

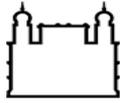
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Medicina Tropical

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE DELEÇÕES DOS GENES *pfhrp2* E
pfhrp3 DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* NO MUNICÍPIO DE BARCE-
LOS, REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS

DANIELA ROMERO BALLY

Rio de Janeiro
2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

DANIELA ROMERO BALLY

Estudo da prevalência de deleções dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* de *Plasmodium falciparum* no município de Barcelos, Região do Médio Rio Negro, Amazonas.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientador (es): Profa. Dra. Martha Cecília Suárez Mutis
Profa. Dra. Simone da Silva Santos

RIO DE JANEIRO
2021

Romero Bally, Daniela.

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE DELEÇÕES DOS GENES *pfhrp2* E *pfhrp3* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* NO MUNICÍPIO DE BARCELOS, REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS / Daniela Romero Bally. - Rio de Janeiro, 2021.

117 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2021.

Orientadora: Martha Cecília Suárez Mutis.

Co-orientadora: Simone da Silva Santos.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária - testes rápidos diagnósticos. 2. deleção gênica. 3. *pfhrp2*. 4. *pfhrp3*. 5. Amazônia. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: DANIELA ROMERO BALLY

TÍTULO DA TESE

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE DELEÇÕES DOS GENES *phrp2* E *pfhrp3* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* NO MUNICÍPIO DE BARCELOS, REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Martha Cecília Suárez Mutis
Prof. Dr. Simone da Silva Santos**

Aprovada em: 04/03/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Joseli de Oliveira Ferreira (Instituto Oswaldo Cruz) - **Presidente**
Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado (Universidade Federal Fluminense)
Prof. Dra. Paola Marchesini (Programa Nacional de Controle da Malária)
Prof. Dra. Dalma Maria Banic (Instituto Oswaldo Cruz)
Prof. Dra. Larissa Rodrigues Gomes (Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS)/Fiocruz)

Rio de Janeiro , 04 de fevereiro de 2021

Dedico a meus pais, irmãos e companheiro de vida

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras e aos alunos de iniciação científica que participaram dos experimentos do projeto.

Ao amparo de familiares e amigos.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo suporte e disponibilização de recursos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

“Um poeta desfolha a bandeira
E a manhã tropical se inicia
Resplendente, cadente, fagueira
Num calor girassol com alegria
Na geléia geral brasileira
Que o jornal do Brasil anuncia”

Gilberto Gil e Torquato Neto

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE DELEÇÕES DOS GENES *phrp2* E *pfhrp3* DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* NO MUNICÍPIO DE BARCELOS, REGIÃO DO MÉDIO RIO NEGRO, AMAZONAS.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Daniela Romero Bally

Introdução: Os testes rápidos para diagnóstico de malária (RDTs) mais usados se baseiam na identificação do antígeno HRP2 de *P. falciparum*. O antígeno HRP3, também presente no *P. falciparum* é um análogo estrutural do antígeno HRP2 e por isso pode ter reação cruzada com o HRP2 nesses testes. O antígeno HRP2 é expresso pelo gene *phrp2*, enquanto o antígeno HRP3 é expresso pelo gene *pfhrp3*. São crescentes os estudos que relatam deleções naturais dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em *P. falciparum* em diversos países endêmicos para malária, inclusive em países que fazem fronteira com o Brasil. No país foi descrita a presença de isolados mutantes circulando na região da Bacia do Rio Amazonas. A confirmação da presença de parasitos com essas deleções em áreas endêmicas do país é fundamental, visto que indivíduos infectados por *P. falciparum* com deleção dos genes *pfhrp2/3* podem apresentar resultados falso negativo no RDT. O **objetivo** deste estudo foi investigar a prevalência de deleções dos genes *pfhrp2/3* em amostras de pacientes infectados com *P. falciparum* de área endêmica de malária no Brasil no período de 2003 a 2016, e bem como identificar a população acometida e a diferenciação clínica entre indivíduos infectados por parasitos com deleção e parasitos sem deleção. **Métodos:** Foram analisadas amostras procedentes do biorrepositório do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz coletadas no período de 2003 a 2016 no município de Barcelos (AM) de indivíduos sintomáticos e assintomáticos infectados por *P. falciparum*. O diagnóstico de *Plasmodium* spp. foi realizado através da detecção do gene 18S de rRNA por PCR. O controle de qualidade do DNA foi realizado pela amplificação de *msp1* e *msp2*. A detecção dos genes *phrp2* e *pfhrp3* foi realizada de acordo com protocolos publicados e bem padronizados pela OMS. **Resultados:** Foram selecionadas 82 amostras, 28 amostras apresentaram deleção exclusiva do gene *phrp2*, 19, deleção exclusiva do gene *pfhrp3* e 15 dupla deleção. Infecção assintomática ocorreu com mais frequência em indivíduos mais velhos e com grande número episódios prévios da doença. A chance de um indivíduo assintomático estar infectado por um parasito com dupla deleção foi maior do que entre os sintomáticos. **Conclusão:** A alta prevalência de parasitos com deleções de *pfhrp2/3* encontrada no município de Barcelos é motivo de preocupação e mostram a necessidade de se implementar um programa de vigilância para monitorar e mapear deleções de *pfhrp2/3* nesta área e em outros locais da região amazônica. O padrão clínico pode estar associado às deleções encontradas nos parasitos infectantes.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF THE PREVALENCE OF DELETIONS FROM THE GENES *phrp2* AND *pfhrp3* OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN THE MUNICIPALITY OF BARCELOS, MIDDLE RIO NEGRO REGION, AMAZONAS.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN TROPICAL MEDICINE

Daniela Romero Bally

Introduction: The most used rapid tests for the diagnosis of malaria are based on the identification of the *P. falciparum* antigen HRP2. The HRP3 antigen, also present in *P. falciparum*, is a structural analogue of the HRP2 antigen and, therefore, may cross-react with HRP2 in these tests. The HRP2 antigen is expressed by the *pfhrp2* gene, while the HRP3 antigen is expressed by the *pfhrp3* gene. Studies reporting natural deletions of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *P. falciparum* are growing in several countries endemic for malaria, including countries bordering Brazil. In the country, the presence of mutant isolates circulating in the Amazon River Basin region has been described. Confirmation of the presence of parasites with these deletions in other endemic areas of the country is fundamental, since individuals infected with *P. falciparum* with deletion of the *pfhrp2/3* genes can present false negative result in the RDT. The **objective** of this study was to investigate the deletions of the *pfhrp2/3* genes in samples from patients infected with *P. falciparum* in an endemic area for malaria in Brazil from 2003 to 2016, in order to describe the prevalence of the gene (s) (s) deleted in the studied endemic area; as well as to identify the affected population and the clinical differentiation between individuals infected by parasites with deletion and parasites without deletion. **Methods:** Samples from the biorepository of the Laboratory of Parasitic Diseases of the Oswaldo Cruz Institute collected from 2003 to 2016 in the municipality of Barcelos (AM) from symptomatic and asymptomatic individuals infected with *P. falciparum* were analyzed. The diagnosis of *Plasmodium spp.* was performed by detecting the 18S rRNA gene by PCR. DNA quality control was performed by amplifying *msp1* and *msp2*. The detection of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes was carried out according to published protocols and well standardized by the WHO. **Results:** 82 samples were selected, 28 samples showed exclusive deletion of the *pfhrp2* gene, 19, exclusive deletion of the *pfhrp3* gene and 15 double deletion. Asymptomatic infection occurred more frequently in older individuals and with a large number of previous episodes of the disease. The chance of an asymptomatic individual being infected by a parasite with double deletion was greater than among symptomatic individuals. **Conclusion:** The high prevalence of parasites with deletions of *pfhrp2/3* found in the municipality of Barcelos is a cause for concern and shows the need to implement a surveillance program to monitor and map deletions of *pfhrp2 / 3* in this area and elsewhere in the Amazon region. The clinical pattern may be associated with the deletions found in the infectious parasites.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. HISTÓRICO, EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA MALÁRIA.....	3
2.2. CICLO DO <i>PLASMODIUM SP.</i> E PATOGÊNESE DA MALÁRIA.....	10
2.3. DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA.....	14
2.4. TRATAMENTO DA MALÁRIA	22
2.5. DELEÇÃO DOS GENES <i>pfhrp2</i> E <i>pfhrp3</i>	23
3. JUSTIFICATIVA	32
4. OBJETIVOS.....	33
4.1. OBJETIVO GERAL.....	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1. LOCALIDADES E POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	34
5.1.1. MUNICÍPIO DE BARCELOS.....	34
5.1.2. MALÁRIA EM BARCELOS.....	36
5.2. METODOLOGIA.....	37
5.2.1. DEFINIÇÃO DA MALÁRIA E PORTADOR ASSINTOMÁTICO..	38
5.2.2. COLETA DAS AMOSTRAS.....	38
5.2.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	39
5.2.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	40
5.2.5. CONTROLE DE QUALIDADE DO DNA	43
5.2.6. ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES <i>pfhrp2</i> E <i>pfhrp3</i>	46
5.2.7. ANÁLISE DE DADOS.....	48
5.2.8. ASPECTOS ÉTICOS.....	49
6. RESULTADOS.....	50
6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO.....	51
6.2. ANÁLISES DOS GENES DO ESTUDO.....	54
7. DISCUSSÃO.....	64
8. CONCLUSÕES.....	75
9. PERSPECTIVAS.....	76

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
11. APÊNDICE I.....	95
12. APÊNDICE II.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Distribuição da malária no Brasil em 2018.....	8
Figura 2.2. Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i>	12
Figura 2.3. Modo de ação dos RDTs para detecção de antígeno da malária.....	17
Figura 5.1. Localização geográfica do município de Barcelos.....	34
Figura 5.2. Esquema de PCR para diagnóstico de <i>Plasmodium falciparum</i>	40
Figura 5.3. Ilustração de <i>pfhrp2</i> e <i>pfhrp3</i> e locais de ligação ao iniciador.....	46
Figura 6.1. Fluxograma das amostras selecionadas.....	50
Figura 6.2. Idade vs número de episódios progressivos de malária em indivíduos com malária e infecção assintomática.....	53
Figura 6.3. Gel agarose da PCR do exon 2 do gene <i>pfhrp2</i> com o controle positivo HB3 em diferentes diluições.....	55
Figura 6.4. Gel agarose da PCR do exon 2 do gene <i>pfhrp3</i> com o controle positivo Dd2 em diferentes diluições.....	55
Figura 6.5. Gel agarose da primeira PCR para amplificação do exon 2 do gene <i>pfhrp2</i>	56
Figura 6.6. Gel agarose da reação semi-nested do exon 2 do gene <i>pfhrp2</i>	56
Figura 6.7. Gel agarose das amplificações dos genes <i>pfhrp3</i> na primeira PCR (A) e na reação semi-nested (B)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1. Número de amostras por ano de coleta.....	50
Tabela 6.2. Caracterização das amostras incluídas no estudo (n= 82).....	51
Tabela 6.3. Idade e antecedentes pregressos de malária segundo o sexo.....	52
Tabela 6.4. Características dos indivíduos das amostras segundo quadro clínico ao momento da coleta da amostra.....	58
Tabela 6.5. Resultados da amplificação do exon 2 dos genes <i>pfhrp2</i> e <i>pfhrp3</i>	58
Tabela 6.6. Caracterização das amostras de indivíduos infectados por parasitos com o gene <i>pfhrp2</i> deletado (n=43) e não deletado (n= 39) e com o gene <i>pfhrp3</i> deletado (n=34) e não deletado (n=48).....	61
Tabela 6.7. Caracterização das amostras de indivíduos infectados por parasitos com dupla deleção (n=15) e pelo menos um dos genes <i>pfhrp</i> não deletado (n=48).....	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C. antes de Cristo

Ag Antígeno

Ab Anticorpo

CNS Conselho Nacional de Saúde

d.C. depois de Cristo

DNA ácido desoxirribonucleico

EDTA ácido etilenediaminetetracético

FMTA Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

IFN- γ Interferon gama

IgG Imunoglobulina G

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IIQ Intervalo interquartil

IFA Incidência *Falciparum* Anual

IPA Incidência Parasitária Anual

G6PD Glicose-6-fosfato desidrogenase

Hb Hemoglobina

HDP Proteína de Desintoxicação de Heme

HRP Proteína rica em histidina

HRP1 Proteína 1 rica em histidina

HRP2 Proteína 2 rica em histidina

HRP3 Proteína 3 rica em histidina

kb quilobase

LDH Lactato desidrogenase

LDP Laboratório de Doenças Parasitárias

ng nanograma

pb par de bases

OMS Organização Mundial da Saúde

OPAS Organização Pan-Americana da Saúde

PCR Reação em cadeia da polimerase

P. falciparum *Plasmodium falciparum*

PfCRT Proteína de transporte transmembrana do *P. falciparum* cloroquina resistente

PHISTb Proteína exportada de *Plasmodium spp.*

PfHRP2 Proteína 2 rica em histidina do *P. falciparum*

PfHRP3 Proteína 3 rica em histidina do *P. falciparum*

PfLDH Lactato desidrogenase do *P. falciparum*

P. knowlesi *Plasmodium knowlesi*

pLDH Lactato desidrogenase de *Plasmodium spp.*

P. malariae *Plasmodium malariae*

P. ovale *Plasmodium ovale*

P. simium *Plasmodium simium*

P. vivax *Plasmodium vivax*

RDTs Testes rápidos para diagnóstico de malária

TBE Tris + ácido bórico + EDTA

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UV Ultravioleta

µL microlitro

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que em 2019, ocorreram 229 milhões de casos e 409.000 mortes por malária globalmente (WHO, 2020). Apesar dos progressos no controle da doença, ainda se trata de um desafio de saúde pública global, gerando impacto significativo no desenvolvimento social e econômico dos países acometidos (WHO, 2019). Desde o ano 2016, a Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030 (WHO, 2015) guia as ações dos países com a programação um “mundo livre da malária” nas próximas décadas. O Brasil é um país com áreas endêmicas para malária, sendo a Amazônia Legal o território de maior transmissão (BRASIL, 2020). Foram notificados 156.629 casos no país no ano de 2019 (OPAS, 2020); a espécie de plasmódio mais frequente no país é o *Plasmodium vivax*, seguido pelo *Plasmodium falciparum* (BRASIL, 2020).

A microscopia é a ferramenta preconizada para o diagnóstico de malária (WHO, 2019; BRASIL 2009); esta técnica identifica os parasitos por observação direta numa gota de sangue do paciente. A gota espessa exige perícia técnica e tem sua acessibilidade dificultada em determinadas regiões pela necessidade de microscópios e luz elétrica (BRASIL, 2009; WONGSRICHANALAI et al., 2007). Por outro lado, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método diagnóstico para malária dispendioso, não empregado de rotina, sendo reservado a pesquisas e situações clínicas específicas (BRONNER et al., 2011).

Na década de 1990 houve o desenvolvimento de testes rápidos que são atualmente amplamente adotados por sua facilidade de execução, não exigindo eletricidade ou técnica elaborada (MOUATCHO & GOLDRING, 2013). Os testes rápidos para diagnóstico de malária (RDTs) são úteis sobretudo nos cenários de áreas remotas com dificuldade de acesso (WHO, 2015). Os RDTs para diagnóstico de malária são testes imunocromatográficos de detecção de um ou mais de três antígenos produzidos exclusivamente pelo parasito da malária no sangue do ser humano infectado (WONGSRICHANALAI et al., 2007): a proteína 2 rica em histidina (HRP2 ou PfHRP2) e as enzimas desidrogenase láctica (LDH) e aldolase dos plasmódios (MOODY, 2002). Destes, os testes baseados na identificação da proteína 2 rica em histidina específica do *P. falciparum* são os mais utilizados. O antígeno da proteína 3 rica em histidina

(HRP3 ou PfHRP3), também presente no *P. falciparum* e que compartilha semelhanças estruturais com HRP2, pode reagir de forma cruzada com o anticorpo de HRP2 desses testes. O antígeno HRP2 é expresso pelo gene *pfhrp2*, enquanto o antígeno HRP3 é expresso pelo gene *pfhrp3* (BHARTI et al. 2016).

Os testes rápidos desempenharam e desempenham um papel importante no diagnóstico e tratamento precoce da doença (LIANG et al., 2020). O número de testes rápidos adquiridos aumentaram de 10 milhões em 2002 para 412 milhões em 2018 (THOMSON et al., 2020). Apenas em 2014, os testes rápidos foram responsáveis por 71% dos testes de diagnóstico utilizados para avaliar os casos suspeitos de malária no continente africano (WHO, 2015).

No entanto, a sensibilidade dos testes rápidos baseados na identificação da HRP2 em diferentes regiões endêmicas é variável (LEE et al., 2006). Isso ocorre por fatores relacionados ao dispositivo e por fatores parasitários (BELL et al., 2005; CHIODINI et al., 2007; GILLET et al., 2011), mas também porque RDTs baseados na identificação da HRP2 podem ser falso-negativos em indivíduos infectados com parasitos que apresentam deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*, resultando na ausência de expressão das respectivas proteínas (GAMBOA et al., 2010; KUMAR et al., 2013; MURILLO et al., 2015; THOMSON et al., 2020; WHO, 2020). Há registros crescentes de deleções dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em vários países endêmicos da malária (WHO, 2015; WHO 2020). No Brasil, já foi descrita a presença de isolados mutantes em três estados da região da bacia do Rio Amazonas (RACHID VIANA et al., 2017). Desde 2014 o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária (PNCM) utiliza para diagnóstico de malária o SD-BIOLINE MALARIA AG Pf/Pf/Pv, teste combinado que detecta os antígenos HRP2 e pLDH de *P. falciparum* devido à confirmação da presença de parasitos com essas deleções no Brasil e territórios vizinhos (BRASIL, 2020). No entanto, é indispensável descrever a ocorrência dos genes deletados em áreas brasileiras ainda não estudadas.

O objetivo deste estudo foi investigar a exclusão dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em amostras de pacientes infectados por *P. falciparum* de uma área endêmica de malária no Brasil coletadas no período de 2003 a 2016, a fim de descrever a ocorrência dos genes deletados na área estudada e identificar o perfil epidemiológico da população acometida, bem como a diferenciação clínica entre indivíduos infectados com parasitos com deleção e sem deleção dos genes citados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. HISTÓRICO, EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DA MALÁRIA

A malária é uma doença complexa causada por protozoários da classe Sporozoa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* spp., até o momento, não possui vacina eficaz (MINKAH et al., 2018). A afecção pode afetar mamíferos, pássaros e répteis, sendo as seguintes espécies responsáveis pela malária humana: *Plasmodium falciparum* (Welch 1898), *Plasmodium vivax* (Grassi & Filetti 1889), *Plasmodium ovale* (Stevens 1922) e *Plasmodium malariae* (Laveran 1881), descrito pela primeira vez como uma doença infecciosa de humanos por Golgi em 1886 (DESPOMMIER, 1995; MUELLER et al., 2007). O *P. malariae* pode infectar chimpanzés em condições naturais, enquanto *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* possuem exclusivamente humanos como hospedeiros vertebrados (REY, 2001).

A malária zoonótica ocorre quando humanos são infectados com espécies de parasitos da malária que infectam naturalmente primatas não humanos (BRASIL et al., 2017). Entre as espécies de plasmódio que podem infectar macacos, cinco deles foram documentados como potenciais agentes infecciosos para humanos: no Sudeste Asiático, *Plasmodium cynomolgi* (Mayer, 1907), *Plasmodium inui* (Halberstadter and Prowazek, 1907) (SATYA et al., 1962) e *Plasmodium knowlesi* (Sinton and Mulligan 1932) e na América do Sul, especificamente na Mata Atlântica do Brasil, *Plasmodium simium* (Fonseca 1951) e *Plasmodium brasilianum* (Gonder and Von Berenberg-Gossler, 1908) (DEANE, et al. 1967) (DEANE et al., 1966; COATNEY, 1971; SABBATANI, et al., 2010; BRASIL et al., 2017).

Provavelmente, a malária originou-se no continente africano, na pré-história, atingindo as regiões do Mediterrâneo, Mesopotâmia, Índia e Sudeste Asiático, com a migração humana. Os primeiros registros da doença estão em escrituras chinesas que remontam a 2.700 anos a.C. e em textos religiosos e médicos da Antiguidade. No século V a.C, Hipócrates descreveu seu quadro clínico e relacionou as doenças febris com a sazonalidade e a localidade. No século II d.C., ocorreram epidemias cíclicas na Europa, descritas por médicos gregos e romanos que a chamavam de "Febre romana". No século XVIII, a doença recebeu o nome italiano "*mal aire*", pela teoria dos "miasmas", a hipó-

tese era de que a doença estava associada ao ar insalubre dos pântanos (CDC, 2010; DE MENDONÇA, 2006).

Em 1880, o médico francês Charles Louis Alphonse Laveran observou, pela primeira vez, parasitos da malária em hemácias de pacientes febris na Argélia. A descoberta do agente etiológico da malária lhe rendeu o Prêmio Nobel em 1907 (CDC, 2010). Em 1897, o médico britânico Ronald Ross, na Índia, encontrou formas do parasito da malária no interior de um mosquito que havia picado um indivíduo sintomático. O ciclo completo do parasito da malária em seres humanos e no mosquito *Anopheles* spp. foi concluído em estudos posteriores entre 1898 e 1899 pelos pesquisadores italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Batista Grassi (CDC, 2010; DE MENDONÇA, 2006, DOOLAN et al., 2009).

A malária é um desafio até os dias atuais (WHO, 2019). A transmissão está intimamente associada a fatores climáticos e ecológicos por ocorrer pela picada de um vetor que pode ter características sazonais: a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* spp.. Também é descrita a infecção através de transfusão sanguínea e transmissão congênita. Condições ambientais e sociais são essenciais para a manutenção de áreas endêmicas em todo o mundo, porém fatores mais objetivos como o acesso a diagnóstico precoce e de qualidade interferem de forma determinante sobre a doença (WHO, 2019; WOLFARTH-COUTO et al., 2019).

A malária é também a doença tropical mais frequente em países não endêmicos, principal causa de febre pós-viagem e a afecção mais grave importada, sendo a causa mais comum de morte evitável entre as doenças infecciosas em viajantes (BRONNER et al., 2011). A gravidade em indivíduos provenientes de regiões livres de malária que se deslocam para áreas onde existe transmissão da doença está associada à susceptibilidade desses indivíduos (pouca ou nenhuma imunidade) e ao diagnóstico tardio ou errado quando regressam ao local de origem (BRASIL, 2020).

Estima-se que em 2018, ocorreram 228 milhões de casos e 405.000 mortes por malária globalmente. No continente africano ocorreram 213 milhões ou 93% de todos os casos estimados. Quase 85% das mortes globais por malária em 2018 foram concentradas em 20 países da Região Africana e na Índia (WHO, 2019).

Houve uma queda progressiva na taxa global de incidência da doença

nos últimos oito anos. Enquanto na Região Africana houve uma redução de 22% na taxa de incidência nesse período, nas regiões avaliadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) do Sudeste Asiático houve uma redução de 70%. Esses resultados promissores estão em concordância com as metas de redução da malária até 2030 da Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030, propostas em 2015 pela Assembleia Mundial da Saúde (WHO, 2015).

A Estratégia Técnica Global para Malária da OMS tem como meta a redução de pelo menos 90% dos casos até 2030 e a eliminação da malária em pelo menos 35 países; a partir de três pilares: garantir acesso universal à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento da malária; acelerar os esforços para a eliminação e obtenção do *status* livre de malária; e transformar a vigilância de malária em intervenção essencial (BRASIL, 2020; WHO, 2015).

