malária. In *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Autoimunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 24, P. 284 -297.
- Moya-Alvarez V, Abellana R, Cot M. Pregnancy-associated malaria and malaria in infants: an old problem with present consequences. *Malar J.* 2014 Jul 11;13:271.
- Neves A, Urbinatti PR, Malafrente Rdos S, Fernandes A, Paganini Wda S, Natal D. Malaria outside the Amazon region: natural Plasmodium infection in anophelines collected near an indigenous village in the Vale do Rio Branco, Itanhaém, SP, Brazil. *Acta Trop.* 2013 Jan;125(1):102-6.
- O'Brien SF, Delage G, Seed CR, Pillonel J, Fabra CC, Davison K, Kitchen A, Steele WR, Leiby DA. The Epidemiology of Imported Malaria and Transfusion Policy in 5 Nonendemic Countries. *Transfus Med Rev.* 2015 Jul;29(3):162-71.
- OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde Brasil. [21/08/2022]. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/malaria>
- OPAS. Folha informativa – COVID-19 (doença causada pelo novo coronavírus). Organização Pan-Americana da Saúde, Brasil. Disponível em 22 de maio de 2020: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6101:covid19&Itemid=875

- Okell L C, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun* 2012; 3: 1237.
- Okell, L.C., Griffin, J.T., Kleinschmidt, I., Hollingsworth, T.D., Churcher, T.S., White, M.J., Bousema, T. The potential contribution of mass treatment to the control of *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One*. 2011; 6 (5).
- Owusu-Ofori AK, Betson M, Parry CM, Stothard JR, Bates I. Transfusion-transmitted malaria in Ghana. *Clin Infect Dis*. 2013. 56(12): 1735-41.
- Perkins SL, Sarkar IN, Carter R. The phylogeny of rodent malaria parasites: simultaneous analysis across three genomes. *Infect Genet Evol*. 2007 Jan;7(1):74-83.
- Pham NM, Karlen W, Beck HP, Delamarche E. Malaria and the 'last' parasite: how can technology help? *Malar J*. 2018; 17(1):260.
- Pierrotti LC, Levi ME, Di Santi SM, Segurado AC, Petersen E. Malaria Disease Recommendations for Solid Organ Transplant Recipients and Donors. *Transplantation*. 2018; 102(2S Suppl 2): S16-S26.
- Pina-Costa A, Brasil P, Di Santi SM, De Araujo MP, Suárez-Mutis MC, Santelli AC, Oliveira-Ferreira J, Lourenço-De-Oliveira R, Daniel-Ribeiro CT. Malaria In Brazil: What Happens Outside The Amazonian Endemic Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro*. 2014; 109 (5): 618-33.
- Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, Chiodini PL, Sutherland CJ. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(8): 2866-71.
- Pulvirenti J, Musso M, Fasciana T, Cascio A, Tricoli MR, Oliveri N, Favaro M, Diquattro O, Giammanco A. Transfusion-Transmitted Malaria of *Plasmodium malariae* in Palermo, Sicily. *Healthcare (Basel)*. 2021 Nov 16;9(11):1558.
- Rahi M, Das P, Sharma A. Novel Coronavirus Disease (COVID-19) Mitigation Steps Provide a Blueprint for Malaria Control and Elimination. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2020, pp. 1–3.
- Rezende HR, Soares RM, Cerutti C Jr, Alves IC, Natal D, Urbinatti PR, Yamasaki T, Falqueto A, Malafronte Rdos S. Entomological characterization and natural infection of anophelines in an area of the Atlantic Forest with autochthonous malaria cases in mountainous region of Espírito Santo State, Brazil. *Neotrop Entomol*. 2009 Mar-Apr;38(2):272-80.
- Ribeiro de Castro Duarte AM, Fernandes LN, Silva FS, Sicchi IL, Mucci LF, Curado I, Fernandes A, Medeiros-Sousa AR, Ceretti-Junior W, Marrelli MT, Evangelista E, Teixeira R, Summa JL, Nardi MS, Garnica MR, Loss AC, Buery JC, Cerutti C Jr, Pacheco MA, Escalante AA, Mureb Sallum MA, Laporta GZ. Complexity of malaria transmission dynamics in the Brazilian Atlantic Forest. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis*. 2021 May 31;1:100032.
- Rocha D, de Melo GC, Carneiro JMH, Ribeiro M, Ribeiro S, de Godoy DT, Costa E, de Almeida ACG, de Andrade EF, Abrahim CMM, Fraiji NA, Ferreira AGP, Monteiro WM, Brindeiro R, Tanuri A, de Lacerda MVG, Alvarez P. Use of a NAT-based assay to improve the surveillance system and prevent transfusion-transmitted malaria in blood banks. *Malar J*. 2020;19(1):275.