Em contrapartida, em outras regiões avaliadas no Relatório Mundial da Malária 2019, da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve pouco progresso ou mesmo um aumento na taxa de incidência; é o caso das Américas, em grande parte pelo aumento da transmissão da malária na Venezuela (WHO, 2019). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) houve um aumento no número de casos em vários países da América Latina durante 2016 e 2017, após quase uma década (2005-2014) de declínio sustentado no número de casos na região. A área de garimpos na Venezuela, a costa pacífica da Colômbia e a região amazônica do Peru estão entre as áreas com maior transmissão na região. Pobreza, ocupação não planejada, atividades de risco de exposição aos vetores como a mineração e o crescimento de populações migrantes em situação de vulnerabilidade explicam o aumento de casos da doença (OPAS, 2018). De forma divergente, em 2018, o Paraguai e, em 2019, a Argentina receberam o certificado de países livres da malária. El Salvador e Belize completam em 2020, três anos sem transmissão local da doença, indo na direção da certificação (OPAS, 2020).

Malária no Brasil

A chegada da malária ao Novo Mundo pode ter ocorrido com os colonizadores espanhóis e portugueses a partir do século XVI, porém também pode estar relacionada a viagens transpacificas de tempos mais remotos (DE MENDONÇA, 2006). O primeiro relato conhecido de malária brasileira foi em 1587, afetando os índios Tupinambá (COURA et al. 2006). Por análise molecular sugere-se que a malária por *P. falciparum* foi introduzida no Brasil com o tráfico de escravos africanos, em 1560. A origem da malária por *P. vivax* no Brasil é menos clara; embora estudos prévios comparativos da diversidade genética das populações de parasitos nas Américas com as da Ásia e Oceânia, demonstrarem que as populações do Novo Mundo apresentam baixa diversidade genética consistente com uma introdução recente, dados moleculares sugerem que essa espécie foi introduzida na América do Sul 15.000-30.000 anos atrás (TAYLOR et al. 2013, GRIFFING et al. 2015).

Epidemias em grande escala no país estão associadas à indústria da borracha na Amazônia, e à construção de ferrovias, em esforços para interconectar as vastas terras inexploradas do Brasil interior por trens e fios telegráficos (COURA et al. 2006, GRIFFING et al. 2015). Durante a construção do Ferrovía Madeira-Mamoré no atual Estado de Rondônia em 1907–1912, estima-se que cerca de 10.000 pessoas morreram por malária (CARLOS et al., 2019). A abolição da escravatura em 1888 interrompeu a indústria agrícola o que resultou em sistemas de irrigação e drenagem abandonadas na Baixada Fluminense, planície costeira do Rio de Janeiro e partes do estado de São Paulo. Essas regiões foram hiperendêmicas por décadas (GRIFFING et al. 2015).

A primeira campanha antimalárica realizada no Brasil foi em 1905, durante a construção do porto de Santos, no estado de São Paulo. A introdução de *Anopheles gambiae* (Giles, 1926) no Nordeste por barcos vindos da África na década de 1930 foi responsável por uma epidemia no país com cerca de 14.000 mortes entre 1938-1939. Uma campanha nacional iniciada em 1938 eliminou o mosquito em dois anos. Ocorreu consistente redução do número total de casos de malária no Brasil e eliminação quase total da doença na região extra-amazônica nas décadas de 1950-60, com novas campanhas de controle, a criação do Serviço Nacional de Malária e com o advento do dicloro-difenil-tri-

cloroetano (DDT) e da cloroquina (CARLOS et al., 2019).

Os casos de malária aumentaram significativamente na Região Amazônica, devido a mudanças demográficas durante o regime militar na década de 1970 (FERREIRA & CASTRO, 2016). Novas migrações humanas geraram impacto no ecossistema Amazônico, como desmatamento e mudanças nos fluxos de rios, lagos e pântanos, e resultaram em um aumento progressivo nos casos. Toda a Região Norte experimentou um aumento dramático nos casos de malária nas décadas de 70 e 80. Na década de 90, a malária permaneceu como uma doença endêmica na Região Amazônica, em resposta, foi criado o Programa Nacional de Controle da Malária no início dos anos 1990 (FERREIRA & CASTRO, 2016; CARLOS et al., 2019).

Nos últimos 30 anos, houve flutuações no número de casos de malária, com picos de cerca de 600.000 casos em 1998–2000 e 2004–2006. No ano de 2019, o Brasil notificou 157.454 casos de malária, uma redução de 19,1% em relação a 2018, em que foram registrados 194.572 casos. A malária *falciparum* e mista também apresentou queda, com 21.126 casos notificados em 2018 e 17.139 em 2019, uma redução de 18,9%. (BRASIL, 2020; OPAS, 2020).

Todavia, a malária permanece no Brasil. A doença também é conhecida como paludismo, febre terçã (benigna se infecção por *P. vivax* ou maligna se infecção por *P. falciparum*), febre quartã (se infecção por *P. malariae*), treme-deira, batedeira ou febre (GOMES et al., 2011), entre outros. A transmissão da malária no país geralmente ocorre em áreas rurais, em comunidades ribeirinhas, assentamentos, áreas indígenas e garimpos, mas também são registrados casos em áreas urbanas e periurbanas (BRASIL, 2020). Cerca de 99% da transmissão da malária concentra-se na região da Amazônia Legal, onde as condições ambientais são propícias para a manutenção da doença. A Amazônia Legal engloba 9 estados (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) e 808 municípios (Figura 1) (BRASIL, 2020; TADEI et al., 1998; WOLFARTH-COUTO et al., 2019). Na Amazônia Legal, a transmissão é em grande parte autóctone de *P. vivax*, espécie responsável por cerca de 90% de todos os casos no país, e de *P. falciparum* por mosquitos do subgênero *Nyssorhynchus*, principalmente *Anopheles darlingi* (Root, 1926) (CARLOS et al., 2019). O *P. vivax*, embora com menor virulência comparado ao *P. falciparum* está associado também ao aparecimento de casos complicados, inclusive com mortes (BRASIL, 2020). O controle das infecções

por *P. vivax* é particularmente desafiador pelas características biológicas únicas da espécie que incluem baixa parasitemia que pode ser indetectável por microscopia, formas latentes, infecções assintomáticas assim como a presença precoce de gametócitos que favorecem a manutenção do reservatório do parasito (CARLOS et al. 2019; BRASIL, 2020). Enquanto a transmissão de *P. vivax* é generalizada, a transmissão de *P. falciparum* é restrita a áreas delimitadas principalmente nos Estados do Amazonas e Acre (CARLOS et al., 2019).

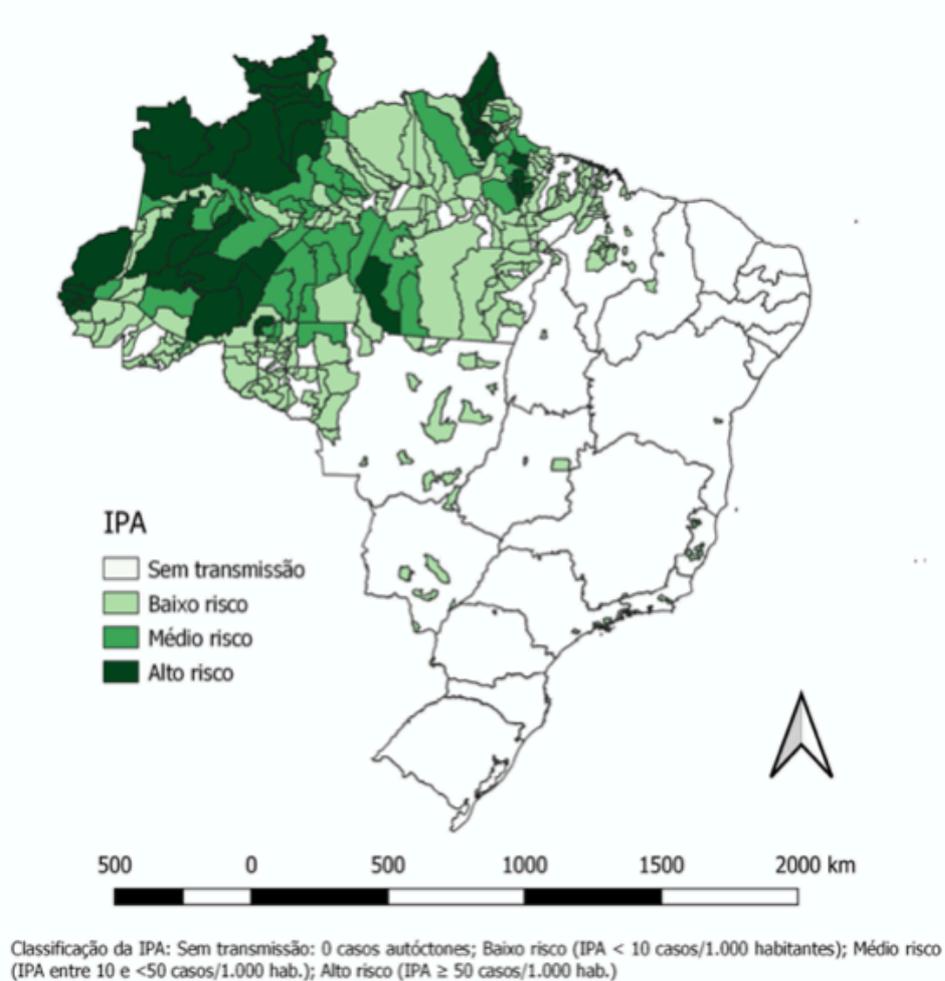


Figura 2.1. Distribuição do risco de transmissão da malária no Brasil, baseando-se nos registros dos níveis de incidência parasitária anual (IPA) do ano de 2018. (Extraído de BRASIL, 2020. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/jpeg/2020/June/02/IPA-2018.jpeg>).

A região extra-amazônica é responsável por menos de 1% do total de casos notificados no Brasil (BRASIL, 2020), que ocorrem predominantemente na Mata Atlântica, onde a transmissão autóctone de *P. vivax* se dá tipicamente através dos mosquitos associados a bromélias *Anopheles cruzii* (Dyar & Knab, 1908) e *Anopheles bellator* (Dyar & Knab, 1906) do subgênero *Kerteszia*. Há

estudos recentes de infecção humana por *P. simium* no Rio de Janeiro. A distinção dessa espécie com o *P. vivax* por exame microscópico é impraticável, necessitando de técnicas moleculares mais sofisticadas para o diagnóstico da espécie. O tratamento, no entanto, é idêntico ao de malária por *P. vivax* e sua evolução é benigna (BRASIL, 2020; BRASIL et al., 2017). Ao longo da costa brasileira a transmissão de *P. vivax* ocorre principalmente pelo *Anopheles aquasalis* (Curry, 1932) (DEANE, 1986; CARLOS et al., 2019). A malária na Região Extra-Amazônica apresenta maior letalidade devido ao retardo no diagnóstico e no tratamento e pelas infecções importadas de países endêmicos das Américas, África e Ásia, associadas ao *P. falciparum*, parasito de maior virulência (BRASIL, 2020). Os estados da região extra-amazônica que mais registram casos autóctones de malária são: Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia e Paraná (BRASIL, 2020). No Estado do Espírito Santo e São Paulo, altos percentuais de anticorpos IgM e IgG para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum* foram detectados entre pessoas sem sintomas de malária, sugerindo taxas de exposição elevadas (CERUTTI, et al., 2007; CURADO et al., 2006; COUTO et al., 2010).

Dados recentes mostram que de janeiro a setembro de 2019, foram notificados 354 casos de malária em território brasileiro Extra-Amazônico, sendo 70 associados ao *P. falciparum*, grande parte importados; enquanto 151.966 casos foram registrados em 2019 na região Amazônica, sendo 16.495 casos (10,9% do total) de infecção isolada ou mista por *P. falciparum* (BRASIL, 2020). O Amazonas foi o estado mais acometido pelo *P. falciparum* (BRASIL, 2020). Em 2019, São Gabriel da Cachoeira (AM) foi o município com o maior número de casos autóctones de malária *falciparum* e mista, seguido por Barcelos (AM). Porém a cidade de Cruzeiro do Sul no Acre também recebe destaque, sendo classificada como o terceiro município prioritários para malária *falciparum* e malária mista em 2019 (BRASIL 2020). As razões para o alto número de casos de *P. falciparum* na parte mais ocidental da Amazônia Brasileira são mal compreendidas. Migrações humanas e a expansão da piscicultura na região podem estar associadas (CARLOS et al., 2019). A transmissão de *P. malariae* é eventual, enquanto casos autóctones de malária por *P. ovale* não foram registrados no Brasil (BRASIL, 2020).

2.2. CICLO DO *PLASMODIUM SP.* E PATOGÊNESE DA MALÁRIA

Os plasmódios são parasitos heteroxenos (Figura 2), ou seja, com obrigatoriedade de um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado para sobreviver (SILVA, 2019). O ciclo no homem inicia-se com a inoculação de esporozoítos, a forma infectante do parasito, na corrente sanguínea do hospedeiro humano, através da picada do mosquito fêmea do gênero *Anopheles* spp. (CDC, 2020). Os esporozoítos que conseguem escapar do sistema mononuclear fagocitário penetram no fígado, para se replicar dentro dos hepatócitos (GOMES et al., 2011). O desenvolvimento do parasito nos hepatócitos requer aproximadamente, em média, seis dias para o *P. falciparum*, oito para o *P. vivax*, e cerca de duas semanas para o *P. malariae* (BRASIL, 2020). Ali eles se multiplicam por esquizogonia exoeritrocítica, dando origem aos esquizontes teciduais que ao se romperem liberam milhares de merozoítos. Quando essas formas alcançam os capilares intra-hepáticos e a corrente sanguínea inicia-se o ciclo eritrocítico da doença (GOMES et al., 2011; CDC, 2020). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, alguns parasitos ficam em estado de latência no fígado. Estas formas latentes são denominadas hipnozoítos e são responsáveis pelos episódios de recaída da doença, que ocorrem após períodos variáveis de incubação, geralmente dentro dos seis primeiros meses após o tratamento sem o medicamento hipnozoiticida (BRASIL, 2020) ou mesmo anos.

Parte dos merozoítos na corrente sanguínea são fagocitados, porém outra parte interage com as proteínas na superfície do eritrócito e por adesão o parasita consegue entrar nas hemácias. Após invasão os merozoítos se desenvolvem e estes em esquizontes sanguíneos, que se rompem liberando merozoítos no processo denominado esquizogonia eritrocítica. Sucessivos parasitos crescem dentro dos glóbulos vermelhos e os destroem, liberando merozoítos que continuam o ciclo invadindo outros glóbulos vermelhos. Com a ruptura das hemácias infectadas e a liberação dos merozoítos, ocorrem os paroxismos febris (GOMES et al., 2011; CDC, 2020). A crise aguda da malária, chamada de acesso malárico, caracteriza-se por episódios de calafrio, febre e sudorese; tem duração variável de 6 a 12 horas e pode cursar com temperatura igual ou superior a 40°C (BRASIL, 2020). Esses episódios podem vir acompanhados de náuseas, vômitos, dores de cabeça e musculares (SUÁREZ-MUTIS et al, 2005;

SILVA et al., 2019). Após os primeiros paroxismos, a febre pode passar a ser intermitente (BRASIL, 2020). A periodicidade da esquizogonia sanguínea do *Plasmodium falciparum* é de 36 a 48 horas e a febre esperada a cada 2 dias (febre terçã), assim como *P. vivax* enquanto o ciclo do *Plasmodium malariae* é de 72 horas e a febre prevista a cada 3 dias (febre quartã). No entanto, nem sempre se observa o clássico padrão de febre e não se deve esperar esse padrão característico para pensar no diagnóstico (SUÁREZ-MUTIS et al, 2005; BRASIL, 2020).

O período de incubação da malária, ou seja, o período entre a picada e o primeiro acesso malárico, varia de acordo com a espécie de plasmódio. A infecção por *P. falciparum* apresenta período de incubação mais curto: de 8 a 12 dias; enquanto em infecções por *P. vivax*, 13 a 17 dias e por *P. malariae*, 18 a 30 dias (BRASIL, 2020).

Alguns merozoítos se diferenciam em estágios eritrocitários sexuais chamados gametócitos, que podem ser de dois tipos, diferenciados microscopicamente nos esfregaços sanguíneos: os microgametócitos (masculinos) e os macrogametócitos (femininos) (BRASIL, 2009). Infecções por *P. vivax* apresentam gametócitos circulantes desde antes do início da infecção clínica, enquanto a infecção por *P. falciparum* costuma apresentar gametócitos na circulação periférica apenas após sete dias de infecção (BRASIL, 2020). Os gametócitos são ingeridos pela fêmea do mosquito *Anopheles sp.*, seguindo seu desenvolvimento sexuado no vetor onde ocorrerá o ciclo esporogônico (BRASIL, 2009; GOMES et al., 2011). Após a fecundação dos gametócitos os zigotos são formados no estômago do mosquito e se tornam móveis e alongados (ocineto) e invadem a parede intestinal do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos, no interior do qual se desenvolverão os esporozoítos (BRASIL, 2009).

Os oocistos crescem, rompem e liberam os esporozoítos na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares. O tempo do ciclo esporogônico nos insetos esta entre 10 a 12 dias e pode sofrer variações de acordo com a espécie de plasmódio e com a temperatura. A inoculação dos esporozoítos em um novo hospedeiro humano, durante o repasto sanguíneo, perpetua o ciclo de vida do *Plasmodium spp.* (BRASIL, 2009).

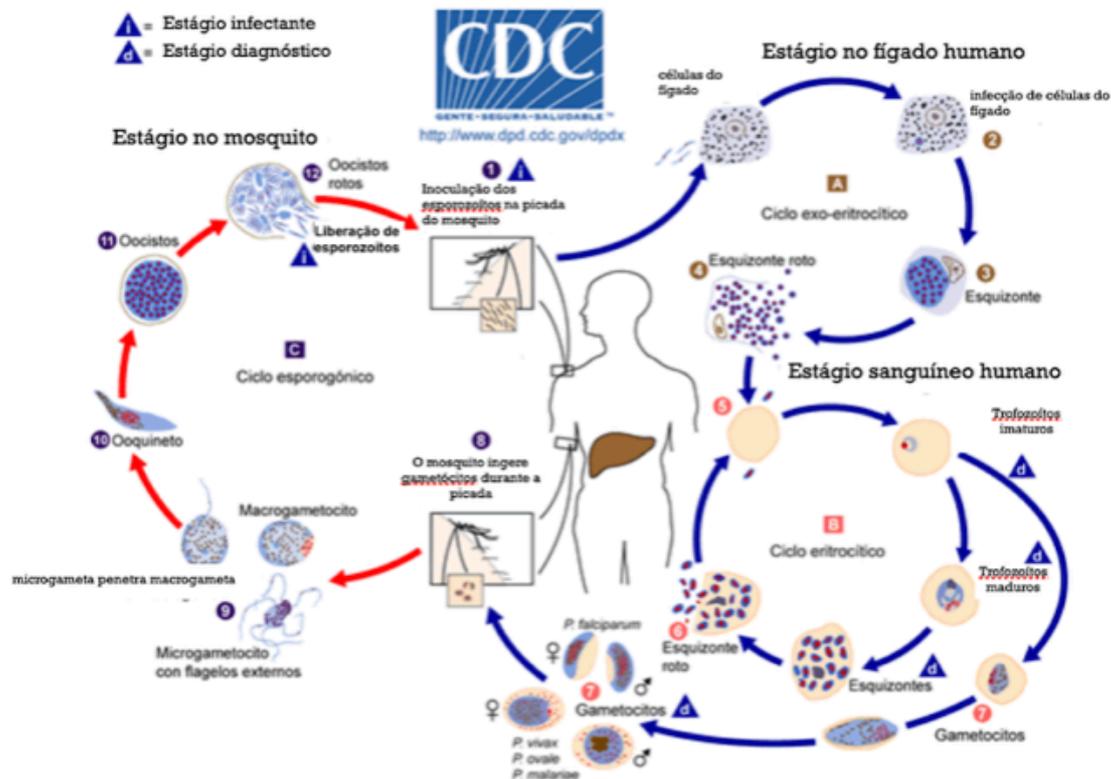


Figura 2.2. Ciclo de vida do *Plasmodium* sp. (Extraído e adaptado de CDC, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>).

O quadro clínico da malária depende da espécie do parasito, da quantidade de parasitos circulantes (parasitemia), do tempo de doença e do nível de imunidade adquirida pelo paciente (BRASIL, 2020).

As formas graves de malária acometem predominantemente hospedeiros primoinfectados, como viajantes procedentes de áreas não endêmicas, pois habitantes de áreas endêmicas submetidos a infecções recorrentes podem desenvolver imunidade de forma lenta e variável (DOOLAN et al., 2009; NAHRENDORF et al., 2020); gestantes e crianças menores de cinco anos também podem ter doença grave (SUÁREZ-MUTIS et al., 2005, BRASIL, 2020).

O papel protetor dos anticorpos adquiridos passivamente contra a malária é discutível (RILEY et al., 2000), no entanto, recém-nascidos de áreas de alta transmissão parecem protegidos naturalmente da malária grave durante seis meses, possivelmente pela transferência de anticorpos IgG maternos (SILVA et al., 2019) e por fatores inibidores do crescimento do parasita, como lactoferrina e IgA secretora encontrados no leite materno e no soro materno e

infantil (KASSIM et al., 2000; DOOLAN et al., 2009). Crianças com mais de seis meses e menos de cinco anos representam um grupo de risco de malária grave em áreas de transmissão intensa, e responderam por 67% (272.000) de todas as mortes por malária no mundo em 2018, representando o maior risco no adoecimento (WHO, 2019). Por volta dos cinco anos de idade, a frequência da doença clínica começa a diminuir e o risco de mortalidade diminui drasticamente. A idade de início desta proteção é mais cedo com transmissão mais intensa, mas raramente antes dos dois anos de idade (DOOLAN et al., 2009). Nessas crianças, alta densidade parasitária pode ocorrer na ausência de sintomas clínicos (DOOLAN et al., 2009; NAHRENDORF et al., 2020; DEMOLUE et al., 2017). Na vida adulta, ocorre o fenômeno de alto grau de responsividade imunológica em conjunto com densidades baixas de parasitos (imunidade “pré-união”), onde o portador assintomático é a regra entre os adultos. No entanto, isso não se aplica a mulheres grávidas, que voltam a apresentar susceptibilidade acentuada às formas graves de malária (SUAREZ-MUTIS & COURA, 2007; DOOLAN et al., 2009). Quando esses adultos são removidos da localidade endêmica que habitam e, por consequência, da exposição rotineira a infecções por *P. falciparum*, ocorre a perda dessa imunidade, o que sugere se tratar de uma imunidade mediada diretamente pela presença dos parasitos e não pelo contato do sistema imune com infecções anteriores, de forma semelhante a infecções por helmintos (DOOLAN et al., 2009).

O *P. falciparum*, por apresentar uma duração menor do ciclo tecidual, maior produção de merozoítos durante as esquizogonias, pela capacidade de infectar hemácias de qualquer idade e pela fisiopatologia própria, pode produzir hiperparasitemias com potencial para o desenvolvimento de quadro clínico mais grave da doença. As infecções pelo *P. falciparum* associa-se a maior incidência de anemia grave, pela destruição elevada e rápida de hemácias assim como malária cerebral, complicações respiratórias e renais por quadros de trombose e embolias (SUÁREZ-MUTIS et al., 2005; GOMES et al., 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Plasmodium falciparum* foi responsável por mais de 90% de todas as mortes em 2017 (WHO, 2018).

A codificação do genoma do *P. falciparum*, apresentada pela primeira vez em 2002, permitiu a identificação de proteínas envolvidas nos mecanismos de patogenicidade particulares dessa espécie que potencializam o risco de casos

graves e fatais (FLORENS et al., 2002). Após adentrar a hemácia, o parasito promove mudanças na sua membrana celular que levam a aderência das hemácias infectadas às células endoteliais de vasos pós-capilares de órgãos como cérebro, pulmões e rins (FINNEY et al., 2010; NAHRENDORF et al., 2020). Knobs e outras adesinas facilitam a citoaderência (FRANCISCHETTI et al., 2008). Também ocorre um processo no qual as hemácias infectadas se aderem à hemácias não infectadas, tornando-se rígidas e promovendo a formação de agregados celulares denominados “rosetas”. As “rosetas” podem bloquear o fluxo sanguíneo na microcirculação (DONDORP et al., 2008). Parasitemias maiores ou iguais a 5% de hemácias infectadas são relacionadas a formas mais graves da doença, pelo maior acometimento da microcirculação e pela presença de efeitos metabólicos deletérios como a hipoglicemia e a acidose láctica (GOMES et al., 2011).

2.3. DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA

Os sinais e os sintomas provocados pelo *Plasmodium spp.* não são específicos, assemelhando-se aos de outras doenças febris agudas tais como dengue, chikungunya, zika, febre amarela. Essa ausência de especificidade dos sinais e sintomas dificulta o diagnóstico clínico da doença. Dessa forma, o diagnóstico e a tomada de decisão para o tratamento da malária deve ser sempre baseada na confirmação laboratorial (BRASIL, 2020). O diagnóstico laboratorial de malária baseia-se na visualização do parasito por meio de microscopia ótica da gota espessa corada com azul de metileno e Giemsa. Considerado o padrão ouro, identifica os parasitos a partir da análise da sua morfologia e dos seus estádios de desenvolvimento encontrados no sangue periférico (BRASIL, 2009; WONGSRICHANALAI et al., 2007).

A técnica demanda cerca de 60 minutos entre a coleta do sangue e o fornecimento do resultado. Um técnico experiente pode diferenciar no exame da gota espessa as espécies e o estágio de evolução do parasito circulante. Um esfregaço delgado permite a melhor visualização das formas porém a sensibilidade do diagnóstico é menor que a da gota espessa (BRASIL, 2020). O exame microscópico da gota espessa possibilita detectar densidades baixas de parasitos (5-10 parasitos/ μ L de sangue), quando o exame é feito por

profissional experiente. Contudo, nas condições de campo, a capacidade de detecção é de 100 parasitos/ μ L de sangue. Pode-se ainda calcular a densidade da parasitemia em relação aos campos microscópicos examinados, o que tem maior utilidade nas infecções por *P. falciparum*, pois alta parasitemia representa maior risco de formas graves da doença (BRASIL, 2020).

Porém determinados fatores podem reduzir o acesso a essa técnica diagnóstica. A gota espessa depende da qualidade dos reagentes utilizados e de pessoal técnico bem treinado e experiente no preparo e leitura das lâminas. Também é necessária permanente supervisão e controle de qualidade do diagnóstico de malária como é recomendado no Brasil (BRASIL, 2020). Outra dificuldade encontrada, é que serviços de microscopia e laboratórios de parasitologia podem apresentar disponibilidade apenas durante o horário expediente, enquanto o diagnóstico de malária deve ser rápido para evitar atrasos no tratamento adequado, inclusive em plantões noturnos e em finais de semana (BRONNER et al., 2011). Por fim, a necessidade de microscópios e luz elétrica pode limitar se alcance dessa técnica diagnóstica em determinadas regiões (WONGSRICHANALAI et al., 2007).

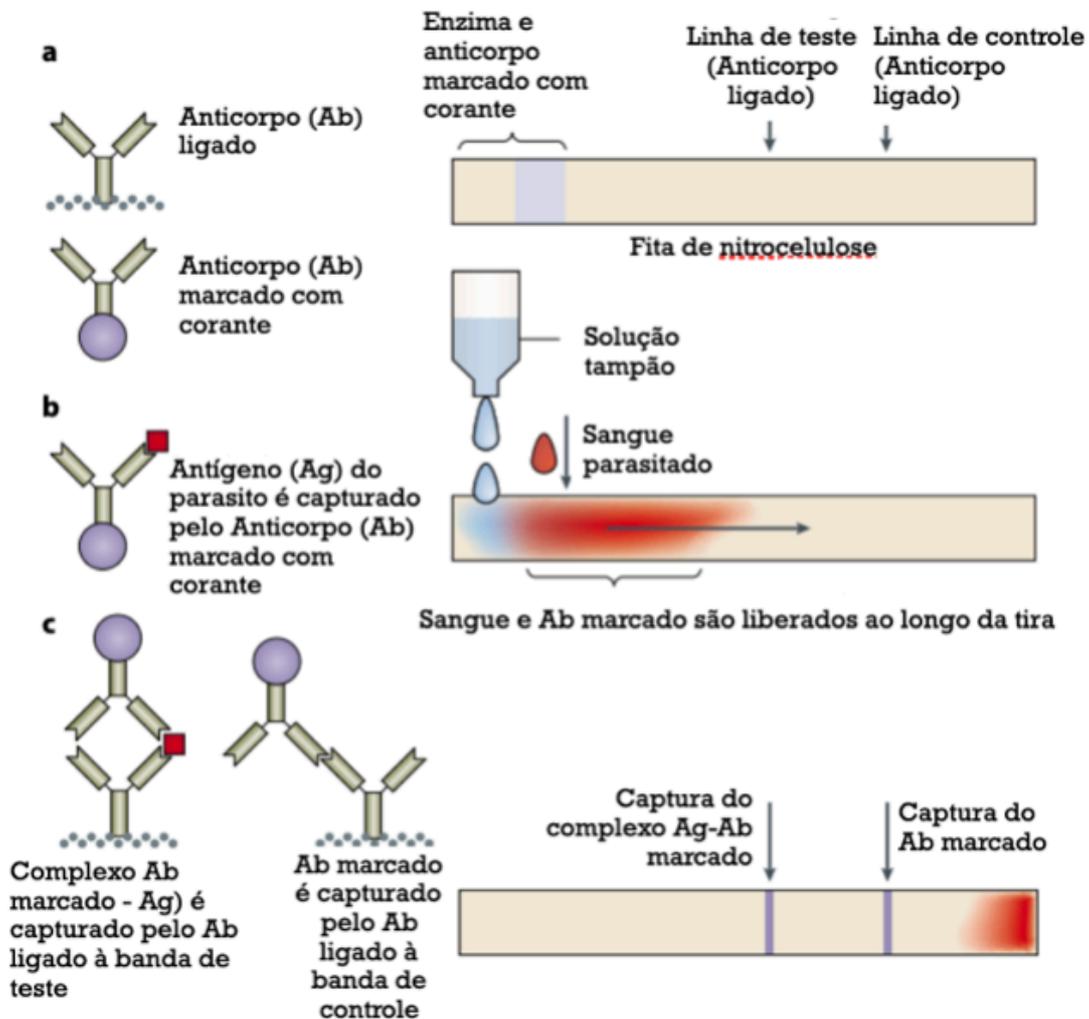
Outro método que pode ser empregado para o diagnóstico de malária é através da detecção molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta técnica possui altas sensibilidade e especificidade (COSTA et al., 2008) e é o método recomendado para diagnosticar infecções pauciparasitárias por qualquer espécie. No sudeste asiático o diagnóstico da infecção por *Plasmodium knowlesi* só pode ser realizado usando a PCR (BRONNER et al., 2011). PCR também é particularmente importante para a diferenciação da espécie de plasmódio quando os níveis do parasito estão muito baixos e na detecção de infecções mistas, mais difíceis de serem diagnosticadas por microscopia (BAKER et al., 1992; SNOUNOU et al., 1993; COSTA et al., 2008; BRONNER et al., 2011). No entanto, o diagnóstico molecular é um método de alto custo e complexidade. Consiste na extração do DNA de amostras de sangue de indivíduos com suspeita de infecção pelo parasito e na amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (TIRASOPHON et al., 1991; BAKER et al., 1992; SNOUNOU et al., 1993). Trata-se de um método viável apenas em laboratórios de referência, como de hospitais universitários. Portanto, a PCR não é

adequada para o diagnóstico de rotina de malária (COSTA et al., 2008; BRONNER et al., 2011).

Na década de 1990 houve o desenvolvimento de testes de cromatografia que permitiram a identificação de antígenos específicos do *Plasmodium spp.* por testes rápidos (MOUATCHO & GOLDRING, 2013). Os testes rápidos de diagnóstico (RDTs) para malária se tornaram uma alternativa viável à microscopia e à técnica molecular, pois não requerem laboratório, eletricidade, técnica elaborada ou equipamento especial; são de simples execução e fornecem um resultado positivo ou negativo em 20 minutos. Atualmente são testes amplamente adotados (WONGSRICHANALAI et al., 2007).

Os testes rápidos de diagnóstico (RDTs) para malária vêm em kits de testes individuais que detectam antígenos específicos para *Plasmodium spp.* presentes em um pequeno volume de sangue fresco (5 a 10µL) usando imunocromatografia de fluxo lateral (Figura 3). Os RDTs atualmente podem detectar apenas uma espécie (*P. falciparum*) ou várias espécies (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*). Quando o antígeno do parasito se liga ao anticorpo marcado com um corante, na fita de celulose, o complexo antígeno anticorpo é formado resultando em uma linha visível na janela de resultados (LIANG et al., 2020).

Os primeiros estudos sobre RDTs surgiram em 1990. O “ParaSight F”, (Becton Dickinson Microbiology Systems®, Sparks, Maryland), foi utilizado em pacientes no distrito de Bagamoyo, área endêmica de malária na Tanzânia em 1993, sendo comercializado em 1995 (SHIFF et al., 1993; LAFERI et al., 1997; CHIODINI, 2014). O teste detectava o antígeno HRP2 de trofozoítos de *P. falciparum* em 10 minutos com uma única gota de sangue. Quando comparado com a gota espessa o teste apresentava sensibilidade de 88,9% e especificidade de 87,5% (SHIFF et al., 1993). O “ParaSight F”, no entanto, não teve sucesso comercial e foi retirado do mercado em 2000. A justificativa provável é que no período, o tratamento empírico com cloroquina era mais econômico e recomendado para todos os casos suspeitos de malária (CHIODINI et al., 2014).



- (a) Anticorpo marcado com corante (Ab), específico para o antígeno alvo, está presente na extremidade inferior da fita de nitrocelulose. Um anticorpo também específico para complexo com o antígeno-alvo está ligado à linha do teste e outro anticorpo específico para anticorpo está ligado à linha de controle.
- (b) Sangue e solução tampão são colocados misturados com o anticorpo marcado com corante e são traçadas as linhas com anticorpo ligado.
- (c) Se o antígeno estiver presente, algum anticorpo marcado irá ser preso na linha de teste. Na linha de controle, outro anticorpo marcado preso se liga ao anticorpo marcado com ou sem o antígeno ligado.

Figura 2.3. Modo de ação dos RDTs para detecção de antígeno da malária. (Extraído e adaptado de Organização Mundial da Saúde, Genebra, Suíça, 2011).

Com o aumento da resistência à cloroquina e o advento de combinações à base de artemisinina para o tratamento da malária por *P. falciparum*, a OMS passou a recomendar a decisão de tratamento embasada pelo resultado de um teste diagnóstico eficaz (WHO, 2010) e o mercado de RDTs apresentou recuperação crucial, atingindo 205 milhões de vendas em 2012 (CHIODINI et al., 2014). Em 2015, o número estimado desses testes usados globalmente foi de 314 milhões (PLUCINSKI et al., 2017).

O primeiro antígeno HRP (proteína rica em histidina) foi descoberto na década de 1970 por Araxie Kilejian no Instituto Rockefeller enquanto trabalhava com o parasito aviário *Plasmodium iophuræ* (POTI et al., 2020). Esse antígeno apresenta conteúdo de histidina excepcionalmente alto e posteriormente foram identificados três diferentes antígenos HRPs, que ficaram conhecidos como: proteína 1 rica em histidina (HRP1), proteína 2 rica em histidina (HRP2) e proteína 3 rica em histidina (HRP3) (ROCK et al., 1987; POTI et al., 2020). Os antígenos HRP2 (ou PfHRP2) e HRP3 (ou PfHRP3) não são expressos em outras espécies de parasitos que causam malária humana, apenas pelo *P. falciparum* (ROCK et al., 1987). Esses antígenos são expressos no ciclo assexuado do *P. falciparum* no hospedeiro humano, com maior concentração em formas de merozoítos e menor nas formas trofozoítos e esquizonte (LEECH et al., 1984; SULLIVAN et al., 1996). O HRP2 também já foi identificado em gametócitos (HAYWARD et al., 2000). Essas características tornaram o HRP2 um bom alvo para o diagnóstico de infecção por *P. falciparum* (POTI et al., 2020).

Existem RDTs que detectam outros antígenos plasmodiais como as enzimas glicolíticas desidrogenase láctica (pLDH) e aldolase. Esses testes começaram a aparecer no final da década de 1990 (POTI et al., 2020). Embora essas proteínas estejam presentes em todas as espécies de parasitos de malária, é possível detectar o gênero *Plasmodium* spp. ou espécies individuais de acordo com o anticorpo utilizado. Por exemplo, há testes que identificam LDH espécie-específica para *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (BELL et al., 2006; BAKER et al., 2011; MOODY et al., 2002).

Em comparação com os RDTs baseados em HRP2, os RDTs que detectam pLDH específica para *Plasmodium falciparum* (Pf-pLDH) apresentam menor sensibilidade e menor estabilidade térmica (OCHOLA et al., 2006, CHIODINI et al., 2007). Segundo MAKLER & PIPER (2009), o antígeno HRP2 é muito resistente as condições adversas como temperatura. LI et al. (2017) publicaram uma metanálise comparando RDTs baseados na detecção de HRP2 e de Pf-pLDH, mostrando que a sensibilidade dos testes baseados em HRP2 é superior. O antígeno HRP2 é produzido quantidade abundante e os RDTs baseados em HRP2 normamente apresentam um desempenho superior quando comparados aos RDTs baseados em outros antígenos, sobretudo em baixas densidades parasitárias (WHO, 2018).

Um estudo prospectivo multicêntrico com 990 mulheres no segundo ou terceiro trimestre da gravidez, não infectadas pelo HIV, de dois ambientes diferentes endêmicos de malária em Uganda e Burkina Faso avaliou testes de diagnóstico rápido (RDTs) direcionados à proteína 2 rica em histidina (HRP2) e lactato desidrogenase do parasita (pLDH) e microscopia, em comparação com PCR. No momento da inscrição, a proporção de mulheres grávidas que eram positivas para *P. falciparum* por HRP2 / pan pLDH RDT, Pf pLDH / pan pLDH RDT, microscopia e PCR foi de 38%, 29%, 36% e 44% em Uganda e 21%, 16%, 15% e 35% em Burkina Faso, respectivamente. Todas as taxas de positividade do teste diminuíram durante o acompanhamento. Em comparação com a PCR, a sensibilidade do HRP2 / pan pLDH RDT, Pf pLDH / pan pLDH RDT e microscopia foi de 75,7%, 60,1% e 69,7% em Uganda, 55,8%, 42,6% e 55,8% em Burkina Faso, respectivamente. O estudo sugeriu que os RDTs baseados em HRP2 são o teste *point-of-care* mais apropriado para uso durante a gravidez, especialmente para mulheres sintomáticas (KYABAYINZE et al., 2016).

Houve um estudo em Gana que avaliou a precisão do diagnóstico de três RDTs para malária: CareStart (HRP2), CareStart (HRP2 / pLDH) e SD Bioline (HRP2 / pLDH); em 754 participantes dos dois principais hospitais públicos nos distritos de Kintampo de Gana de junho de 2014 a agosto de 2014. Em comparação com a microscopia, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e o ROC foram para CareStart (HRP2), 98,2%, 66,5%, 82,6%, 95,6%, 0,82; para CareStart (HRP2 / pLDH) 98,2%, 66,5%, 82,6%, 95,6%, 0,82 e para SD-Bioline (HRP2 / pLDH) RDTs 98,2%, 69,2%, 84,2%, 96,0%, 0,84 respectivamente. O desempenho tanto do RDTs baseados exclusivamente na detecção de HRP2 quanto RDTs baseados na detecção de HRP2/ pLDH foi aceitável em um corte de 25 ou mais parasitos por μ l de sangue (ADU-GYASI et al., 2018).

Os testes que identificam HRP2 como antígeno específico para o diagnóstico de malária por *P. falciparum* são os mais utilizados globalmente (GAMBOA et al., 2010; PLUCINSKI et al., 2017). No entanto, deve se ter em vista que o antígeno HRP2 foi escolhido como um antígeno adequado para teste rápido diagnóstico antes da disponibilidade dos dados genômicos e proteômicos atuais sobre *P. falciparum* (POTI et al., 2020).

Na última década houve uma expansão das intervenções de controle da malária e um declínio substancial na morbimortalidade global da doença. Um dos principais avanços dos programas de controle da malária foi o uso dos RDTs baseados na detecção de HRP2. Os RDTs no Brasil são utilizados em situações onde é complicado processar o exame da gota espessa, como em áreas de difícil acesso e mesmo em áreas urbanas, em plantões noturnos por exemplo ou na falta de microscopistas. Atualmente, uma abordagem otimista destaca alvos de eliminação do *P. falciparum*, incluindo o Brasil, até 2030, com o auxílio de ferramentas como os testes rápidos diagnósticos (WHO, 2015). Há dados promissores como a mortalidade relacionada a malária ter diminuído em 60% na África desde 2000 e o fato que, somente em 2017, os testes rápidos foram responsáveis por mais de 75% dos testes de diagnóstico utilizados para avaliar os casos suspeitos de malária na África Subsaariana (WHO, 2019). Em estudo realizado de novembro de 2007 a janeiro de 2008 para avaliar a precisão do teste de um RDT em Camarões, o risco de ter uma falha clínica com tratamento presuntivo de crianças febris foi sete vezes maior do que com o uso de RDTs (SAYANG et al., 2009).

No entanto, a sensibilidade dos testes rápidos baseados na identificação da HRP2, apesar de ter sido comparável à microscopia de qualidade nos primeiros estudos, começou a se apresentar de forma variável em estudos posteriores em diferentes regiões endêmicas (LEE et al., 2006; GAMBOA et al., 2010). Isso acendeu um alerta para a Organização Mundial de Saúde, que desenvolveu um Programa de Avaliação de RDTs para Malária (WHO, 2015; POTI et al., 2020).

Variações na sensibilidade dos RDTs podem ocorrer por fatores relacionados ao dispositivo como a qualidade de fabricação, condições de armazenamento, técnicas de realização, interpretação dos resultados (CHIODINI et al., 2007), além de fatores parasitários como a densidade parasitária, a quantidade de antígeno produzido pelo parasito ou sua persistência no sangue periférico (BELL et al., 2005; GILLET et al., 2011). Esses testes podem gerar resultados falso-positivos em pacientes já tratados com antimaláricos, devido à circulação do antígeno HRP2 persistente que pode ser de até um mês após o tratamento (BELL et al., 2005 e GILLET et al., 2011). Em comparação, testes de pLDH e aldolase não são mais positivos dois a sete dias após tratamento efi-

caz para malária (DALRYMPLE et al., 2018). Dados na literatura mostram resultados falso-positivos em pacientes com auto-anticorpos, como fator reumatóide e anticorpos antinucleares (LAFERI et al., 1997) ou infecções não maláricas como infecções por *Trypanosoma cruzi*, dengue, *Leishmania* e *Schistosoma* spp. (CHIODINI et al., 2014).

Resultados falso-negativos podem ocorrer em indivíduos com níveis de parasitemia abaixo do limite de detecção, em torno de 50 a 200 parasitos/ μ L para a maioria dos testes comercialmente disponíveis (ABBA et al., 2011). Recentemente, foram desenvolvidos RDTs com metodologia aprimorada de detecção ultra-sensível (uRDTs) e um limiar de detecção inferior a 10 parasitas/ μ L; são testes de particular interesse em identificar infecção assintomática de baixa densidade parasitária em regiões endêmicas (POTI et al., 2020).

Níveis muito altos de antígeno HRP2 circulantes, por sua vez, também podem causar resultado falso-negativo pelo fenômeno denominado efeito 'prozona', em que o anticorpo do teste pode ficar saturado pelo excesso de antígenos no meio. Vários fatores podem aumentar o risco do efeito 'prozona', influenciando na velocidade da movimentação ideal para as interações antígeno-anticorpo, como por exemplo, o tamanho dos poros da membrana de nitrocelulose, viscosidade e volume do tampão, a estrutura dos anticorpos, afinidade e avidéz da ligação de antígeno-anticorpo e mesmo a aplicação de um volume alto de sangue (RISCH et al., 1999; GILLET et al., 2009; GILLET et al., 2011).

GILLET et al. (2011) avaliaram o impacto do efeito 'prozona' no resultado dos RDTs ao analisar amostras de sangue de pacientes de Moçambique com alta parasitemia por *P. falciparum*. O efeito 'prozona' afetou todas as seis marcas analisadas de RDTs baseados na detecção de HRP2 em proporções que variaram de 6,7% a 38,2% das amostras testadas. Os dois RDTs baseados na detecção de Pf-pLDH não sofreram o efeito 'prozona'. As marcas ICT Malaria e Paracheck-Pf foram as mais afetadas.

2.4. TRATAMENTO DA MALÁRIA

No século XVII, os padres jesuítas observaram o uso de cascas de árvores nativas (*Cinchona*) pelos indígenas do Novo Mundo, para curar doenças febris. Em 1735, os jesuítas levaram para a Europa essas cascas em forma de pó, o "pó dos jesuítas" e, apenas em 1820, o seu princípio ativo foi isolado, o Quinino (CDC, 2010; SILVA et al., 2019). Durante a I Guerra Mundial, pesquisadores alemães desenvolveram os antimaláricos sintéticos. A eficiência, segurança e baixo custo da cloroquina contribuíram para torná-la o antimalárico mais utilizado. A cloroquina passou a ser recomendada não apenas para o tratamento de todas as malárias humanas, mas também para uso profilático contra essas infecções (CDC, 2010; SILVA et al., 2019). No entanto, a resistência lenta e gradual à cloroquina surgiu no Sudeste da Ásia e na Colômbia quase simultaneamente e se espalhou para a África Subsaariana (VAN DER PLUIJM et al. 2020).

Para o tratamento contra o *P. falciparum* resistente à cloroquina, passou-se a utilizar a mefloquina, desenvolvida na década de 1970 e derivados de artesimina, cujo princípio ativo foi isolado em 1971. As terapias combinadas à base de artemisinina, ou seja, a combinação de um medicamento convencional, como a mefloquina, com um derivado da artemisinina, como o artesunato passaram a ser recomendadas pela OMS em todo o mundo como o principal tratamento para a malária por *P. falciparum* (MAJORI, 2004). Entretanto, resistência à mefloquina (SILVA et al., 2019) e à artemisinina e seus derivados já foram detectadas (WHO, 2015; DONDORP, 2010). DINI et al. (2018) e VAN DER PLUIJM et al. (2020) demonstraram recentemente que novas terapias de combinação tripla (diidroartemisinina-piperaquina mais mefloquina e arteméter-lumefantrina mais amodiaquina) fornecem proteção e retardaram o surgimento de resistência aos antimaláricos, além de serem bem toleradas e seguras aos pacientes.