- 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(12):5636-43.
- Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, García ML, Micó M, Edú M, Alvar J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of Plasmodium vivax infection in Equatorial Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60(2): 183-7.
- Rubio JM, Jiménez Del Bianco AI, Cervera-Alonso Y, Fernandez-Garcia MD, Lanza M, Ta Tang TH, Sevil Puras F, Blanco L. P. vivax malaria in a blood donor in Spain, relapse or a new infection in a malaria non-endemic country? *Vox Sang.* 2016; 110(2):193-5.
- Saito T, Kikuchi A, Kaneko A, Isozumi R, Teramoto I, Kimura M, Hirasawa N, Hiratsuka M. Rapid and sensitive multiplex single-tube nested PCR for the identification of five human Plasmodium species. *Parasitol Int.* 2018; 67: 277–83.
- Sanchez, Arianni Rondelli. Validação de teste ELISA para pesquisa de anticorpos anti-MSP119 de Plasmodium vivax visando à aplicação em serviços hemoterápicos do Brasil em áreas não endêmicas para malária [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2014 [citado 2022-09-17].
- Sattabongkot J, Tsuboi T, Han ET, Bantuchai S, Buates S. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. *J Clin Microbiol.* 2014 May;52(5):1471-7.
- Sawyer DM, Wadsworth LD. Plasmodium ovale malaria in Canada following transfusion. *Can Med Assoc J.* 1977;117(8):923.
- Sazama, K. Prevention of transfusion-transmitted malaria: is it time to revisit the standards? *Transfusion.* 1991; 31(9):786-788.
- Schindler T, Robaina T, Sax J, Bieri JR, Mpina M, Gondwe L, Acuche L, Garcia G, Cortes C, Maas C, Daubenberger C. Molecular monitoring of the diversity of human pathogenic malaria species in blood donations on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar J.* 2019;18(1):9.
- Scuracchio P, Vieira SD, Dourado DA, et al. Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring Plasmodium malariae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011;53(1):55-59.
- Seed CR, Kitchen A, Davis TM. The status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. *Transfus Med Rev.* 2005; 19: 229-40.
- 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.
- 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 (2): 315-20.
- Steenkeste N, Incardona S, Chy S, Duval L, Ekala MT, Lim P. Towards high-throughput molecular detection of Plasmodium: new approaches and molecular markers. *Malar J.* 2009;8:86.

- Tambo M, Auala JR, Sturrock HJ, Kleinschmidt I, Bock R, Smith JL, Gosling R, Mumbengegwi DR. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification as a surveillance tool for malaria in reactive case detection moving towards elimination. *Malar J.* 2018; 17(1): 255.
- Tanomosing N, Imwong M, Theppabutr S, Pukrittayakamee S, Day NP, White NJ, Snounou G. Accurate and sensitive detection of Plasmodium species in humans by use of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase linker region. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3735-7.
- Vareil MO, Tandonnet O, Chemoul A, Bogreau H, Saint-Léger M, Micheau M, Millet P, Koeck JL, Boyer A, Rogier C, Malvy D. Unusual transmission of Plasmodium falciparum, Bordeaux, France, 2009. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 248–50.
- Verra F, Angheben A, Martello E, Giorli G, Perandin F, Bisoffi Z. A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. *Malar J.* 2018; 17(1): 36.
- WHO. Screening donated blood for transfusion-transmissible infections: recommendations. World Health Organization guidelines approved by the guidelines review committee. Geneva; 2009.
- WHO. World Health Organization. Evidence Review Group on Malaria Diagnosis in Low Transmission Settings. World Health Organization Headquarters, Geneva, 2014.
- WHO. World Health Organization. Global technical strategy for malaria 2016–2030. World Health Organization. Geneva, 2015.
- WHO. World Health Organization. World Malaria Report 2019. Geneva, 2019.
- WHO. Organização Mundial da Saúde. Jointly addressing endemic malaria and pandemic COVID-19. 2020. Disponível em 05 de junho de 2020: https://www.who.int/malaria/areas/epidemics_emergencies/covid-19/en/.
- WHO. World malaria report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021a. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. Global status report on blood safety and availability 2021b. Geneva: World Health Organization; 2022a. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. Global Malaria Programme. World Health Organization [13/06/2022]. Disponível em: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/case-management/diagnosis>.
- Yamasaki T, Duarte AM, Curado I, Summa ME, Neves DV, Wunderlich G, Malafronte RS. Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *J Med Primatol.* 2011 Dec;40(6):392-400.
- Zainabadi K. Ultrasensitive Diagnostics for Low-Density Asymptomatic Plasmodium falciparum Infections in Low-Transmission Settings. *J Clin Microbiol.* 2021 Mar 19;59(4):e01508-20.
- Zhang MH, Xu S, Gu YP, Liu Y, Lin H, Xie C, Chen Y, Chen J, Zhou H, Ortega L, Zhu G, Cao J. Classification of induced malaria case in an elimination setting: investigation of transfusion-transmitted malaria cases. *Malar J.* 2020;19(1):136.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Elaborado de acordo com a RESOLUÇÃO Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº SEXO M F

DATA NASCIMENTO/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO.....

BAIRRO CIDADE

CEP..... TELEFONE DDD (.....)

NOME/TELEFONE PARA RECADO

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE SEXO M F

DATA NASCIMENTO/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO

BAIRRO CIDADE

CEP..... TELEFONE DDD (.....)