No Brasil, o Ministério da Saúde por meio de uma política nacional orienta a terapêutica e disponibiliza gratuitamente os medicamentos antimaláricos utilizados em todo o território nacional. Os medicamentos específicos para o tratamento de malária não são disponibilizados comercialmente em farmácias privadas, o que evita a automedicação e reduz o risco de resistência (BRASIL, 2020). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, o tratamento da malária não

complicada por *P. vivax* ou *P. ovale*, que produzem hipnozoítos responsáveis pelas recaídas, consiste na combinação de cloroquina (por 3 dias) e primaquina (por 7 dias). Se ocorre recorrência entre 5 e 60 dias, após início de tratamento, é recomendado o uso de artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina (por três dias) e primaquina (por quatorze dias). O tratamento de *P. malariae* assemelha-se ao tratamento para malária por *P. vivax*, porém sem a necessidade da primaquina (BRASIL, 2020). Para o tratamento da malária por *P. falciparum*, recomenda-se o uso de artemeter/lumefantrina ou artesunato/mefloquina. A primaquina deve ser administrada em dose única no primeiro dia do tratamento; o uso dessa medicação, com as artemisininas, garante a eliminação de gametócitos maduros circulantes na periferia (WHITE, 2013; BRASIL, 2020). Todos os adultos e crianças com malária grave devem ser tratados com artesunato intravenoso ou intramuscular, por no mínimo 24 horas. O uso de clindamicina intravenosa é uma opção alternativa, pois apresenta ação esquizonticida lenta. Resistência à artemisinina ainda não foi detectada no país (MÉNARD et al., 2016; BRASIL, 2020).

Em 2010, a OMS passou a recomendar a introdução das terapias com derivados da artemisinina, somente após a confirmação do diagnóstico. Essa estratégia, além de econômica em comparação à prática de tratamento empírico, procurou reduzir o uso excessivo de antimaláricos e a disseminação de resistência do parasito (WHO, 2010; CHIODINI et al., 2014; POTI et al., 2020).

2.5. DELEÇÃO DOS GENES *pfhrp2* / *pfhrp3*

Como foi exposto, o tratamento da malária é espécie-específico, e sua instituição de forma assertiva e em tempo hábil, só é possível através de um diagnóstico laboratorial rápido e específico. Os testes rápidos baseados na detecção de HRP2 identificam infecção por *P. falciparum*, espécie com maior risco de desenvolver malária grave, portanto com grande necessidade de tratamento precoce, são ferramentas muito utilizadas com esse objetivo, embora possam se associar a resultados falsos negativos por fatores diversos apresentados no item 2.4. Entretanto, resultados negativos também podem ocorrer em indivídu-

os infectados com isolados de *P. falciparum* portadores de uma mutação no gene *pfhrp2* resultando em alterações na produção da proteína HRP2, na expressão de uma proteína modificada que não seria mais reconhecida pelos anticorpos usados em RDTs baseados em HRP2 ou em parasitos com o gene *pfhrp2* deletado e que, portanto, não expressam a proteína HRP2 (BAKER et al., 2005; GAMBOA et al., 2010; KUMAR et al., 2013; WURTZ, et al., 2013; MURILLO et al., 2015; THOMSON et al., 2020; WHO, 2020).

A estrutura do gene *pfhrp2* é composta por dois exons separados por um íntron com tamanho 1063 pares de bases, com base na sequência 3D7, e localizado na região subtelomérica do cromossomo 8 (CHENG et al., 2014). É imediatamente flanqueado por um gene de proteína exportada de *Plasmodium* (PHIST) de função desconhecida (PlasmoDB ID: PF3D7_0831900) e um gene de proteína 70 de choque térmico putativo, PF3D7_0831700 (RACHID VIANA et al., 2017). A presença de epítomos repetitivos em HRP2 fornece vários locais de ligação de anticorpos e permite a detecção mesmo se baixos níveis da proteína (THOMSON et al., 2020).

Os anticorpos monoclonais usados em testes de detecção de HRP2 frequentemente apresentam reação cruzada com o antígeno HRP3. Os antígenos HRP2 e HRP3 são homólogos estruturais, ou seja, HRP3 compartilha semelhanças estruturais com a proteína HRP2 (BHARTI et al., 2016). Reações cruzadas, no entanto, são mais prováveis de ocorrer em infecções com parasitemias acima de 1000 parasitas por μL de sangue, visto que a proteína HRP3 é menos expressa do que HRP2 (THOMSON et al., 2020; GENDROT et al., 2019; KOJON & SINGH, 2020). HRP2 exibe também mais polimorfismo do que HRP3 (KUMAR et al., 2012). O antígeno HRP3 é expresso pelo gene *pfhrp3* que tem 977 pares de bases, com base na sequência 3D7, localizado na região subtelomérica do cromossomo 13 (RACHID VIANA et al., 2017). É também composto de dois exons e um íntron (GENDROT et al., 2019). É flanqueado por um gene que codifica uma proteína exportada de *Plasmodium* (PHISTb) de função desconhecida, PF3D7_1372100. Outro gene que codifica a acil-CoA sintetase (PF3D7_1372400) está localizado a aproximadamente 9,1 kb da extremidade 3' de *pfhrp3* (RACHID VIANA et al., 2017). Os genes *pfhrp2* e *pfhrp3* provavelmente são derivados de um gene ancestral comum (ROCK et al., 1987).

A localização dos dois genes em regiões subteloméricas os coloca em um grupo gênico de alta diversidade, como propensão à recombinação e instabilidade genômica (BOPP et al., 2013). GENDROT *et al.* (2019) em um trabalho de revisão sobre a diversidade genética dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* mostraram que mais de 18 tipos de repetições de aminoácidos foram identificadas a partir das sequências PfHRP2. Estes estudos confirmam que HRP2 e HRP3 tiveram variação extrema entre o tipo e o número de repetições e podem afetar a sensibilidade dos RDTs baseados em HRP2. Entretanto, a real influência da diversidade genética dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* no desempenho do diagnóstico com RDTs baseados em HRP2 precisa ser melhor elucidada (LÊ et al., 2020). Alguns estudos sugerem que a variação genética desses genes não parece ser a causa dos resultados falso-negativos e sim a alta prevalência de deleção deste gene que está associada a uma alta taxa de resultados falso-negativos (GENDROT et al., 2019).

O genoma de *P. falciparum* é extremamente rico em adenina / timina (80%) e consiste em 5300 genes distribuídos em 14 cromossomos com um total de 25-30 megabases de DNA. Como consequência de exclusões contínuas e rearranjos, os cromossomos diferem consideravelmente em tamanho (MEYER, 2002).

Deleções dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em linhagens de laboratório é resultado de deleções cromossômicas, onde um grande fragmento de cromossomo, geralmente contendo vários genes, é excluído (WELLEMS et al., 1988, JIANG et al., 2008). GAMBOA *et al.* (2010) analisaram a sequência de DNA dos genes que flanqueiam *pfhrp2* e *pfhrp3* de parasitos naturais sem expressão de HRP2 e HRP3 e os resultados sugeriram que a falta de HRP2 foi devido a deleções no cromossomo 8, que removeu o gene *pfhrp2* e gene localizado *upstream* (MAL7P1.230); enquanto a falta de HRP3 foi principalmente devido a deleções no cromossomo 13 que removeu o gene *pfhrp3* e seus genes flanqueadores, o gene localizado imediatamente *upstream* (MAL13P1.485) e, na maioria dos casos, o gene *downstream* (MAL13P1.475). Outro estudo genético realizado no Peru com quatro isolados clínicos de *P. falciparum* que apresentavam deleção do gene *pfhrp2* revelou uma deleção de aproximadamente 20 kb do genoma mostrando que a deleção não é restrita ao próprio gene *pfhrp2*, mas se estende aos genes vizinhos (AKINYI et al., 2013). A varredura do genoma de 14 iso-

lados peruanos de *P. falciparum* revelou deleções de regiões subteloméricas em comprimentos de 20–25 kb contendo vários genes, incluindo *pfhrp2* e *pfhrp3* (DHARIA et al., 2010). Com base nas descobertas publicadas, entende-se que as deleções de *pfhrp2* e *pfhrp3* ocorrem por causa da quebra cromossômica e sua reintegração nas regiões subteloméricas dos respectivos cromossomos. O ponto de quebra pode ocorrer em uma região ampla (CHENG et al., 2014).

A deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em isolados de *P. falciparum* adaptados em laboratório (clones Dd2 e HB3) foi identificada logo nos primeiros estudos genéticos (LEECH et al., 1984; STAHL et al., 1985; WELLEMS et al., 1988). A primeira evidência de deleção natural dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em larga escala foi descrita em 2010 na Amazônia Peruana (GAMBOA et al., 2010). Este estudo foi parte do Programa de Avaliação de RDT da Malária da OMS-FIND, no qual *P. falciparum* isolados de campo foram coletados de diferentes áreas geográficas e caracterizados para uso em testes de RDT para diagnóstico de malária nos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), EUA, e nos lotes de testes utilizados nos laboratórios de coleta (WHO, 2011). O primeiro relato de parasitos de *P. falciparum* sem os genes *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* foi em um estudo retrospectivo, com 148 de diferentes áreas da região amazônica do Peru (perto de Iquitos). As amostras coletadas entre 2003 e 2007, 61 (41%) e 103 (70%) não tinham os genes *pfhrp2* e *pfhrp3*, respectivamente, e 32 (21,6%) amostras tinham dupla deleção (GAMBOA et al. 2010). A proporção de parasitos sem *pfhrp2* aumentou de 20,7% em 1998 e 2001 para 40,6% em 2003 e 2005 na região amazônica do Peru (AKINYI et al., 2013). Durante um surto de *P. falciparum* na costa norte do Pacífico do Peru em 2010 e 2012, 100% das 54 amostras analisadas não tinham o gene *pfhrp2* (BALDEVIANO et al., 2015).

Na Colômbia, de 100 amostras coletadas entre 1999 e 2009, 18 apresentaram *pfhrp2* deletado, sendo 14 coletadas do Departamento de Amazonas, que faz fronteira com o Peru e o Brasil. Deleções de *pfhrp3* foram encontradas em 52 das 100 amostras coletadas em todas as regiões do país (MURILLO et al., 2015). Em estudo com amostras coletadas no sudeste da Colômbia (Amazonas) entre 2008 e 2010, 53,6% dos parasitas não tinham o gene *pfhrp2*, já no noroeste esta deleção não foi detectada (no departamento de Antioquia)

(DORADO et al., 2016). A prevalência de deleções de *pfhrp2* e *pfhrp3* foi avaliada em 221 isolados de *P. falciparum* coletados entre 2009 e 2011 na Guiana Francesa. Nenhum isolado sem o exon 2 do gene *pfhrp2* foi identificado, mas 7,4% não tinham o exon 2 do gene *pfhrp3* (TROUVAY et al., 2013). No noroeste do Equador, 32 amostras de *P. falciparum* foram coletadas em um surto ocorrido entre 2012 e 2013 e os genes *pfhrp2* e *pfhrp3* estavam intactos em 31 isolados de parasitos relacionados a uma mesma linhagem clonal. Em contraste, tanto *pfhrp2* quanto *pfhrp3* estavam deletados em um isolado de outra linhagem clonal D (SAENZ et al., 2015). Na Bolívia, 4% de 25 amostras coletadas em 2010 tiveram deleção do gene *pfhrp2*, enquanto 68% eram *pfhrp3*-negativas (RACHID VIANA et al., 2017).

HOUZÉ et al. (2011) relataram um caso de malária por *P. falciparum* em um cidadão francês que havia viajado para a Amazônia brasileira e foi diagnosticado erroneamente como malária não-*falciparum* após um resultado negativo para HRP2. Posteriormente foi provado que esse isolado não possuía os genes *pfhrp2* e *pfhrp3*. Outro estudo identificou isolados de *P. falciparum* que possuíam deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* a partir da análise de 198 isolados de três estados da Bacia Amazônica brasileira (Acre, Rondônia e Pará) coletados entre 2010 e 2012. Os respectivos genes flanqueadores também foram amplificados. O estado do Acre, fronteira com o Peru, possuía a maior proporção de isolados *pfhrp2* negativos (31,6%), em Rondônia, a prevalência de exclusão do gene *pfhrp2* foi apenas 3,3%, enquanto nenhuma das amostras coletadas tinham a deleção no Pará, estado localizado na extremidade oriental da bacia amazônica brasileira (RACHID VIANA et al., 2017). Essa alta porcentagem de isolados *pfhrp2*-negativos em Rondonia foi comparável com as detectadas no Peru onde as proporções foram de 30% (GAMBOA et al., 2010). Em contraste, foram detectadas altas proporções de isolados *pfhrp3*-negativos em todos os três estados brasileiros, variando de 18,3% a 50,9% (RACHID VIANA et al., 2017).

Na Guiana e no Suriname, os genes *pfhrp2* e *pfhrp3* foram amplificados em isolados de parasitos coletados entre 2009 e 2011. Todos os 97 isolados da Guiana foram positivos para *pfhrp2* e *pfhrp3*. No Suriname, 14% das 78 amostras testadas foram negativas para *pfhrp2*, enquanto 4% foram negativas para *pfhrp3* e as deleções genômicas se estendem aos genes flanqueadores

(OKOTH et al., 2015). Em estudo realizado no Haiti foram coletadas amostras de sangue de pacientes febris que compareceram a 17 unidades de saúde do país entre setembro de 2012 a fevereiro de 2014. De 331 amostras positivas para *P. falciparum* por técnica de PCR, 266 (80,4%) foram positivas em teste para detecção do antígeno pAldo, 221 (66,8%) positivas para pLDH e 324 (97,9%) foram positivas para antígenos HRP2/3. As sete amostras (2,1%) positivas na PCR, porém negativas para os três antígenos e não apresentaram deleção dos genes *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* (HERMAN et al., 2019).

Estudo na Nicarágua, Guatemala e Honduras, parasitos dos três países mostraram deleções de um ou de ambos os genes e a maior proporção de deleções do exon 1–2 *pfhrp2* foi encontrada na Nicarágua (30,9%), enquanto os isolados da Guatemala revelaram o menor número de deleções (14,3%). Parasitos coletados em Honduras mostraram a maior proporção de deleção de *pfhrp3* (96,2%) e apenas 21% dos isolados duplamente negativos (*pfhrp2* negativo e *pfhrp3* negativo). A maioria desses parasitos duplamente negativos foi detectada em Honduras 13/52 (25%), seguida pela Nicarágua 11/55 (20%) e Guatemala 3/21 (14,3%). Em total, 8 de 27 isolados revelaram ausência total dos dois exons em ambos os genes. O restante dos isolados amplificou pelo menos um exon 2 de qualquer um dos dois genes. Isolados com deleções completas de ambos os genes foram detectados nos três países (FONTECHA et al., 2018). Em Honduras, estudo prévio investigou deleções de *pfhrp2*, *pfhrp3* e seus respectivos genes flanqueadores em 68 isolados coletados de 2008 a 2009 na cidade de Puerto Lempira; todas as amostras foram positivas para *pfhrp2* e seus genes flanqueadores no cromossomo 8. No entanto, apenas 50% das amostras foram positivas para *pfhrp3* (ABDALLAH et al. 2015).

Na Índia, entre 50 amostras de indivíduos infectados por *P. falciparum* negativas pelo teste RDT baseado em HRP2, verificou-se que 2,4% (36/1521) e 1,8% (27/1521) delas foram negativas para os genes *pfhrp2* e *pfhrp3*, respectivamente. Dupla deleção ocorreu em 1,6% (25/1521) das amostras (BHARTI et al., 2016). A diversidade genética do gene *pfhrp2* também foi avaliada em isolados clínicos de parasitos coletados entre maio de 2011 e dezembro de 2012, na área da fronteira China-Myanmar (87 amostras) e no oeste da Tailândia (10 amostras), a deleção de *pfhrp2* foi identificada em quatro de 97 isolados. O sequenciamento do exon 2 de *pfhrp2* de 67 isolados revelou um alto nível de di-

versidade genética em *pfhrp2*. Deleção de *pfhrp3* foi identificada em três dos quatro parasitos com deleção de *pfhrp2* (LI et al., 2015). *LÉ et al.* (2020) também encontraram alto nível de diversidade genética em *pfhrp2* e *pfhrp3* em Myanmar. Há um relato de caso de paciente com malária *falciparum* em Bangladesh que testou negativo em RDTs baseados em HRP2s, os resultados negativos foram atribuídos a uma deleção de parte do gene *pfhrp2* e mutações em ambos os genes *pfhrp2* e *pfhrp3* (NIMA et al., 2017).

Uma revisão sistemática do 'status' da exclusão dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* entre 2010–2019 selecionou 14 artigos de estudos realizados em 12 países do Continente Africano. O nível de exclusão do gene *pfhrp2* e *pfhrp3* variou entre 62% e 0,4% e essa grande variação era devido as diferenças de métodos, abordagens, incluindo desenhos de estudo, tamanho da amostra, amostragem e técnicas laboratoriais empregadas (AGABA et al., 2019). Outra revisão sistemática que incluiu 16 estudos realizados em 13 países mostrou uma proporção relativamente alta de exclusões dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*, superior à 5% (WHO, 2016), bem como influência no desempenho diagnóstico de RDTs baseados em HRP2. Entretanto, observou-se uma grande variabilidade entre os estudos, especialmente em relação às regiões genômicas amplificadas, utilização de cepas de laboratório (HB3, 3D7, Dd2) e estratégia para a distinção entre amostras PCR-negativas para *pfhrp* devido a baixa parasitemia e ausência real do gene (KOJON & SINGH, 2020).

Faltam dados de países altamente endêmicos de malária como Camarões, Etiópia e Chade (KOJON & SINGH, 2020). Não há descrições de deleções dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em Burkina Faso, Serra Leoa e Níger, que são responsáveis por 6, 5 e 4% do total de mortes relacionadas à malária ocorridas em todo o mundo (KOJON & SINGH, 2020). Em Moçambique, a ausência de amplificação de *pfhrp2* foi observada em apenas um dos 69 isolados submetidos à análise molecular (GUPTA et al., 2017). Em Madagascar, de 68 amostras avaliadas, todas apresentavam *pfhrp2* (WILLIE et al., 2018). Por outro lado, um estudo na Eritreia mostrou alta prevalência de parasitos *pfhrp2*-negativos na região avaliada. O 'status' dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* foi pesquisado em 50 pacientes infectados em dois hospitais. Como resultados, foram encontrados que 80,8% (21/26) dos pacientes no Hospital Ghindae e 41,7% (10/24) no Hospital Massawa estavam infectados com parasitas *pfhrp2*-negati-

vos, enquanto 92,3% (24/26) dos pacientes no Hospital Ghindae e 70,8% (17/24) no Hospital Massawa foram infectados com parasitos *pfhrp3*-negativo (BERHANE et al., 2018). Em Ruanda, 23% de 140 amostras coletadas entre 2014 e 2015 e negativas em RDT baseado em HRP2, foram negativas para o gene *pfhrp2* (exon 2) (KOZYCKI et al., 2017). Na Nigéria, a presença dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* foi analisada 66 amostras; os genes *pfhrp2* e *pfhrp3* não apresentaram amplificação em 17% (11/66) e 6% (4/66) das amostras, respectivamente. Sete tinham apenas deleção de *pfhrp2*, enquanto quatro tinham deleção de *pfhrp2* e *pfhrp3* (FUNWEI et al, 2019). Em Mali, a amplificação do gene *pfhrp2* foi negativa em 10 de 22 amostras falso-negativas em RDTs, sendo todos os casos de infecções assintomáticas (KOITA et al., 2012). De 1724 amostras coletadas em Guiné Equatorial em 2013, 11 amostras tiveram exclusão apenas em *pfhrp2*, mas não em *pfhrp3*, 15 apresentaram exclusão de *pfhrp3*, mas não em *pfhrp2*, enquanto 81 apresentaram dupla deleção (BERZOSA, et al., 2020). Em Uganda, o gene *pfhrp2* foi excluído em 10 isolados, enquanto *pfhrp3* em nove e dupla deleção *pfhrp2* e *pfhrp3* ocorreu em 10 isolados dentre 300 amostras avaliadas (BOSCO et al., 2020). THOMSON et al. (2019) identificaram, que todas as 80 amostras coletadas em Gana foram positivas para *pfhrp2*. Na Tanzânia de 137 amostras, três amostras apresentaram deleção de *pfhrp2* e duas tiveram dupla deleção. Em Uganda, de 194 amostras, sete amostras tinham deleção de *pfhrp2*, sendo duas amostras com dupla deleção. Nenhuma amostra foi negativa para *pfhrp3* e positiva para *pfhrp2*. BESHIR et al. (2017) analisaram amostras de crianças assintomáticas no Quênia. Oito amostras com deleção de *pfhrp2* com *pfhrp3* intacto foram positivas por RDT baseado em HRP2. Sete isolados de 136 isolados de *P. falciparum* coletados em Dakar, Senegal, de 2009 a 2011 não foram detectados pelo RDT baseado na detecção de HRP2. Três dessas sete amostras apresentaram deleção de *pfhrp2* (2,4% do total das amostras). O gene *pfhrp3* foi deletado em 12,8% do total das amostras (WURTZ et al., 2013).

A proporção de parasitas sem o gene *pfhrp2* foi de 6,4% na República Democrática do Congo em amostras coletadas de 7.137 crianças menores de cinco anos de idade em 2013 e 2014, a prevalência foi mais alta nas províncias onde a implantação dos RDTs baseados em HRP2 foram pioneiras em comparação com outras regiões (PARR et al., 2017). PARR et al.(2017) procuraram

explorar diferenças clínicas entre crianças infectadas com plasmódio com deleção de *pfhrp2* e sem deleção, porém sem conclusões significativas. Nesse estudo, entretanto, foram observadas densidades mais baixas de parasitos pela PCR em tempo real, menor proporção de positividade para microscopia e menos febre entre indivíduos infectados por plasmódios *pfhrp2*-suprimidos. Esses achados sugerem que houve um custo de adequação para o parasito.

Compreender a distribuição e evolução destes parasitos mutantes é uma prioridade para a OMS, pois a deleção do gene *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* e a consequente não expressão da proteína HRP2 e/ou HRP3 pode gerar resultados falsos negativos em testes rápidos amplamente utilizados nas áreas endêmicas. Estudos são encorajados pela OMS para determinar se a prevalência local de mutações levando a resultados falsos negativos nestes testes de triagem rápida em pacientes sintomáticos atingiu limite maior ou igual a 5%, o que justifica uma mudança na estratégia de diagnóstico a nível local ou nacional (WHO, 2017; WHO, 2020). Resultados falsos-negativos atrasam o diagnóstico precoce e o tratamento dirigido, podendo levar ao óbito indivíduos infectados.

3. JUSTIFICATIVA

Os RDTs para malária são uma alternativa para o diagnóstico do *Plasmodium* spp. em áreas com pouca infraestrutura sanitária. Estudos recentes mostraram a presença de resultados falsos negativos em testes baseados na detecção da HPR2 do *Plasmodium falciparum* devido à deleção do gene *pfhrp2* e conseqüentemente falta de expressão da proteína. Esses resultados falsos-negativos atrasam o diagnóstico precoce e o tratamento, que no caso da infecção pelo *P. falciparum* pode evoluir para doença grave e morte. A identificação de deleção do gene *pfhrp3* também é importante pois, o gene expressa a proteína HRP3, que pode fazer reação cruzada com o anticorpo contra HRP2.

Portanto, detectar a presença de isolados de *P. falciparum* portadores da deleção do gene *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* e compreender a sua distribuição geográfica justifica-se pela necessidade de prover um diagnóstico correto em todas as áreas endêmicas. Embora existam alguns relatos da prevalência dos genótipos de deleção de *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* em algumas áreas da bacia Amazônica Brasileira (RACHID VIANA et al., 2017), na região do rio Negro não há informações sobre a prevalência dessas mutações em isolados clínicos de *P. falciparum*.

Com este estudo procurou-se responder as seguintes perguntas:

1. Ocorre a circulação de *P. falciparum* com deleção dos genes *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* no município de Barcelos (AM), área endêmica para malária na região do médio rio Negro?
2. Há diferenças significativas entre a população acometida pelos parasitos mutantes e pelos parasitos sem deleção, conforme sexo, idade e quantidade de episódios de malárias progressas?
3. Parasitos com deleção dos genes *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* estão associados a um maior número de infecções assintomáticas?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Determinar a presença de deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* em amostras de pacientes infectados com o *P. falciparum* no município de Barcelos, região do médio rio Negro, Amazonas, no período de 2002-2016.

4.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar a prevalência de deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* de *P. falciparum* na população estudada.

- 2) Identificar o perfil epidemiológico da população estudada conforme sexo, idade, quantidade de episódios de malárias pregressas e parasito infectante.

- 4) Avaliar a presença da deleção dos genes em amostras de indivíduos sintomáticos e assintomáticos infectados com o *P. falciparum*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Estudo descritivo observacional usando amostras do biorrepositório do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz. Estas amostras foram coletadas no município de Barcelos (AM) entre os anos 2003 e 2016.

5.1. LOCALIDADES E POPULAÇÃO DE ESTUDO:

5.1.1. MUNICÍPIO DE BARCELOS

O município de Barcelos está localizado na 6^o sub-região do Alto Rio Negro na mesorregião Norte Amazonense na microrregião do Rio Negro, com sede à margem direita do rio Negro. Pertence ao estado do Amazonas e está a 40 metros sobre o nível do mar. Faz fronteira ao Norte com a Venezuela, ao Sul com os municípios de Maraã e Codajás, ao Leste com o estado de Roraima, ao Oeste com o município de Santa Isabel do Rio Negro e ao Sudeste com o município de Novo Airão (SUÁREZ-MUTIS, 2007) (Figura 5.1).

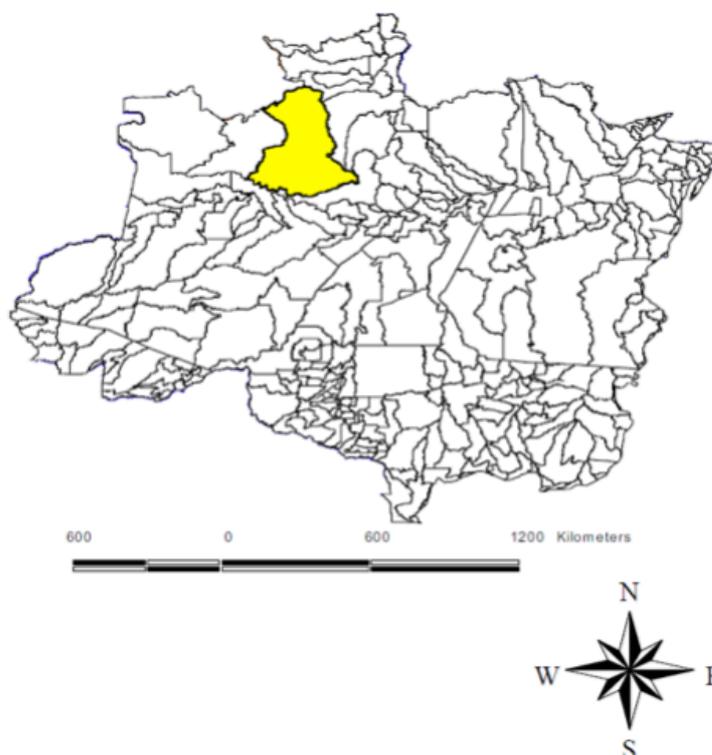


Figura 5.1. Localização geográfica do município de Barcelos dentro da Amazônia Legal. (Extraído de SUÁREZ-MUTIS, 2007).

Apresenta grande extensão territorial, com 122.461,086 km², sendo o segundo maior município do Brasil em extensão territorial, atrás apenas de Altamira no Pará. Encontra-se no bioma classificado como amazônico, o que se trata de floresta tropical úmida, cuja vegetação consiste em matas de terra firme, várzea e igapós. O arquipélago de Mariuá, pertencente ao município, é o maior do Brasil em águas fluviais, com cerca de 140 km de extensão, 20 km de largura e mais de 1.400 ilhas; integra o Parque Nacional do Jaú e o Parque Estadual da Serra do Aracá, com complexo ecossistema de rios e pântanos e rica biodiversidade (IBGE, 2020).

As temperaturas máximas são de 31,7 °C, mínimas de 22,0°C e médias de 26,0°C. As chuvas começam nos meses de março e abril, com médias pluviométricas superiores a 2.600 milímetros anuais. A cheia do Rio Negro e afluentes ocorre nos meses de julho e agosto, provocando zonas inundadas durante esse período. No mês de outubro, o Rio Negro começa a descer, sendo de outubro a março a estação seca (SUÁREZ-MUTIS, 2007). Em toda a Região Amazônica, é esperado um pico sazonal de casos de malária no período de transição entre as estações úmida e seca (BRASIL, 2020).

A cidade teve origem na Aldeia de Mariuá, transformada em Vila, já nomeada de Barcelos, em 06 de maio de 1758. Houve aumento de circulação na região com o desenvolvimento da indústria naval fluvial e o aumento das atividades extrativistas locais na segunda metade do século XIX. Em 31 de março de 1938, Barcelos recebeu foros de cidade por meio do Decreto-lei Estadual n.º 68. A extração da borracha e posteriormente de piaçaba, fibra extraída de palmeiras (*Leopoldinia piassaba*), foram atividades econômicas de destaque na história da região (SUÁREZ-MUTIS, 2007).

Atualmente, o extrativismo de piaçaba ainda é importante atividade econômica na região, frequentemente relacionado a cadeias de exploração de trabalho com servidão por dívida, sem vínculo formal e garantias de direitos trabalhistas (DE MENEZES, 2018). A pesca sustentável de peixes ornamentais também configura atividade de grande relevância na economia local (IBGE, 2020). O município de Barcelos atraiu nas últimas décadas importante migração indígena do Rio Negro (SUÁREZ-MUTIS, 2007).

A população estimada para 2020 segundo o IBGE é de 27.638 pessoas e densidade demográfica de 0,23 habitantes / km². Possui 14,5% dos

domicílios em esgotamento sanitário adequado, 7,5% de domicílios urbanos em vias públicas com arborização e 22,7% de domicílios urbanos em vias públicas com urbanização adequada (presença de bueiro, calçada, pavimentação e meio-fio) (IBGE, 2020).

5.1.2. MALÁRIA EM BARCELOS

Durante o período de 2003 a 2018 foram notificados 67.603 casos de malária no município de Barcelos. Destes, 66.918 (99%) foram autóctones e 685 (1%) importados. Em relação à espécie de *Plasmodium* no período de 2003 a 2018 foram notificados 13.433 (19,9%) casos de *P. falciparum*, 52.618 (77,8%) de *P. vivax*, 1.019 (1,5%) de infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) e 44 (0,1%) de *P. malariae* (SOUZA, 2020). No ano de 2018, foram 6.417 casos de malária no município, 1421 de malária *falciparum* e 149 de malária mista (*falciparum* + *vivax*). No ano de 2019, os casos totais aumentaram para 8.794, com 1.647 de malária *falciparum* e 164 de malária mista (*falciparum* + *vivax*) (SIVEP, 2020).

A Incidência Parasitária Anual (IPA) de malária é o número de exames positivos de malária por mil habitantes (códigos B50 a B53 da CID-10), excluídas recrudescências e recaídas. A IPA no município de Barcelos no ano de 2019 foi de 319,8 casos por 1000 habitantes, o que significa que o risco de ocorrência de malária no local é elevado, classificando o município como de alto risco epidemiológico (DATASUS, 2019; SIVEP, 2019). A IPA abrange o conjunto de formas clínicas de malária, sem identificar as espécies de plasmódio circulantes (DATASUS, 2019).

A Incidência de *P. falciparum* Anual (IFA) trata-se do somatório do número de exames positivos de malária *P. falciparum* e malária mista (código B50 da CID-10) no ano por local provável de infecção, excluídas lâminas de verificação de cura (LVC), sobre a população total residente no mesmo ano de análise (BRASIL, 2020). A IFA no município de Barcelos em 2019 foi de 35,5 casos por 1000 habitantes, classificada como médio risco ($\geq 50,0$). Mais importante que a IFA, é o percentual de casos de *P. falciparum* que no ano de 2019 foi de 11,1% em Barcelos estando entre os municípios com maior incidência de casos

da doença juntamente com São Gabriel da Cachoeira, Manaus e Santa Isabel do Rio Negro em 2019 (FVS-AM, 2019, BRASIL, 2020).

Testes rápidos diagnósticos de malária são utilizados no município com crescente adesão; em 2015, apenas 179 testes foram utilizados, enquanto em 2019, 2402 testes rápidos foram empregados para o diagnóstico da doença (BRASIL, 2020).

5.2. METODOLOGIA:

As amostras clínicas de *P. falciparum* utilizadas neste estudo derivam de projetos que o Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) tem realizado em diferentes momentos por meio de estudos seccionais no município de Barcelos. As amostras foram coletadas de indivíduos habitantes do município entre 2003 e 2016 tanto da área urbana quanto da área rural com diagnóstico parasitológico de infecção pelo *P. falciparum* realizado por gota espessa e/ou por diagnóstico molecular. Embora o número de casos de malária seja relevante na população indígena, esta não foi incluída no estudo. As amostras clínicas estão estocadas no Biorrepositório do Laboratório de Doenças Parasitárias em freezer à 20°C.

Houve duas estratégias de recrutamento dos participantes:

- 1) Busca passiva inicial: Indivíduos que se apresentavam em unidades de saúde com sintomas de malária, por livre demanda, foram convidados a participar da pesquisa. Quando autorizado pelo participante e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, era solicitado o seu endereço e posteriormente realizada a busca ativa de novos casos sintomáticos e assintomáticos no domicílio desse participante.
- 2) Busca ativa inicial: Nos estudos de campo com coleta de dados primários, todos os participantes da pesquisa foram entrevistados e um questionário direcionado aos estudos de malária foi aplicado em cada caso. Todos os indivíduos doentes e com infecção assintomática recrutados passaram por anamnese e exame clínico antes de terem as amostras incluídas nos diferentes estudos seccionais.

5.2.1. DEFINIÇÃO DA MALÁRIA POR *P. FALCIPARUM* E PORTADOR ASSINTOMÁTICO DE *P. FALCIPARUM*

Foi utilizada como definição de **malária** qualquer indivíduo procedente de Barcelos, área de transmissão de malária, com gota espessa positiva para infecção por *P. falciparum* (vide tópico 2.2. coleta de amostras) e sintomas compatíveis com malária. Os sinais e os sintomas de malária não são específicos, portanto, foram definidos sintomas compatíveis de malária conforme *BRASIL* (2020): febre de qualquer intensidade, duração e frequência, mal-estar, dor no corpo, dor nas articulações, fadiga, calafrios ou cefaleia. O espectro clínico da malária pode variar de manifestações oligossintomáticas até quadros graves.

Foi classificado como **portador assintomático** do plasmódio qualquer pessoa com gota espessa positiva e/ou PCR positiva (vide tópico 2.2. coleta de amostras) sem qualquer sintoma de malária 30 dias antes ou 30 dias depois da coleta da amostra. Os participantes foram reavaliados pelos pesquisadores em trabalho de campo, após 30 dias da coleta. O período de incubação da malária varia para o *P. falciparum* de 8 a 12 dias; *P. vivax* de 13 a 17 dias; e *P. malariae* de 18 a 30 dias (*BRASIL*, 2020). Como a PCR é realizada em centros de pesquisa, o diagnóstico de infecção assintomática foi realizado *a posteriori*. Os dados relacionados aos aspectos clínicos (malária X assintomático) foram extraídos das fichas preenchidas durante o trabalho de campo e arquivadas na sala 13 do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz.

5.2.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Todos os participantes realizaram a gota espessa por meio da coleta de uma amostra de sangue capilar (punção digital). O diagnóstico parasitológico foi realizada por microscopista no Programa de Malária Local da Secretaria Municipal de Saúde de Barcelos. A gota espessa foi corada e lida durante o trabalho de campo segundo técnicas padronizadas pelo Ministério da Saúde (, 2009). Depois de seca à temperatura ambiente a gota espessa foi corada segundo a técnica de Walker (azul de metileno e Giemsa) e examinadas na objetiva de imersão (100X).

Os resultados possíveis foram:

1. Lâmina negativa
2. Trofozoitos de *P. falciparum* (F)
3. Gametócitos de *P. falciparum* (Fg)
4. Esquizontes de *P. falciparum* (Ez)
5. Trofozoítos e gametócitos de *P. falciparum* (F+Fg)
6. Trofozoítos de *P. vivax* (V)
7. Gametócitos de *P. vivax* (Fv)
8. Trofozoítos e gametócitos de *P. vivax* (V+Fv)
9. Malária mista (*P. falciparum* e *P. vivax*) (F+V)
10. *P. malariae* (M)

Para garantir o controle de qualidade posterior, as lâminas coletadas entre os anos 2003 e 2005 foram encaminhadas à Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTA) onde um técnico qualificado e experiente sem conhecer os resultados anteriores, realizou uma segunda leitura para o controle de qualidade. Os dados foram comparados posteriormente. As lâminas coletadas depois do ano 2005 foram examinadas por um microscopista supervisor do programa do município e posteriormente todas as lâminas positivas e 10% das negativas foram encaminhadas ao Laboratório de Saúde Pública do Estado do Amazonas, em Manaus para realização do controle de qualidade, como parte das atividades do programa de controle.

Simultaneamente foram coletados 5mL de sangue total para o diagnóstico molecular de malária em tubos vacutainer® com ácido etilenediaminotetracético (EDTA) e transportado congelado ao LDP no Instituto Oswaldo Cruz.

5.2.3. EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA foi realizada com Kit comercial. O DNA foi extraído usando o Kit Wizard® Genomic purification (Promega) a partir de uma alíquota de 300µl de sangue, de acordo com protocolo do fabricante: Foram adicionados 900µl de solução de lise de células a um tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril e em seguida 300µl de sangue foram transferidos ao microtubo que continha a solução de lise celular. O tubo foi invertido 5-6 vezes para misturar e

incubado por 10 minutos à temperatura ambiente para lisar os glóbulos vermelhos.

Após incubação, o tubo foi centrifugado a 13,000-16,000 xg durante 20 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado sem perturbar o “pellet” visível. As células foram ressuspendidas adicionando-se mais 300µl de solução de lise nuclear, homogeneizando a solução 5 a 6 vezes para lisar os glóbulos brancos. Posteriormente foram adicionados 100µl da solução de precipitação de proteínas ao lisado nuclear e o tubo foi agitado no vórtex vigorosamente por 10 a 20 segundos.

O tubo foi centrifugado a 13,000-16,000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido a um microtubo de 1,5 ml que continha 300 µl de isopropanol à temperatura ambiente. A solução foi misturada suavemente invertindo-se o tubo várias vezes e centrifugada a 13,000-16,000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi então descartado com cuidado (o DNA estava no “pellet”) e foram adicionados 300µl de etanol 70% à temperatura ambiente. O tubo foi invertido suavemente várias vezes para lavar o DNA . O DNA foi centrifugado a 13,000-16,000 x g durante 1 minuto à temperatura ambiente. O etanol foi aspirado cuidadosamente usando uma pipeta Pasteur ou um tip de micropipeta.

O tubo foi invertido em papel absorvente durante 10 a 15 minutos para secar. O DNA foi ressuspendido com 100µl de solução reidratante e deixado à 4°C para ser utilizado nos experimentos de PCR. A eficiência da extração de DNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose à 0,7% em tampão TBE 0,5X e posterior coloração com brometo de etídio. A concentração do DNA foi determinada utilizando o fluorímetro Qubit™ (ThermoFisher Scientific)

5.2.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os DNAs extraídos foram inicialmente submetidos à Reação de polimerase em cadeia (PCR) para a confirmação do diagnóstico de infecção pelo *P. falciparum* de acordo com protocolo de SNOUNOU *et al.* (1993) com algumas modificações (Figura 5.2).

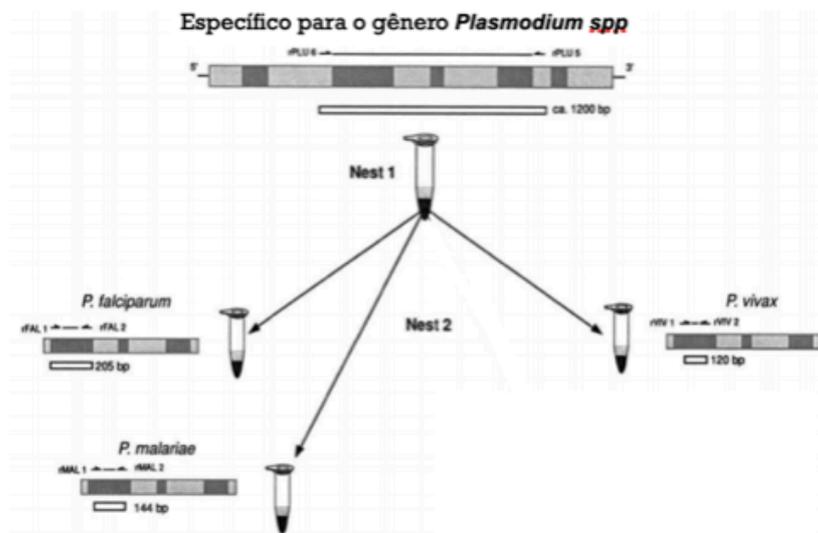


Figura 5.2. Esquema de PCR para diagnóstico de *Plasmodium falciparum*. PCR-Nested 1, para o gênero *Plasmodium spp.* e Nested 2, com as bandas espécie-específicas (Extraído e modificado de SNOUNOU et al., 1993).

Foi feita uma PCR aninhada (nested). Na primeira reação foram utilizados iniciadores específicos para o gênero *Plasmodium spp.* com amplificação de um fragmento de 1200 pb que serviu como molde para a segunda reação. A segunda reação de PCR foi realizada com iniciadores espécie-específicos de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Devido à incidência irrelevante de *P. ovale* no território brasileiro não foi feita a PCR para o diagnóstico desta espécie parasitária.

Nos quadros a seguir se apresentam os iniciadores, reagentes e os programas da PCR utilizados:

Quadro N. 1.

Iniciadores utilizados para a PCR diagnóstica		
Iniciador	SEQÜENCIA	Tm°C
<i>Gênero Plasmodium</i>		
rPLU5	5'-CTT GTT GTT GCC TTA AAC TTC-3'	43
rPLU6	5'-TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG-3'	41
<i>P. falciparum</i>		
rFAL1	5'-TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'	48
rFAL2	5'-ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'	55
<i>P. vivax</i>		
rVIV1	5'-CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC-3'	54
rVIV2	5' ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA-3'	55
<i>P. malariae</i>		
rMAL1	5'-ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC-3'	51
rMAL2	5' AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA-3'	46

Quadro N. 2.

Reagentes utilizados na primeira reação de PCR

Para 1 reação de 25 μ L gênero-específica (Primeira PCR)

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO/25 μ L	VOLUME (μ L)
H ₂ O		16,9
Tampão 10X (Invitrogen)	1X	2,5
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen)	1,5mM	1
dNTP mix 10 μ M	0,12 μ M	0,3
Iniciador rPLU5 10 μ M (rVIV1; rFAL1)	5 pmol	0,6
Iniciador rPLU6 10 μ M (rVIV2; rFAL2)	5 pmol	0,6
Taq (Invitrogen) 5U/ μ L	0,5U	0,1
ADN	10-50 ng	3

Quadro N. 3.

Reagentes usados na reação de NESTED-PCR

Na segunda PCR para uma reação espécie-específica de 25 μ L

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO/25 μ L	VOLUME (μ L)
H ₂ O		18,9
Tampão 10X (Invitrogen)	1X	2,5
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen)	1,5mM	1
dNTP mix 10 μ M	0,12 μ M	0,3
Iniciador 10 μ M (rVIV1; rFAL1; rMAL1; vOVA1)	5 pmol	0,6
Iniciador 10 μ M (rVIV2; rFAL2; rMAL2; rOVA2)	5 pmol	0,6
Taq (Invitrogen) 5U/ μ L	0,5U	0,1
ADN producto da primeira amplificação		1

Todas as reações foram preparadas no gelo e os programas utilizados estão expostos no quadro a seguir:

Quadro N. 4.

Perfil térmico usado na PCR aninhada (nested)			
	Temperatura °C	Tempo	Número de ciclos
Perfil térmico usado na primeira PCR	95	5 min	1
	94	1 min	25
	58	2 min	
	72	2 min	
	72	5 min	1
	4		α
Perfil térmico usado na segunda PCR			
	Temperatura °C	Tempo	Número de ciclos
Perfil térmico usado na segunda PCR	95	5 min	1
	94	1 min	30
	65	2 min	
	72	2 min	
	72	5 min	1
	4		α

Os produtos da reação de amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X (Tris + ácido bórico + EDTA) e visualizados com brometo de etídio em transiluminador com luz ultravioleta (UV). Como controles positivos da reação foram utilizados DNAs de amostras clínicas positivas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Os fragmentos obtidos foram de 205 pb para *P. falciparum*, 144 pb para *P. malariae* e 120 pb para *P. vivax*. Apenas amostras que obtiveram fragmentos de 205 pb e banda dupla (205pb/120pb, infecção mista *P.falciparum* + *P. vivax*) foram incluídas no estudo.

5.2.5. CONTROLE DE QUALIDADE DO DNA

O controle de qualidade dos DNAs foi avaliada através da amplificação por PCR do bloco 3 do gene que codifica para a proteína do superfície do merozoíto, *pfmsp2*, de acordo com o protocolo descrito por *SNOUNOU et al.* (1999). Este controle de qualidade através da amplificação de uma gene de cópia única foi feito para descartar resultados negativos devido a DNA de baixa qualidade ou falha de PCR para *pfhrp2/pfhrp3*. Foram feitas duas reações separadas (Nested-PCR) usando pares de iniciadores específicos (Quadro N.5).

Quadro N.5.

Iniciadores utilizados nas reações de PCR *pfmsp2*

Iniciadores Primeira Reação <i>m</i> sp2	
Iniciadores	Sequencia
M2-OF	5'-ATGAAGGTAATTAACATTGTCTATTATA-3'
M2-OR	5'-CTTTGTTACCATC GGTACATTCTT-3'

Iniciadores Segunda Reação <i>m</i> sp2	
Iniciadores	Sequência
Família IC3D7	
M2-ICF	5'-AGAAGTATGGCAGAAAGTAACCTCTACT-3'
M2-ICR	5'-GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTTCG-3'
Família FC27	
M2-FCF	5'-AATACTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA-3'
M2-FCR	5'-TTTTATTTG GTGCATTGCCAGAACTTGAAC-3'

A mistura de reagentes nas duas reações realizadas é apresentada nos quadros N.6. e N.7. Todas reações foram preparadas no gelo. Na primeira reação é amplificado um fragmento de 702pb do gene *pfmsp2*. Na segunda reação são utilizados iniciadores específicos para distinção das famílias alélicas 3D7 e FC27. Para o segundo PCR foi realizada uma diluição 1:10 do produto amplificado da primeira reação. Não é feito eletroforese entre o 1° e 2° PCRs.

Quadro N. 6.

Mistura de reagentes da primeira reação de PCR *pfmsp2*

Mix PCR Nested Diagnóstico-Primeira Reação		
Reagente	Concentração/25 µl	Volume(µl)
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen®)	2 mM	1,0 µl
dNTP 10 Mm	0,12 mM	1,6 µl
Iniciador OF10 mM	5pmol	1,25 µl
Iniciador OR10 mM	5pmol	1,25µl
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	0,5 U	0,1 µl
DNA	10-50ng	3 µl
H ₂ O		14,3 µl
Volume final		25 µl

Quadro N. 7.