NOME/TELEFONE PARA RECADO

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Illumigene Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos"

PESQUISADOR: Silvia Maria Di Santi

CARGO/FUNÇÃO: Orientadora do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias-FMUSP; Chefe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/IMTSP-USP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 01078-01 CRBio 01

2. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO:

1- Essas informações estão sendo fornecidas para esclarecer sobre a sua participação voluntária neste estudo. Nosso objetivo é investigar se um doador de sangue ou de órgãos/tecidos ou um receptor de órgãos/tecidos pode ter o parasito no sangue. A malária pode não apresentar sintomas e a pessoa pode estar infectada sem saber. Como a malária pode ser transmitida por transfusão ou doação de órgãos/tecidos, se o receptor estiver com suas defesas imunológicas baixas, poderá desenvolver malária grave.

2 - A sua participação na pesquisa consistirá em: a) responder um questionário para identificar situações de risco para adquirir malária, como viagens para áreas onde ocorre

a doença, contato com locais de mata, presença de mosquitos e febre sem diagnóstico, mesmo que muito tempo atrás; b) no caso de doação de sangue, além do sangue coletado normalmente na doação, coletaremos 1 tubo adicional de seu sangue (cerca de 5 mL) para realização de exames de malária. Não será necessário furar seu braço outra vez. Apenas 1 tubo adicional será acoplado ao sistema de doação. O volume total de sangue coletado não irá superar o limite máximo determinado em lei. Desta forma, não há qualquer risco ou desconforto adicional para você com a sua participação neste estudo. No caso de doadores ou receptores de órgãos/tecidos, será coletado 1 tubo de seu sangue (cerca de 5 mL) para realização de exames de malária.

3 – Você pode optar por receber o resultado dos exames para malária realizados para este estudo, lembrando que só serão feitos testes laboratoriais nos participantes que forem considerados de risco para ter adquirido malária e num grupo controle.

4 - Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Silvia Maria Di Santi, chefe do Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN/IMTSP, que pode ser encontrada no endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 1º andar, sala 107. São Paulo, SP.

Telefones (11) 3061-7013 ou 3081-8039. E-mail: santi@usp.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar - Fone: (11) 2661-7585/1548/1549- E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

5 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo para você.

6 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos indivíduos do estudo.

7 – Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

8 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

9 – Parte do material coletado nas duas amostras de sangue relacionadas a este projeto e informações sobre este material serão armazenadas em Biorrepositório (de acordo com a Resolução 441/2011) para análises em futuros projetos de pesquisa realizados por este mesmo grupo de pesquisadores.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

(...) SIM. Eu quero ser consultado (a) para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(...) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado (a) que um Comitê de Ética irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou doando.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Illumigene Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos". Eu discuti com a equipe da Dra. Silvia Maria Di Santi sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a informações sobre a pesquisa. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Declaro que recebi uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do paciente/representante legal *

Data ____/____/____

* Para casos de menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

ANEXO II

FICHA DE COLETA DE CANDIDATO A DOADOR DE SANGUE ()
 FICHA DE COLETA DE CANDIDATO A DOADOR DE ÓRGÃOS OU TECIDOS ()
 FICHA DE COLETA DE CANDIDATO A RECEPTOR DE ÓRGÃOS OU TECIDOS ()

PROJETO DE PESQUISA: Avaliação dos protocolos moleculares LAMP Illumigene Malaria e Malachite Green para detecção de infecções assintomáticas e sua aplicabilidade em práticas de hemoterapia e de transplantes de órgãos ou tecidos

NOME DO DOADOR: _____

NOME DO RECEPTOR: _____
 (Somente em casos de transplantes)

Nº IDENTIFICAÇÃO DO CANDIDATO NO BANCO DE SANGUE: _____

Nº IDENTIFICAÇÃO NO HOSPITAL (PRONTUÁRIO): _____
 (Somente em casos de transplantes)

DATA DOAÇÃO: _____

1. Assinalar a opção do perfil do candidato:

() doador morador ou com deslocamentos para municípios localizados em Bioma de Mata Atlântica, que não constam da lista de municípios com transmissão de malária nos últimos 3 anos (lista em anexo)

() doador com indicação de realização de testes para detecção de *Plasmodium*, que seja morador ou com deslocamentos para municípios com transmissão de malária nos últimos 3 anos, de acordo com a regulamentação brasileira (lista em anexo)

2. Residência ou deslocamento (s):

Estado _____ Cidade _____ Bairro _____

Estado _____ Cidade _____ Bairro _____

Estado _____ Cidade _____ Bairro _____

3. No local que indicou havia pernilongos? Foi picado?

() Não () Sim () Não se recorda

4. Apresentou sintomas nos últimos 5 anos (febre, dor de cabeça, tremores) sem diagnóstico e que desapareceram sem qualquer tratamento?

() Não () Febre () Dor de cabeça () Tremores () Outros

Se respondeu sim para qualquer dos sintomas, quando e por quanto tempo?

Contato: Mariana Aschar (11) 3081-8039