Mistura de reagentes da segunda reação de PCR *pfmsp2*

Mix PCR Nested <i>m</i>sp2 Segunda Reação		
Reagente	Concentração/25 µl	Volume(µl)
Tampão10x(Invitrogen®)	1x	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen®)	1,5 mM	1,0 µl
dNTP 10 Mm	0,12 mM	1,6 µl
Iniciador M2-ICF - M2-FCF	0,025 mM	1,25 µl
Iniciador M2-ICR/ M2-FCR	0,025 mM	1,25 µl
Taq (Invitrogen®) 5U/ul	0,5 U	0,1 µl
Produto da primeira PCR		1 µl
H ₂ O		16,3 µl
	Volume final	25 µl

O mesmo perfil térmico foi utilizado nas duas reações de PCR:

Quadro N. 8.

Perfil térmico primeira e Segunda reação <i>m</i>sp2			
	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	
Anelamento	58°C	2 min	24
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	5 min	
	4°C		

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 0,5X e visualizado com brometo de etídeo através de luz UV. Os tamanhos dos fragmentos variaram entre 300-680pb para as 2 famílias alélicas. Como controles positivos foram utilizados DNA da cepa referência 3D7 e DNA de *P. falciparum*. extraído de amostra clínica de indivíduo com malária (Moçambique- África) como controle da família Fc27. Os DNAs que amplificaram para 3D7 e/ou Fc27 foram utilizados para amplificação dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*.

5.2.6. ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *pfhrp2* E *pfhrp3*

As ampliações do exon 2 dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* de *P. falciparum* foram realizadas por semi-nested PCR baseado no protocolo previamente descrito por BAKER *et al.* (2005).

A primeira reação utilizou o par de iniciadores *Pfhrp2-F1* e *Pfhrp2-R1* e par de iniciadores *Pfhrp3-F1* e *Pfhrp3-R1*, (Figura 5.3) para a amplificação dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* respectivamente e a reação semi-nested utilizou o par de iniciadores *Pfhrp2-F2* e *Pfhrp2-R1* e o par de iniciadores *Pfhrp3-F2* e *Pfhrp3-R1*, respectivamente (Quadro 9).

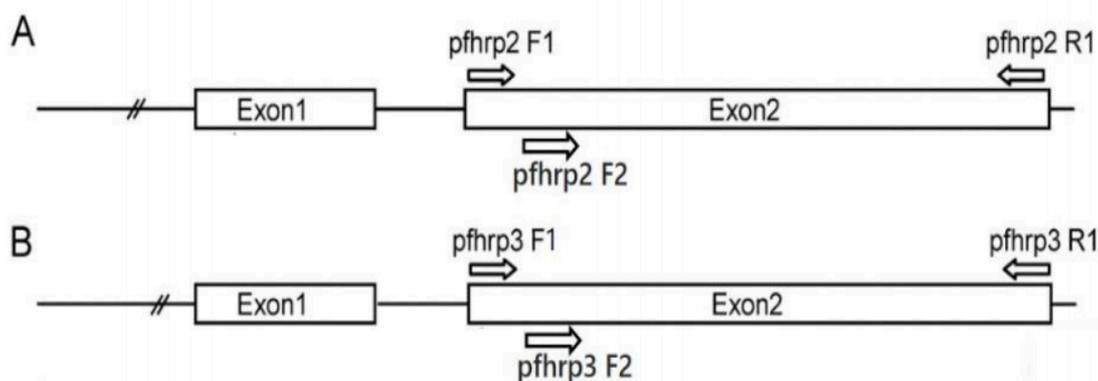


Figura 5.3. Ilustração esquemática das organizações genômicas *pfhrp2* e *pfhrp3* e locais de ligação ao iniciador. (A) gene *pfhrp2*; (B) gene *pfhrp3*. (Extraído de: HOUZÉ *et al.* 2011).

Na primeira PCR 3µl de DNA extraído de cada amostra foram adicionados a uma mistura de PCR com volume final de 50µl. Na PCR foram utilizados 1 µl do produto de PCR da primeira reação num volume final de 50µL utilizando as mesmas concentrações de reagentes e mesmas condições de ciclo da primeira reação. Todas as reações foram preparadas no gelo. A segunda reação (semi-nested) só era realizada quando não ocorria amplificação de um dos genes *pfhrp2* ou *pfhrp3* na primeira reação. Um caso de deleção de *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* foi definido como uma amostra que foi negativa nos PCRs específicos de *pfhrp2* / 3 (1° e 2° reações), mas positiva por PCR para uma das famílias alélicas do gene de *pfmsp-2*. As reações de PCR para *pfmsp2* *pfhr2/3* foram feitas em duplicatas.

Quadro N. 9.

Iniciadores utilizados para a amplificação por PCR do exon 2 dos genes *pfhr2* e *pfhrp3* (1° e 2° reação)

Iniciador	SEQÜENCIA
gene <i>pfhrp2</i>	
<i>Pfhrp2-F1</i>	5' -ATTATTACACGAAACTCAAGCAC- 3'
<i>Pfhrp2-R1</i>	5' -AATAAATTTAATGGCGTAGGCA- 3'
<i>Pfhrp2-F2</i>	5' -ATTATTACACGAAACTCAAGCAC- 3'
gene <i>pfhrp3</i>	
<i>Pfhrp3-F1</i>	5' -AATGCAAAAGGACTTAATTC- 3'
<i>Pfhrp3-R1</i>	5' -TGGTGTAAGTGATGCGTAGT- 3'
<i>Pfhrp3-F2</i>	5' -AAATAAGAGATTATTACACGAAAG- 3'

Os quadros a seguir apresentam os iniciadores, reagentes, concentrações e volumes utilizados nas reações para amplificação do gene *pfhrp2* e do gene *pfhrp3*:

Quadro N. 10.

Concentração e volumes dos reagentes utilizados na primeira reação de PCR:

Reagente	Concentração	Volume
MgCl ₂ 50mM (Invitrogen)	2mMol	2µl*
dNTPs (1.25mM)	0,2mMol	8µl
Iniciador R1 10uM	10µM	1µl
Iniciador F1 10uM	10µM	1µl
Taq-polimerase 5U/µL	2,5U	0,5µl
Tampão 10X (Invitrogen)	1X	5µl
H ₂ O q.s.p 50µL	—	29,5µl
DNA	—	3µl

Quadro N. 11

Concentração e volumes dos reagentes utilizados na reação semi-nested:

Reagente	Concentração	Volume
MgCl ₂ 50mM	2mMol	2µl*
dNTPs (1.25mM)	0,2mMol	8µl
Iniciador R1 10uM	10µM	1µl
Iniciador F2 10uM	10µM	1µl
Taq-polimerase 5U/µL	2,5U	0,5µl
Tampão 10X	1X	5µl
H ₂ O q.s.p 50µL	—	31,5µl
Produto da primeira PCR	—	1µl

As condições dos ciclos foram as seguintes: desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C/50s, anelamento dos iniciadores a 55°C/50seg e extensão a 70°C/1min. A extensão final foi realizada a 70°C/5 min e depois as reações ficaram à 4°C. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% em TBE 0,5X e visualizados em luz UV após coloração com brometo de etídio. Os DNAs de 3 cepas referência de *P. falciparum*, 3D7 (*pfhrp2+* e *pfhrp3+*), Dd2 (*pfhrp2-* e *pfhrp3+*) and HB3 (*pfhrp2+* e *pfhrp3-*) foram usadas como controles positivos nas reações de PCR.

Para avaliar a sensibilidade da reação de PCR, (quantidade mínima de DNA molde necessária para amplificação dos genes) foram feitas diluições do DNA controle Dd2 que variaram de 0,5ng/µL até 30ng/µL X, mostrando as diferentes diluições dos controles positivos.

5.2.7. ANÁLISE DE DADOS

Os dados dos questionários e dos resultados laboratoriais foram armazenados em um banco de dados do programa Epi Info™ 7.2.1.0. Realizaram-se análises descritivas usando os dados do questionário e dos resultados laboratoriais.

A prevalência dos portadores da mutação do gene *pfhrp2* e *phrp3* no estudo foi determinada usando como denominador o número total de amostras testadas. Os indivíduos foram separados segundo o desfecho principal: indivíduos com mutação dos genes estudados. As seguintes variáveis: sexo (feminino ou masculino), idade (< ou >=15 anos), *status* clínicos (infectado assintomático ou infectado sintomático) e número de episódios pregressos de malária (< ou >=10 episódios) foram analisadas. Foram realizadas análises uni e bivariadas. Em caso de variáveis contínuas foi utilizado o teste de T de Student para ver a diferença entre médias em caso de séries de dados normais e Anova quando existam mais de três grupos de comparação. Em caso de séries que não cumpriram o critério da normalidade foram utilizados testes não paramétricos. Para variáveis categóricas, o teste utilizado foi o qui quadrado. As medidas de tendência central e de dispersão foram tratadas como mediana e IIQ quando distribuição não paramétrica. Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% para a medida resumo de associação e como nível de significância um valor de p menor que 0,05.

5.2.8. ASPECTOS ÉTICOS

As amostras deste projeto provêm do Projeto: “Vigilância genômica da Malária na Amazônia Brasileira”, CAAE: 75000917.7.0000.5248, parecer N. 2.733.678 (APÊNDICE I).

Todos os indivíduos foram informados devidamente sobre os projetos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os indivíduos entrevistados antes de 2012 seguem os princípios éticos da Declaração de Helsinki; após 2012, os preceitos éticos seguem os princípios da resolução 422/2012 do CNS.

6. RESULTADOS

De 142 amostras positivas para *P. falciparum* diagnosticadas pelos métodos de gota espessa e/ou PCR armazenadas no biorrepositório, 92 foram selecionadas por apresentarem boa qualidade de DNA, com extração bem sucedida e amplificação de *pfmsp1* e *pfmsp2* na PCR. Apenas dez amostras foram excluídas por apresentarem dados clínicos incompletos (Figura 6.1).

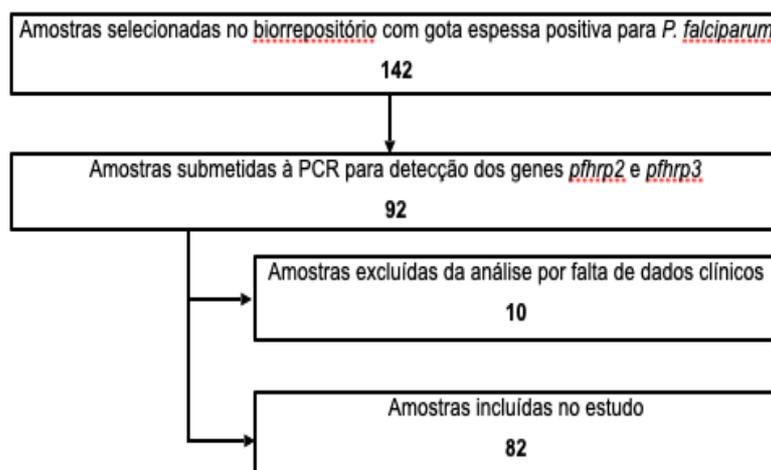


Figura 6.1. Fluxograma das amostras selecionadas.

As amostras selecionadas foram coletadas entre 2003 e 2016, sendo a maioria das amostras (77) coletadas nos anos de 2006 e 2007 (Tabela 6.1), o que impossibilitou a análise em relação ao tempo da coleta das amostras e a dinâmica de aparecimento da deleção.

Tabela 6.1. Número de amostras por ano de coleta

Ano de Coleta	Número de amostras	Percentual	Número acumulado	Percentual acumulado
2003	3	3,66	3	3,66
2006	58	70,73	61	70,73
2007	18	21,95	79	96,34
2016	3	3,66	82	100,00
TOTAL	82	100	82	100

6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS DO ESTUDO

As características de sexo, idade e episódios prévios de malária dos indivíduos do estudo estão sumarizadas na Tabela 6.2.:

Tabela 6.2. Características dos indivíduos incluídos no estudo (n=82)

			Mulheres	Homens	
		Total	N=37 (45,12%)	N=45 (54,88%)	p-value
			n (%)	n (%)	
	Mediana [IIQ]	17 [11,75-34]	16 [11,5-31,5]	20 [11,5-35]	
Idade n=82	<15 anos	30 (36,59%)	12 (40,00%)	18 (60,00%)	0,48
	>=15 anos	52 (63,41%)	25 (48,08%)	27 (51,02%)	
Malária pregressa n=82	Mediana [IIQ]	5 [2,75-8,00]	5 [2-8]	5 [3-8]	
	0	1 (1,22%)	1	0	1
	1	13 (15,85%)	7	6	0,39
	2 a 4	24 (29,27%)	10	14	0,26
	5 a 9	28 (34,15%)	11	17	0,23
	≥10	16 (19,51%)	8	8	0,35

IIQ: Intervalo interquartil

No total de 82 amostras, 37 (45,12%) correspondiam a indivíduos do sexo feminino e 45 (54,88%) do sexo masculino. A mediana da idade foi de 17 anos (intervalo interquartil = 11,75-34,00), sendo que a idade mínima foi de um ano e a máxima de 77 anos. A mediana de episódios prévios de malária foi de cinco (intervalo interquartil = 2,75-8). Somente um indivíduo, sexo feminino e 57 anos idade, não relatou episódios prévios de malária. Essa participante tinha a doença clínica. Um indivíduo do sexo masculino de 46 anos de idade refe-

riu ter tido mais de 50 malárias progressas. Entre os indivíduos com menos de 15 anos de idade, 12 (40%) eram do sexo feminino e 18 (60%) eram do sexo masculino. Já os participantes com 15 anos ou mais, 25 (48,08%) eram do sexo feminino e 27 (51,02%) eram do sexo masculino. A mediana da idade foi de 16 anos (intervalo interquartil = 11,5-31,5) entre as mulheres e de 20 anos (intervalo interquartil = 11,5-35) entre os homens. A mediana de episódios prévios de malária foi de cinco (intervalo interquartil = 2-8) entre as mulheres e também de cinco (intervalo interquartil = (3-8) entre os homens (Tabela 6.2).

Dos indivíduos incluídos, 58 (70,73%) estavam com quadro clínico de malária no momento da coleta do sangue e 24 (29,27%) estavam com infecção plasmodial assintomática (Tabela 6.3):

Tabela 6.3. Características dos indivíduos de acordo com o quadro clínico no momento da coleta da amostra.

Características		Malária	Infecção assintomática	p-value
		N=58 (70,73%) n (%)	N=24 (29,27%) n (%)	
Sexo n=82	Feminino	28 (48,28)	9 (37,50)	0,37
	Masculino	30 (51,72)	15 (62,50)	
Idade n=82	Mediana [IIQ]	16 [11,75-34,50]	21,50 [11,50-32,50]	0,37
	<15 anos	23 (76,67)	7 (23,33)	
	>=15 anos	35 (67,31)	17 (32,69)	
Malária progressa n=82	Mediana [IIQ]	5 [2-8]	5 [3-13,75]	1
	0	1 (1,72)	0 (0,00)	
	1	10 (17,24)	3 (12,50)	
	2 a 4	15 (25,86)	9 (37,50)	
	5 a 9	24 (41,38)	4 (16,67)	
	≥10	8 (13,79)	8 (33,33)	

IIQ: Intervalo interquartil

Foram classificados como malária clínica 58 (70,73%) participantes, dos quais 30 (51,72%) eram do sexo masculino e 28 (48,28%) do sexo feminino; enquanto 24 (29,27%) dos participantes tiveram infecções assintomáticas, nove (37,50%) do sexo feminino e 15 (62,50%) do sexo masculino. A mediana total de idade entre os casos de malária foi de 16 anos (intervalo interquartil = 11,75-34,50); enquanto a medida de idade entre os indivíduos com infecção assintomáticas foi de 21,50 anos (intervalo interquartil = 11,50-32,50). A mediana de casos de malária progressa entre os portadores de malária clínica e no grupo de portadores de infecção assintomática foi cinco, em ambos (intervalo interquartil = 2,00-8,00 e 3,00-13,75, respectivamente). Não houve diferença estatística entre indivíduos com malária e assintomáticos em relação a sexo, idade e malária progressa (Tabela 6.3).

Indivíduos que relataram mais de dez episódios prévios de malária tiveram uma chance 3,12 vezes maior de ter infecção assintomática quando comparados com indivíduos que relataram menos de dez episódios progressos (IC95%: 1,01-9,67); essa associação foi estatisticamente significativa ($p=0,04$). Um indivíduo do sexo masculino de 46 anos de idade referiu mais de 50 malárias progressas.

A associação das variáveis idade e número de episódios progressos de malária é apresentada no gráfico de dispersão (Figura 6.2):

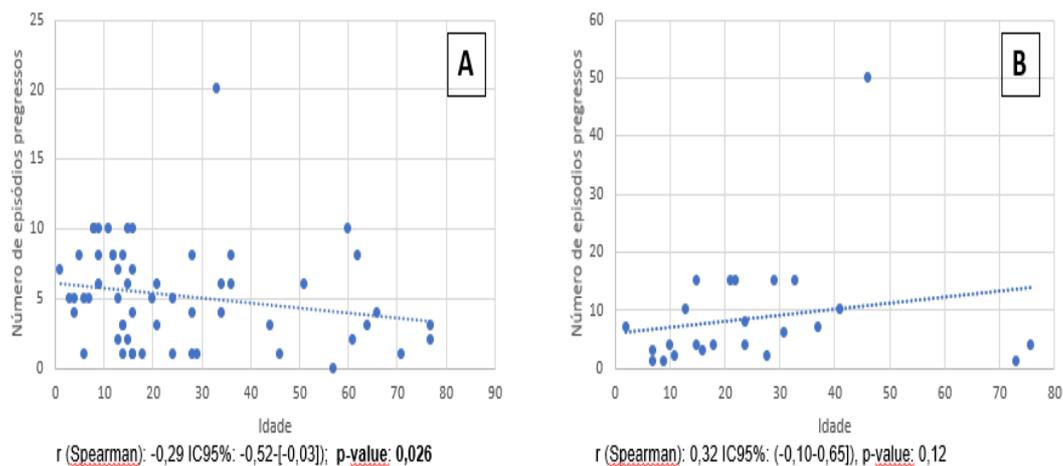


Figura 6.2. Correlação entre idade e número de episódios progressos de malária. A. Correlação entre o número de episódios progressos de malária e idade entre indivíduos com malária clínica. B. Correlação entre o número de episódios progressos de malária e idade entre indivíduos com infecção assintomática.

Nos indivíduos com malária clínica, o número de episódios está associado negativamente com a idade, uma correlação estatisticamente significativa ($p=0,026$), possivelmente porque quanto maior a idade menos são esperados episódios de malária clínica. Já nos indivíduos assintomáticos não houve uma correlação estatisticamente significativa, provavelmente pelo n ter sido pequeno (24 participantes).

Foram incluídos 69 indivíduos com infecção por *P. falciparum* (84,14%) e 13 com infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) (15,85%) a maioria sintomáticos (70,7%) (Tabela 6.3.):

Tabela 6.2. Características dos indivíduos incluídos no estudo com infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) ($n=13$):

Variável	Característica	n	%
Sexo n=13	Feminino	5	38,46 %
	Masculino	8	61,53 %
Idade (anos) n=13	< 15 anos	5	38,46 %
	≥ 15 anos	8	61,53 %
Quadro clínico n=13	Malária	5	38,46 %
	Infecção assintomática	8	61,53 %
Malária progressa n=13	0	0	0 %
	1	2	15,38 %
	2 a 4	2	15,38 %
	5 a 9	5	38,46 %
	≥10	4	30,76 %

6.2. ANÁLISES DOS GENES DO ESTUDO

Foi feita uma avaliação da sensibilidade da reação de PCR, ou seja, quantidade mínima de DNA molde necessária para amplificação dos genes *pfhrp2/pfhrp3* testando várias diluições dos DNAs controles HB3 (*pfhrp2+/*

pfhrp3-) e Dd2 (*pfhrp2*-/*pfhrp3*+). A figura 6.3 mostra a reação de PCR para amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2*. A amplificação das amostras diluídas foi possível até uma diluição de 05,ng/μL de DNA e não foi observada amplificação do fragmento na diluição de 100pg/μL de DNA. A amplificação do exon 2 do gene *pfhrp3*, comportou-se de forma semelhante.(figura 6.4) .A partir das diluições seriadas das amostras nos 2 PCRs foi possível inferir que a sensibilidade de amplificação dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* correu até a concentração de 0,5ng/μL de DNA.

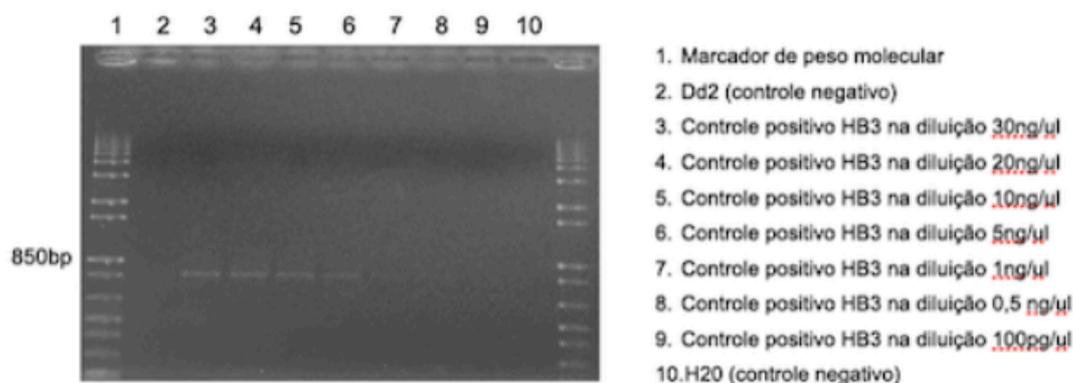


Figura 6.3. Gel de agarose 1% após eletroforese da PCR para amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2* do DNA HB3 em diferentes diluições. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher scientific).

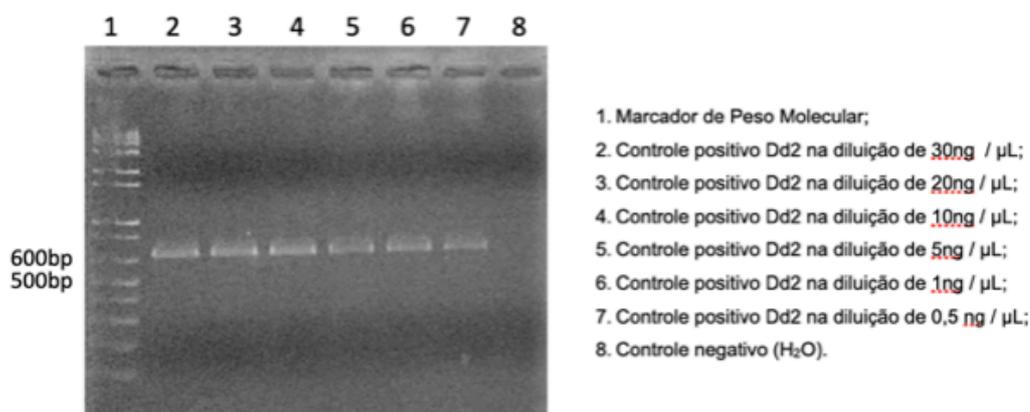


Figura 6.4. Gel de agarose 1% após eletroforese da PCR para amplificação do exon 2 do gene *pfhrp3* do DNA Dd2 em diferentes diluições. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher scientific).

Após os testes de sensibilidade, todos os DNAs de *P. falciparum* foram submetidos à reação de PCR para amplificação dos genes *pfhrp2*/*pfhrp3*.

A figura 6.5 mostra o resultado da primeira PCR para amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2*. As bandas amplificadas tinham aproximadamente 850pb:

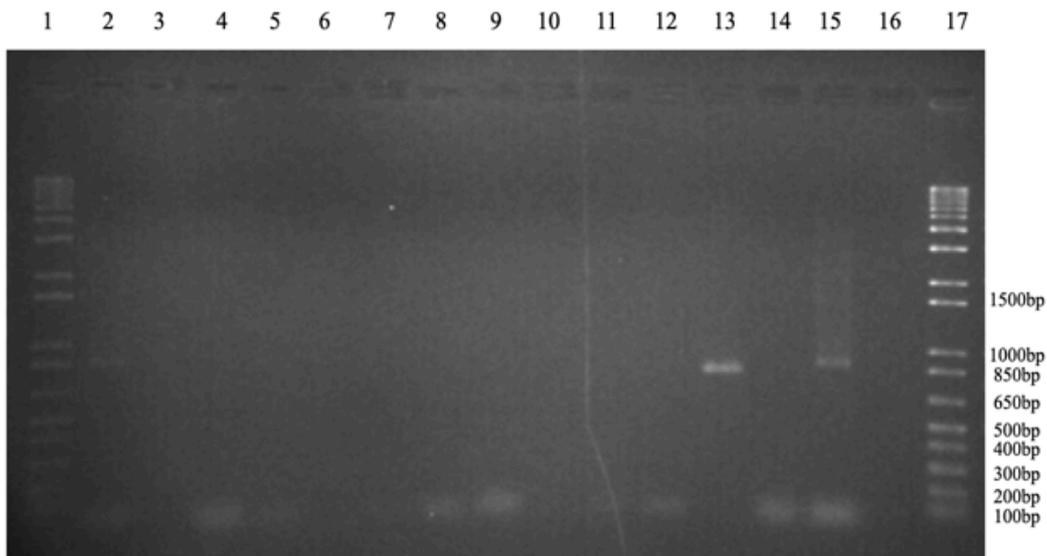


Figura 6.5. Gel agarose 1% após eletroforese da primeira PCR para amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2*. Ordem no gel: 1 e 17. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*Thermo Fisher scientific*), 2-12: DNA de *P.falciparum* de amostras clínicas 13. 3D7 (controle positivo), 14. Dd2 (controle negativo), 15. HB3 (controle positivo), 16. H2O (controle negativo).

As amostras que não apresentaram banda na primeira PCR foram submetidas à reação semi-nested PCR. A figura 6.6 apresenta parte do gel de eletroforese correspondente à semi-nested PCR das amostras da figura 6.5, e sete amostras que foram negativas no primeiro PCR, apresentaram bandas que variavam entre 500-850pb.

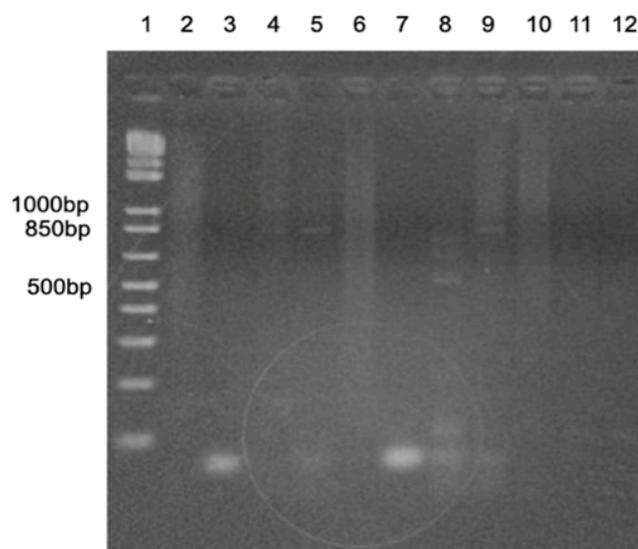


Figura 6.6. Gel agarose 1% após eletroforese da reação semi-nested PCR do exon2 do gene *pfhrp2*. Ordem no gel: 1. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*Thermo Fisher scientific*), 2-12: DNA de *P.falciparum* de amostras clínicas.

A Figura 6.7 mostra os resultados da primeira reação de PCR (A) e da semi-nested PCR do gene *pfhrp3* (B). Enquanto a primeira PCR apresentou banda apenas nos controles positivos 3D7 e Dd2, na reação semi-nested é possível observar banda nos poços correspondentes as amostras avaliadas.

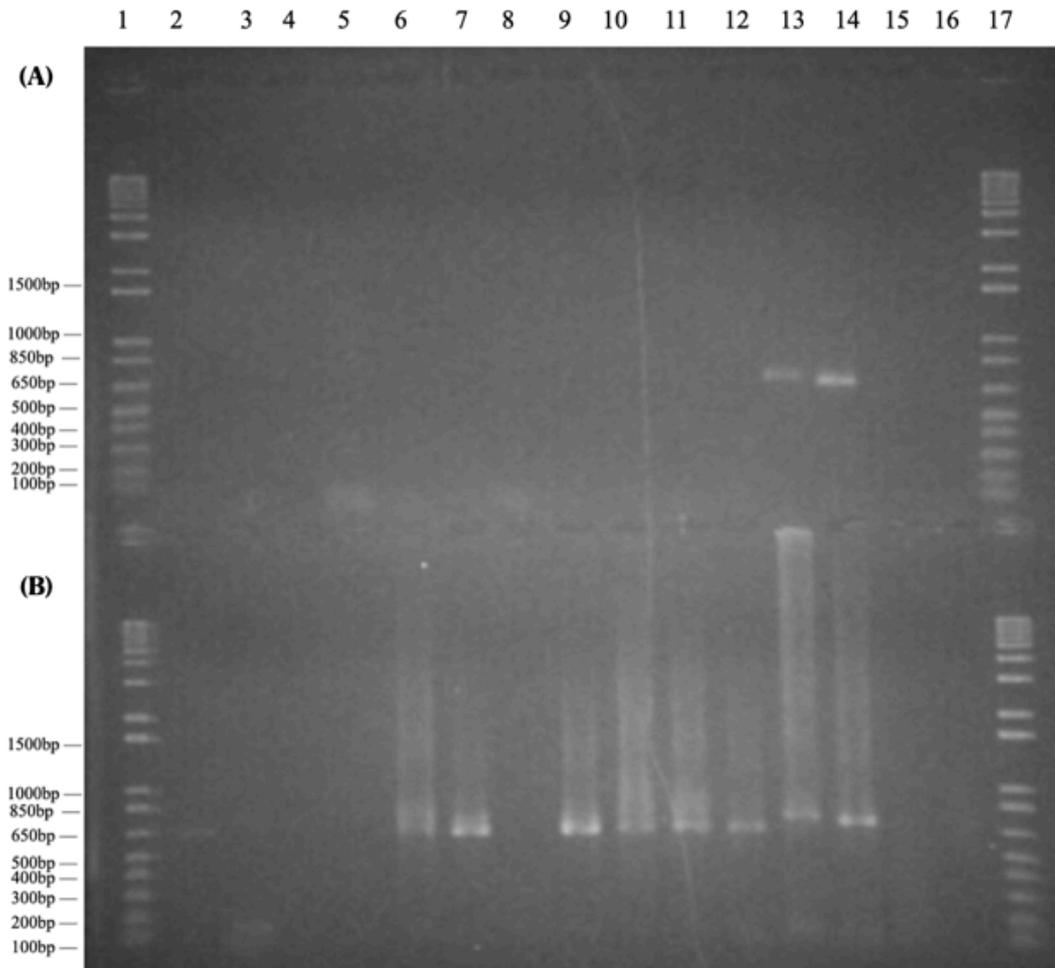


Figura 6.7. Gel agarose 1% após eletroforese da reação PCR do exon 2 do gene *pfhrp3* na primeira PCR **(A)** e na reação semi-nested **(B)**. Ordem no gel: 1 e 17. Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*Thermo Fisher scientific*), 2-12: DNA de *P.falciparum* de amostras clínicas **(A)** e respectivos produtos da primeira PCR **(B)**. 13. 3D7 (controle positivo), 14. Dd2 (controle positivo) e 15. HB3 (controle negativo) e 16. H2O (controle negativo).

Os resultados agregados são mostrados na Tabela 6.4. No APÊNDICE II, mostramos os resultados de cada amostra individualmente. Das 82 amostras, 43 (52,44%) não apresentaram amplificação de *pfhrp2*. Vinte e oito (34,15%) amostras tinham *pfhrp2* deletado e *pfhrp3* não deletado (*pfhrp2*- /

pfhrp3+) e 15 (18,29%) amostras apresentaram dupla deleção (*pfhrp2-* / *pfhrp3-*). Trinta e quatro (41,46%) amostras não apresentaram amplificação de *pfhrp3*, sendo 19 (23,17%) amostras com *pfhrp3* deletado e *pfhrp2* não deletado (*pfhrp2+* / *pfhrp3-*). Vinte (24,39%) amostras apresentaram amplificação de ambos os genes (*pfhrp2+* / *pfhrp3+*).

Tabela 6.4. Resultados da amplificação do exon 2 dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*

Genotipos	Número de amostras	Percentual	Número acumulado	Percentual acumulado
<i>pfhrp2-</i> / <i>pfhrp3+</i>	28	34,15	28	34,15
<i>pfhrp2-</i> / <i>pfhrp3-</i>	15	18,29	43	52,44
<i>pfhrp2+</i> / <i>pfhrp3-</i>	19	23,17	62	75,61
<i>pfhrp2+</i> / <i>pfhrp3+</i>	20	24,39	82	100
TOTAL	82	100	82	100

Das 13 amostras com infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*), duas apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp2*, três apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp3* e cinco apresentaram dupla deleção; três não apresentaram deleção de ambos os genes (Tabela 6.5.).

Tabela 6.5. Deleções em portadores de com infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) (n=13)

Genotipos	Número de amostras	Percentual	Número acumulado	Percentual acumulado
<i>pfhrp2-</i> / <i>pfhrp3+</i>	2	15,38 %	2	15,38 %
<i>pfhrp2-</i> / <i>pfhrp3-</i>	5	38,46 %	7	53,84 %
<i>pfhrp2+</i> / <i>pfhrp3-</i>	3	23,07 %	10	76,92 %
<i>pfhrp2+</i> / <i>pfhrp3+</i>	3	23,08 %	13	100 %
TOTAL	13	100	13	100

Das três amostras coletadas em 2003, duas apresentaram dupla deleção e uma não apresentou deleção de ambos os genes. Das 58 amostras coletadas em 2006, 23 apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp2*, 11 apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp3* e nove apresentaram dupla deleção; 15 não apresentaram deleção de ambos os genes. Das 18 amostras coletadas em 2007, cinco apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp2*, sete apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp3* e três apresentaram dupla deleção; três não apresentaram deleção de ambos os genes. Das três amostras coletadas em 2016, uma era exclusivamente *pfhrp3* deletada, uma apresentou dupla deleção e uma não apresentou deleção.

6.2.1. Amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2*

Amostras clínicas de *P. falciparum* que não apresentaram amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2* foram classificadas como *pfhrp2* deletado, enquanto amostras que apresentaram amplificação do exon 2 do gene *pfhrp2* foram classificadas como *pfhrp2* não deletado. Entre participantes do sexo feminino, 22 (59,46%) estavam infectadas por parasitos com o gene *pfhrp2* deletado, enquanto 15 (40,54%) estavam infectadas pelo parasito com o gene *pfhrp2* não deletado. Entre os homens, 21 (46,67%) estavam infectados com o parasito *pfhrp2* deletado, contra 24 (53,33%) com *pfhrp2* não deletado. A mediana de idade entre os indivíduos infectados por parasitos *pfhrp2* deletado foi de 24 anos (intervalo interquartil= 14,0 - 36,0).

Entre os indivíduos infectados por parasitos sem deleção a mediana de idade foi de 15,0 (intervalo interquartil= 9,0-33,25). Entre os participantes menores de 15 anos, 12 (40%) isolados clínicos apresentaram *pfhrp2* deletado e 18 (60%) *pfhrp2* não deletado. Entre os participantes com 15 anos de idade ou mais, 31 (59,62%) estavam infectados por parasitos *pfhrp2* deletado e 21 (40,38%) com *pfhrp2* não deletado. Vinte e sete (46,55%) indivíduos com malária clínica estavam infectados com parasitos *pfhrp2* deletado, enquanto 31 (53,45%) com *pfhrp2* não deletado. Entre os portadores da infecção assintomática 16 (66,67%) apresentaram *P. falciparum* com *pfhrp2* deletado e 8 (33,33%) com *pfhrp2* não deletado.

A mediana de episódios de malária progressa entre os indivíduos infectados por parasitos com deleção de *pfhrp2* foi de quatro malárias progressas

(intervalo interquartil= 2,0 - 8,0). Entre os indivíduos infectados por parasitos sem deleção, a mediana de episódios foi de cinco malárias progressas (intervalo interquartil= 3,0- 8,0) (Tabela 6.6).

6.2.2. Amplificação do exon 2 do gene *pfhrp3*

Trinta e quatro amostras não apresentaram amplificação do exon 2 do gene *pfhrp3*, destas, 19 tinham os genes *pfhrp3* deletado e *pfhrp2* não deletado (*pfhrp2+* / *pfhrp3-*). Amostras clínicas de *P. falciparum* que não apresentaram amplificação do exon 2 do gene *pfhrp3* foram classificadas como *pfhrp3* deletado, enquanto amostras que apresentaram amplificação do exon 2 do gene *pfhrp3* foram classificadas como *pfhrp3* não deletado. Entre participantes do sexo feminino, 14 (37,84%) foram infectadas por parasitos com o gene *pfhrp3* deletado, enquanto 23 (62,16%) apresentaram *pfhrp3* não deletado. Entre os homens, 20 (44,44%) tiveram *pfhrp3* deletado, contra 25 (55,56%) com *pfhrp3* não deletado.

A mediana de idade entre os indivíduos infectados por parasitos *pfhrp3* deletado foi de 21 anos (intervalo interquartil= 11,25 - 37,25). Entre os indivíduos infectados por parasitos sem deleção a mediana foi de 16 anos (intervalo interquartil= 11,25 - 32,00). Entre os participantes menores de 15 anos, nove (30%) isolados apresentaram *pfhrp3* deletado e 21 (70%) *pfhrp3* não deletado.

Entre os participantes com 15 anos de idade ou mais, 25 (48,08%) foram classificados como *pfhrp3* deletado e 27 (51,92%) como *pfhrp3* não deletado. Vinte e quatro (41,38%) indivíduos com malária clínica foram de isolados *pfhrp3* deletado, enquanto 34 (58,62%) foram isolados *pfhrp3* não deletado. Entre os portadores da Infecção assintomática dez (41,67%) apresentaram *pfhrp3* deletado e 14 (58,33%) apresentaram *pfhrp3* não deletado.

A mediana de episódios de malária progressa entre os indivíduos infectados por parasitos com deleção de *pfhrp3* foi de cinco malárias progressas (intervalo interquartil= 2,75 - 7,25). Entre os indivíduos infectados por parasitos sem deleção, a mediana de episódios foi de cinco malárias progressas (intervalo interquartil= 2,25- 8,0) (Tabela 6.6).

Não houve diferença estatística entre infecções por parasitos com ou sem deleção do gene *pfhrp2* ou *pfhrp3* em relação a sexo, idade, quadro clínico ou história progressa de malária (Tabela 6.6).

Tabela 6.6. Características dos indivíduos infectados com parasitos com o gene *Pfhrp2* deletado (n=43) e não deletado (n=39) e com os parasitos com o gene *Pfhrp3* deletado (n=34) e não deletado (n=48)

	<i>Pfhrp2</i> deletado N=43 n (%)	<i>Pfhrp2</i> não deletado N=39 n (%)	p-value	<i>Pfhrp3</i> deletado N=34 n (%)	<i>Pfhrp3</i> não deletado N=48 n (%)	p-value
Sexo n=82						
Feminino	22 (59,46)	15 (40,54)	0,25	14 (37,84)	23 (62,16)	0,55
Masculino	21 (46,67)	24 (53,33)		20 (44,44)	25 (55,56)	
Mediana [IIQ]	24 [14-36]	15 [9-33]		21 [11,25-37,25]	16 [11,25-32]	
Idade n=82						
<15 anos	12 (40,00)	18 (60,00)	0,09	9 (30,00)	21 (70,00)	0,11
>=15 anos	31 (59,62)	21 (40,38)		25 (48,08)	27 (51,92)	
Quadro clínico n=82						
Malária	27 (46,55)	31 (53,45)		24 (41,38)	34 (58,62)	
Infecção assintomática	16 (66,67)	8 (33,33)	0,09	10 (41,67)	14 (58,33)	0,98
Malária progressa n=82						
Mediana [IIQ]	4 [2-8]	5 [3-8]		5 [2,75-7,25]	5 [2,25-8,0]	
0	1 (1,22)	0 (0,00)	1	0 (0,00)	1 (100,00)	1
1	8 (9,76)	5 (6,10)	0,45	5 (38,46)	8 (61,54)	0,46
2 a 4	13 (15,85)	11 (13,41)	0,37	11 (45,83)	13 (54,17)	0,37
5 a 9	12 (14,63)	16 (19,51)	0,26	13 (46,43)	15 (53,57)	0,37
≥10	9 (10,98)	7 (8,54)	0,4	5 (31,25)	11 (68,75)	0,52

IIQ: Intervalo interquartil

Amostras com dupla deleção

Quinze amostras não apresentaram amplificação do *exon 2* do gene *pfhrp2* e do gene *pfhrp3* (dupla deleção), destas, seis (40%) amostras eram de participantes mulheres e nove do sexo masculino (60%). Amostras que apresentaram amplificação do *exon 2* do gene *pfhrp2* e do gene *pfhrp3* estão representadas no grupo sem deleção (20 amostras) ou deleção única (43 amostras). Neste grupo, 31 (46,27) eram do sexo feminino e 36 (53,73) eram do sexo masculino. A mediana de idade entre os indivíduos infectados por parasitos com dupla deleção foi de 28 anos (intervalo interquantil= 16 - 36). Entre os indivíduos infectados por parasitos sem deleção ou deleção única, a mediana foi de 16 anos (intervalo interquantil= 11 - 33).

No grupo sem deleção ou deleção única, 28 (41,79%) eram menores de 15 anos e 39 (58,21%) tinham 15 anos ou mais. Infecções por parasitos com dupla deleção foi maior em indivíduos com mais de 15 anos, 13 (86,67%), enquanto apenas dois (13,33%) eram de participantes menores de 15 anos ($p < 0,04$).

Malária clínica ocorreu em sete (46,67%) dos isolados *pfhrp2* e *pfhrp3* deletados, enquanto oito (53,33%) tiveram infecção assintomática. Entre as amostras sem deleção ou com deleção única, a maior parte dos participantes apresentaram malária clínica 51 (76,12%) enquanto 16 (23,88%) ocorreram em portadores de infecção assintomática. A chance de que um indivíduo assintomático tenha uma dupla deleção foi 3,64 vezes maior que os indivíduos com malária (IC95%: 1,14-11,61); essa associação foi estatisticamente significativa, ($p = 0,022$).

Entretanto não houve diferença em relação ao sexo ou malária pregressa. A mediana de episódios de malária pregressa entre os indivíduos infectados por parasitos com dupla deleção foi de cinco malárias pregressas (intervalo interquantil= 3 - 10). Entre os indivíduos infectados por parasitos sem deleção ou deleção única, a mediana de episódios foi de cinco malárias pregressas (intervalo interquantil= 2,0 - 8,0) (Tabela 6.7).

Tabela 6.7. Caracterização dos indivíduos infectados com parasitos com dupla deleção (n=15) dos genes *pfhrp2/ pfhrp3* e sem deleção ou deleção de um dos dois genes

<i>Pfhrp2 e pfhrp3</i>		Dupla deleção	Sem deleção ou deleção única	p-value
		N=15	N=67	
		n (%)	n(%)	
Sexo n=82	Feminino	6 (40,00)	31 (46,27)	0,66
	Masculino	9 (60,00)	36 (53,73)	
Idade n=82	Mediana [IIQ]	28 [16-36]	16 [11-33]	0,04¹
	<15 anos	2 (13,33)	28 (41,79)	
	>=15 anos	13 (86,67)	39 (58,21)	
Quadro clínico n=82	Infecção assintomática	8 (53,33)	16 (23,88)	0,022²
	Malária	7 (46,67)	51 (76,12)	
Malária progressa n=82	Mediana [IIQ]	5 [3-10]	5 [2-8]	1
	0	0 (0,00)	1 (1,49)	
	1	2 (13,33)	11 (16,42)	
	2 a 4	5 (33,33)	19 (28,36)	
	5 a 9	4 (26,67)	24 (35,82)	
	≥10	4 (26,67)	12 (17,91)	

¹OR (IC95%):0,21 (0,04-1,02); ²OR (IC95%): 3,64 (1,14-11,61)

7. DISCUSSÃO

Embora mulheres e crianças busquem serviços de saúde em maior número que homens, predominância de infecção por *Plasmodium ssp.* em indivíduos do sexo masculino em relação ao feminino e na faixa etária economicamente ativa já foi relatada em alguns estudos epidemiológicos nos estados da Amazônia Brasileira (BARBOSA et al., 2006; SUAREZ-MUTIS & COURA., 2007; GOMES et al., 2020). Em nosso estudo, houve uma amostragem relativamente equilibrada em relação ao gênero dos participantes, com 45,12% das amostras totais correspondentes a indivíduos do sexo feminino e 54,88% do sexo masculino. Isso pode ter ocorrido porque além do estudo de participantes sintomáticos que buscavam atendimento, também foi realizada busca ativa entre os contatos intra-domiciliares de cada participante-índice, favorecendo o diagnóstico de mulheres e crianças com atividades predominantemente domésticas. SUAREZ-MUTIS & COURA (2007), todavia, já haviam relatado um aumento na proporção de casos de malária entre mulheres na região do Rio Padauri, em Barcelos. Também não houve diferença significativa na distribuição por gênero entre os indivíduos infectados por parasitos com deleção de *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* e sem deleção.

Infecções por parasitos com dupla deleção foi maior em indivíduos com mais de 15 anos, 86,67% ($p < 0,04$) e por parasitos sem deleção ou deleção única foi maior em indivíduos com malária clínica, 76,12% ($p < 0,02$). Embora a relação entre faixa etária e infecção por parasitos deletados não seja frequentemente abordada, há uma relação mais observada entre faixa etária e quadro clínico e quadro clínico e infecção por parasitos mutantes. Indivíduos com infecção assintomática na população estudada foram mais velhos que os participantes com malária clínica, com medianas de idade de 21,50 anos e 16 anos, respectivamente. Indivíduos que relataram mais de dez episódios prévios de malária tiveram uma chance 3,12 vezes maior de ter infecção assintomática quando comparados com indivíduos que relataram menos de dez episódios progressos.

É reconhecido que em locais endêmicos, com transmissão classificada como estável de malária, indivíduos constantemente expostos desenvolvem imunidade contra a doença e em áreas de malária estável, os adultos são normalmente assintomáticos ou oligossintomáticos e apresentam uma baixa

parasitemia (SUAREZ-MUTIS & COURA, 2007). O padrão clínico observado no nosso estudo, em que infecção assintomática ocorreu com mais frequência em indivíduos com uma mediana de idade maior e teve maior chance de ocorrer em participantes com grande número episódios prévios da doença, enquanto indivíduos com malária clínica tiveram uma menor mediana da idade e menor número de episódios clínicos é compatível com o padrão observado em localidades hiperendêmicas, com transmissão estável como na África Subsaariana. Esses resultados são concordantes com os achados de SUAREZ-MUTIS & COURA (2007) que observaram que o acometimento pela malária entre os habitantes de localidades próximas ao Rio Padauri, em Barcelos, sofreu uma mudança no padrão epidemiológico de 1992 a 2004, em que cada vez mais crianças apresentavam formas sintomáticas de malária e adultos formas assintomáticas, além de maior prevalência de malária clínica em menores de 16 anos, especialmente em crianças menores de um ano. Os adultos maiores de 50 anos foram poupados sugerindo certo grau de resistência adquirida à infecção e/ou uma diminuição na prevalência de sintomas nos adultos; reforçando a hipótese de se tratar de uma área hiperendêmica com transmissão estável, com possíveis portadores assintomáticos de *Plasmodium sp.*

A Amazônia Brasileira, apesar de heterogênea, é classificada como uma área com transmissão instável (PASSOS & FIALHO, 1998). Quando a transmissão é flutuante nas taxas de inoculação do parasito e os indivíduos podem receber inóculos em intervalos anuais ou de vários anos, a malária é classificada como instável. Nesse cenário, aparentemente, a intensidade da transmissão não permite que os indivíduos desenvolvam imunidade naturalmente adquirida para ser suficientemente protetora. Os adultos nesses locais são normalmente acometidos por quadros sintomáticos, inclusive podem desenvolver formas graves (SUAREZ-MUTIS & COURA, 2007). Porém, em áreas da Amazônia Brasileira e Peruana, já foram anteriormente descritas a ocorrência de baixas parasitemias em indivíduos assintomáticos (ALVES et al., 2002; BRANCH et al., 2005, SUAREZ-MUTIS et al. 2007); no entanto, por serem consideradas áreas de baixa a moderada transmissão, esse fenômeno pode ter ocorrido por mecanismos imunológicos do hospedeiro ou por fatores parasitários distintos do que ocorrem na transmissão estável em regiões hiperendêmicas.

Ao comparar os resultados de deleções encontradas em Barcelos com estudos em outras áreas da Região Amazônica, observamos que, em relação

ao gene *pfhrp2*, enquanto em Barcelos 52,44% dos isolados avaliados eram *pfhrp2*-negativos, em diferentes áreas da Região Amazônica do Peru 41% das amostras coletadas entre 2003 e 2007 não tinham a amplificação de *pfhrp2*. A proporção de parasitos mutantes na região amazônica do Peru aumentou ao longo dos anos, segundo estudos subsequentes (MALTHA et al., 2012; AKINYI et al., 2013; BALDEVIANO et al., 2015). No município de Cruzeiro do Sul, Acre, 31,6% das amostras coletadas, em 2012, não tinham amplificação de *pfhrp2* (RACHID VIANA et al. 2017) enquanto as demais áreas avaliadas nesse estudo (Bolívia e os estados do Pará e Rondônia no Brasil) tiveram baixa frequência de parasitos com essa deleção.

O exon 2 do gene *pfhrp3* não foi amplificado em 41,46% das amostras avaliadas em Barcelos, no entanto, no Peru, não foi amplificado em 70% dos isolados avaliados (GAMBOA et al. 2010). RACHID VIANA et al. (2017) encontraram prevalências de parasitos *pfhrp3*-negativos elevadas no Acre (38%), Para (18,3% %), Rondonia e Bolívia (68%) dentre as amostras avaliadas.

Poucos estudos na América do Sul e no Sudeste Asiático observaram alta prevalência de parasitos com os genes *pfhrp2* deletado e *pfhrp3* presente quando comparados com outras formas de mutação: *pfhrp2*+/*pfhrp3*- e *pfhrp2*-/*pfhrp3*- (ABDALLAH et al., 2015; BESHIR et al., 2017). Na Região Amazônica a prevalência de parasitos sem deleção de *pfhrp3* é maior do que aqueles com deleção de *pfhrp2* (GAMBOA et al., 2010; RACHID VIANA et al. 2017). Sugere-se que, nessa região, parasitos sem *pfhrp3* podem estar presentes há mais tempo do que aqueles sem *pfhrp2* e que parasitos *pfhrp3* deletados tenham passado por um cruzamento genético com parasitos sem *pfhrp2* e produzido uma progênie sem os dois genes (GAMBOA et al., 2010; AKINYI et al., 2013).

Em Barcelos, no entanto, foi encontrada uma prevalência alta de parasitos com deleção de *pfhrp2* e *pfhrp3* não deletado (*pfhrp2*-/*pfhrp3*+; 34,15%), além de com deleção de *pfhrp3* e *pfhrp2* não deletado (*pfhrp2*+/*pfhrp3*-; 23,17%) e parasitos com dupla deleção (*pfhrp2*- / *pfhrp3*-; 18,29%).

Uma meta-análise sugere que a distribuição de deleções *pfhrp3* está associada a áreas de transmissão de intensidade relativamente baixa, mesmo no Continente Africano, onde a deleção de *pfhrp3* isolada não é comum (SEPÚLVEDA et al., 2018). Em estudo de campo na Nigéria, o genótipo *pfhrp2*+ / *pfhrp3*- não foi documentado, enquanto o gene *pfhrp2* estava ausente em 17% das amostras, sendo 6% de amostras totais com dupla deleção (FUNWEI et al,

2019). Na Tanzânia, de 137 amostras coletadas, 2,1% apresentaram deleção exclusiva de *pfhrp2* (*pfhrp2*-/*pfhrp3*+) e 1,4% tiveram dupla deleção (*pfhrp2*-/*pfhrp3*-), nenhuma amostra apresentou deleção exclusiva de *pfhrp3*. Em Uganda, de 194 amostras coletadas, 3,6% tiveram deleção de *pfhrp2* (*pfhrp2*-/*pfhrp3*+) e 1,0% apresentou dupla deleção (*pfhrp2*-/*pfhrp3*-) e nenhuma amostra foi negativa para *pfhrp3* e positiva para *pfhrp2* (THOMSON et al., 2019). Isolados com predominância de deleção de *pfhrp2* foram relatadas em estudos na Índia (BHARTI et al., 2016; PATI et al., 2018) e no Suriname (OKOTH et al., 2015). Em um total de 58 amostras negativas para RDT baseado em HRP2 coletadas em Odisha, Índia, 38 (65,5%) amostras tiveram o exon 2 do gene *pfhrp2* não detectado, enquanto 24 (41,4) tiveram o exon 2 do gene *pfhrp3* negativo, incluindo 17 amostras com dupla deleção (PATI et al., 2018). Possivelmente há uma melhor adaptação dos parasitos *pfhrp3*-positivos no hospedeiro (SEPÚLVEDA et al., 2018).. Números reduzidos de deleções de *pfhrp3* são encontradas em países africanos onde a intensidade da transmissão do *P. falciparum* da malária é maior do que em outros lugares. No Brasil onde as áreas de transmissão de malária são consideradas baixa, a alta prevalência de deleção de *pfhrp3* pode ser mantida.

As populações de ambientes de alta transmissão são susceptíveis de eliminar os parasitos *pfhrp3*-negativos da circulação por cruzamento genético no mesmo hospedeiro (SEPÚLVEDA et al., 2018). Em cruzamentos experimentais dos isolados 3D7 (*pfhrp2*+ / *pfhrp3*+) x HB3 (*pfhrp2*+ / *pfhrp3*-) e HB3 (*pfhrp2*+ / *pfhrp3*-) x DD2 (*pfhrp2*- / *pfhrp3*+), houve uma frequência menor de deleção do gene *pfhrp3* na respectiva progênie do que a esperada pela segregação Mendeliana (MURRAY et al., 2017; SEPÚLVEDA et al., 2018). Já foi aventada a hipótese de que os parasitos portadores do gene *pfhrp3* têm uma vantagem competitiva nas condições de laboratório e no hospedeiro chimpanzé utilizado nos cruzamentos genéticos (WELLENS et al., 1987).

A discrepância na prevalência genotípica de parasitos mutantes (*pfhrp2*-/*pfhrp3*+; *pfhrp2*+/*pfhrp3*-; *pfhrp2*-/*pfhrp3*-) em diferentes regiões endêmicas pode ser devido à emergência específica de determinado isolado no local, da seleção de uma variante de deleção em particular, da intensidade de transmissão, da taxa de cruzamento genético e de seu potencial de disseminação geográfica por regiões vizinhas ou mesmo distantes através de viajantes (PATI et al., 2018; SEPÚLVEDA et al., 2018). BALDEVIANO et al. (2015) realizaram

uma investigação molecular e epidemiológica de isolados de *P. falciparum* de um surto da doença entre 2010-2012, em Tumbes, na costa norte do Peru, onde não ocorriam casos de malária por *P. falciparum* desde 2006. A tipagem de microssatélites mostrou um genótipo idêntico em todos os 54 isolados estudados e também era idêntico ao dos parasitas isolados em 2010 na região de Loreto, na Amazônia Peruana. O sequenciamento de DNA revelou mutações fortemente associadas à deleção do gene *pfhrp2*. BERHANE et al. (2018) encontraram na Eritreia alta prevalência de parasitos *pfhrp2*-deletados; esses parasitos eram geneticamente menos diversos que os parasitos não deletados e formavam dois grupos sem relações próximas com os parasitos do Peru, indicando que provavelmente esses isolados surgiram de forma independente.

A alta prevalência dos parasitos mutantes no nosso estudo foram comparáveis aos observados em diferentes continentes. No Peru, a prevalência de isolados de *P. falciparum pfhrp2/3* deletados variou de 20 a 90% (GAMBOA et al., 2010; MALTHA et al., 2012; AKINYI et al., 2013). Na Ásia, em algumas áreas da Índia, a prevalência desses parasitos chegou a 25% (BHARTI et al., 2016). Na África, parasitos deletados tiveram prevalências variando entre 2 e 45%, alcançando 80% em dois hospitais regionais na Eritreia (BERHANE et al., 2018, GATTON et al., 2020). Variantes duplas negativas ocorreram em 21,6% das amostras do Peru (GAMBOA et al., 2010) e em 11,6% das amostras coletadas no Brasil (RACHID VIANA et al. 2017); enquanto em Barcelos, ocorreu em 18,29% dos isolados. Esta proporção também observada em estudo na Índia (22,4%) (PATI et al., 2018).

O Programa Nacional de Controle da Malária utiliza atualmente como teste para diagnóstico de malária o SD-BIOLINE MALARIA AG Pf/Pf/Pv, que detecta os antígenos HRP2 e Pf - pLDH, além de pLDH de *P. vivax* (BRASIL, 2020). Embora a utilização de um teste que detecte também o antígeno Pf-pLDH reduza o prejuízo na detecção de parasitos com deleção dos genes *pfhrp2/3*, a sensibilidade de detecção de Pf-LDH é inferior a de HRP2 (OCHOLA et al., 2006, CHIODINI et al., 2007; LI et al., 2017). Os RDTs baseados em HRP2 além de serem mais sensíveis de forma geral, apresentam desempenho superior sobretudo em baixas densidades parasitárias (WHO, 2018) e possuem melhor estabilidade térmica (OCHOLA et al., 2006). Portanto, a sensibilidade na detecção isolada do antígeno Pf-LDH e Pf-LDH em áreas quentes e com recorrentes infecções de baixa parasitemia, como o município de Barcelos e

outras áreas da Região Amazônica, a presença de parasitos com dupla deleção pode ter reduzir a sensibilidade destes testes.

Estudo recente avaliou o desempenho dos 32 RDTs da malária contra *P. falciparum* reconhecidamente com deleção do gene *pfhrp2*. Foram testados: 100 isolados clínicos de parasitos *pfhrp2*-positivos do tipo selvagem e 40 amostras de 10 diferentes cepas de parasitos *pfhrp2*-deletado. Os RDTs foram divididos em quatro grupos para serem analisados. O grupo 1 era de RDTs baseados na detecção de Pf-LDH sozinho ou em combinação com outros antígenos (n = 9) e teve 57,1% de positividade em amostras *pfhrp2* deletadas; o grupo 2, de RDTs que detectam pan-LDH isolado (n = 2), teve 95,6% de positividade; o grupo 3, de RDTs que detectam HRP2 isoladamente (n = 4), teve 43,4% de positividade e o grupo 4, de RDTs que detectam HRP2 e outro antígeno *Plasmodium spp* (LDH pan ou específico, ou aldolase) (n = 17), teve 23,7% de positividade. O estudo também demonstrou que os RDTs de detecção de PfLDH apresentam melhor desempenho na identificação *P. falciparum* sem *pfhrp2*, se alta densidade parasitária (GATTON et al., 2020).

Em recente recomendação, a OMS indica as áreas em que devem ser priorizada a vigilância de deleções dos genes *pfhrp2 / 3* : (1) áreas com identificação de discordância entre RDT baseados na detecção de HRP2 e resultados de microscopia relatadas, (2) com resultados não representativos ou relatos esporádicos de exclusões de *pfhrp2 / 3* no país, e (3) áreas vizinhas de uma localidade onde exclusões de *pfhrp2 / 3* frequentes foram identificadas (WHO, 2020). Populações de *P. falciparum* com deleções de *pfhrp2* e *pfhrp3* estão presentes na Amazônia peruana e brasileira, particularmente no Estado do Acre, Pará e Amazonas (GAMBOA et al., 2010; RACHID VIANA et al., 2017; WHO, 2020). Portanto, é indispensável avaliar a prevalência de parasitos com estas deleções de genes em outras regiões brasileiras, como o município de Barcelos, onde TDRs são utilizados. O estudo atual relata um cenário importante de deleções dos genes *pfhrp2 / pfhrp3* no município, onde a exclusão do exon 2 do gene *pfhrp2* foi observada em 52,44% das amostras, em contraste em 24,39% das amostras houve a amplificação do exon 2 de ambos os genes (*pfhrp2+* / *pfhrp3+*) dentre as amostras avaliadas. Segundo a OMS, quando a prevalência de deleções dos genes *pfhrp2* é superior a 5%, o RDT baseado em HRP2 deve ser revisto como método de triagem para o diagnóstico de malária.

Se a prevalência for menor a 5%, a recomendação é planejar a mudança em um período de tempo mais longo (WHO, 2016, WHO, 2020).

A chance de um indivíduo assintomático ter uma dupla deleção foi maior que entre os indivíduos com malária clínica (3,64 vezes); essa associação não foi observada na deleção isolada de um dos dois genes estudados. Os antígenos HRP2 e HRP3 são homólogos estruturais (BAKER et al., 2005; BHARTI et al., 2016) e os genes *pfhrp2* e *pfhrp3* provavelmente são derivados de um gene ancestral comum, sendo assim, possivelmente um pode compensar a função do outro (ROCK et al., 1987). O que poderia explicar porque houve diferença na clínica entre os participantes com dupla deleção e não entre os indivíduos infectados por parasitos com deleção única. A associação encontrada está de acordo com estudo realizado na República Democrática do Congo que procurou explorar diferenças clínicas entre crianças infectadas com plasmódio com deleção de *pfhrp2* e sem deleção. Nesse estudo, foram observadas densidades mais baixas de parasitos pela PCR em tempo real, menor proporção de positividade para microscopia e menos febre entre indivíduos infectados por plasmódios *pfhrp2* deletados, embora sem conclusões significativas pelos dados clínicos limitados (PARR et al., 2017).

A hipótese de que a deleção dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3* pode gerar um custo reprodutivo para o parasito, levando a quadros clínicos mais brandos, foi levantada em estudos *in vitro* e clínicos, sem conclusões definitivas até o momento (SULLIVAN et al., 1996; PARR et al., 2017; SEPÚLVEDA et al., 2018). Estudos de modelagem mostram a existência de uma vantagem dos parasitos com deleção de *pfhrp2* e *pfhrp3* sobre parasitos sem deleção através da pressão seletiva provocada pelo uso a longo prazo de RDTs baseados em HRP2 (BERHANE et al., 2018; GATTON et al., 2020). No entanto, a existência e a prevalência crescente de deleções de *pfhrp2* e *pfhrp3* no Peru (GAMBOA et al., 2010; MALTHA et al., 2012; AKINYI et al., 2013) onde RDTs baseados na detecção de HRP2 não são amplamente utilizados, demonstra que o tratamento seletivo baseado em resultados de testes não é o único fator que impulsiona a seleção desses parasitos (THOMSON et al., 2020).

A função dos genes *pfhrp2* / 3 não é bem compreendida; diferentemente dos genes que expressam os antígenos LDH ou aldolase, que por atuarem como enzimas essenciais para o metabolismo e sobrevivência dos parasitos,

são incapazes de serem excluídos (HERMAN et al., 2019; PATI et al., 2018). Em estudos *in vitro*, o HRP2 se liga a moléculas do grupo heme e parece catalisar a cristalização do heme para formar hemozoína. Esta função é relevante para a desintoxicação do parasito pelo heme da hemoglobina do hospedeiro. No entanto, os clones de *P. falciparum* com *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* deletados e mesmo plasmódios de outras espécies que, portanto, não possuem esses genes e não expressam seus respectivos antígenos, também conseguem produzir hemozoína (SULLIVAN et al., 1996; POTI et al., 2020).

O HRP2 pode estar relacionado à supressão da proliferação de linfócitos T e B e à inibição da produção de *interferon-gama* por linfócitos T, favorecendo a evasão do parasito do sistema imunológico do hospedeiro (POTI et al., 2020). O antígeno também pode estar associado ao sequestro de hemácias infectadas nos capilares, evitando a depuração esplênica (BUFFET et al., 2011) e com a redução da integridade da barreira hematoencefálica, aumentando a expressão de moléculas de citoaderência na superfície endotelial. De fato, a gravidade da malária apresenta correlação com a concentração plasmática de HRP2 e com a persistência de eritrócitos infectados no hospedeiro (POTI et al., 2020). Pacientes infectados por *P. falciparum* e tratados podem apresentar uma entidade clínica denominada hemólise tardia pós-hipertensiva (PADH), causada pela destruição de eritrócitos previamente infectados circulantes após a remoção do parasito; a aferição da concentração de HRP2 no sangue total dos indivíduos com malária grave tratados com artesunato apresentou potencial utilidade em prever a PADH (NDOUR et al. 2017; POTI et al. 2020).

Há uma hipótese já bordada nesse estudo de que parasitos portadores do gene *pfhrp3* e que, portanto, expressam HRP3, apresentam uma vantagem competitiva *in vitro* (WELLENS et al., 1987). Possivelmente, há uma melhor adaptação dos parasitos *pfhrp3*-positivos no hospedeiro (SEPÚLVEDA et al., 2018). No entanto, são necessários mais estudos para concluir que essas deleções geram um custo adaptativo para essas variantes (SEPÚLVEDA et al., 2018).

A compreensão da virulência e patogenicidade dos parasitos deletados de *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* e se esses parasitos apresentam padrões de sensibilidade aos medicamentos antimaláricos diferentes dos parasitos sem deleção

precisa ser melhor estudada (BOSCO et al. 2020; WHO, 2020). Se as deleções de *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* estiverem associadas a infecções menos virulentas, pode haver uma diferença na prevalência entre infecções sintomáticas e assintomáticas e muitos estudos podem não ser verdadeiramente representativos da prevalência de deleções em uma população ou país (THOMSON et al., 2020). KOITA et al. e HOUZÉ et al. mostraram o potencial de parasitos com deleção do gene *pfhrp2* e/ou *pfhrp3* de causar doença grave. No entanto, é importante observar que os fatores que determinam se o hospedeiro infectado desenvolverá um quadro assintomático ou sintomático, uma doença leve ou grave, são múltiplos e não somente associados às características genéticas do parasito, tais como: taxa de inoculação do mosquito, imunidade adquirida, polimorfismos genéticos do hospedeiro humano, estado de nutrição do indivíduo infectado, condições ambientais e acesso a um tratamento eficiente (BOSCO et al. 2020).

Os polimorfismos, como o traço falciforme em seres humanos, são exemplares da co-evolução hospedeiro-parasito. A anemia falciforme, uma hemoglobinopatia de caráter genético, causada por uma mutação na posição 6 do gene da β -globina. Sua clínica depende se o indivíduo acometido é portador do traço falciforme ou se é um indivíduo homocigótico para o alelo mutado. Enquanto os indivíduos homocigóticos apresentam anemias severas, infecções graves e lesões em órgãos vitais que reduzem de forma considerável a expectativa de vida, o traço falciforme encontra-se amplamente distribuído, com frequências muito elevadas na África Subsaariana, cuja distribuição coincide com a do *P. falciparum*. Os eritrócitos dos indivíduos com traço falciforme são mais dificilmente parasitados pelo *P. falciparum* e o mecanismo de citoadesão é prejudicado, o que leva os indivíduos acometidos pelo traço falciforme a apresentarem uma vantagem seletiva sobre os outros indivíduos nas regiões hiperendêmicas de malária, por estarem menos expostos a doença, sobretudo em sua forma grave e potencialmente letal antes da idade reprodutiva (MACHADO et al., 2010). Entre hospedeiro e parasito há uma estreita relação que se aprimora com o passar de longos períodos de convívio, levando a menor dano ao hospedeiro e alguma vantagem ao parasito. O espectro clínico sintomático grave, não traz benefício do ponto de vista evolutivo para nenhuma das partes (MACHADO et al., 2010). Da mesma forma, parasitos deletados de *pfhrp 2 / 3* po-

dem ser selecionados naturalmente, não apenas pela pressão seletiva do uso de testes rápidos que identificam de forma seletiva os parasitos não deletados e por consequência promovem a eliminação desses através de um tratamento precoce; mas também pelo fato dos parasitos mutantes ao provocarem parasitemias mais brandas e quadros clínicos assintomáticos, gerarem menos danos ao hospedeiro humano.

Os fragmentos obtidos foram variáveis para o gene *pfhrp2*, de 600 a 1000 pb, enquanto para o gene *pfhrp3* foi menos inconstante, de 500 pb. Variações no gene *pfhrp2* foram descritas por *Baker et al.* (2005 e 2010) de 600 a 960 pb e são causadas por diferentes números de repetições que, quando traduzido em sequências de aminoácidos, levam a repetições diferentes de aminoácidos na proteína HRP2. O gene *pfhrp2* está localizado em uma região subtelomérica do cromossomo 8 em que são frequentes recombinações e quebra cromossômica. Consequentemente, o antígeno HRP2 tem uma estrutura muito variável (JONES et al., 2020).

KUMAR et al. (2013) e *LÊ et al.* (2020) encontraram maior diversidade genética em *pfhrp2* do que em *pfhrp3*. Em 108 amostras analisadas por *KUMAR et al.* (2013), *pfhrp2* variou de 472 a 1.000 bp e as proteínas codificadas variaram de 157 a 333 aminoácidos. A maioria das sequências mostraram uma estrutura semelhante de início e fim, começando com a repetição do tipo 1 (AHHAHHVAD) e terminando com as sequências de repetição do tipo 12 (AH-HAA). A parte central das sequências, no entanto, foi variável, seguindo um padrão de distribuição geográfica do parasito. Entre todas as 13 sequências de repetição, tipo 2 (AHHAHHAAD) e tipo 7 (AHHAAD) foram mais frequentes. As repetições dos tipos 2 e 7, localizadas no exon 2, aparentemente são o alvo dos anticorpos monoclonais RDT e ambas podem aparecer no HRP3 (JONES et al., 2020). O tamanho de *pfhrp3* em *KUMAR et al.* (2013) variou de 477 pb a 832 pb em 103 isolados avaliados, que codificavam proteínas de 159 a 277 aminoácidos.

LÊ et al. (2020) avaliaram a variação genética dos genes *pfhrp2* / 3 em isolados de *P. falciparum* coletados de pacientes sintomáticos entre 2013 e 2015 em Myanmar; foram amplificadas com sucesso 84 sequências de *pfhrp2* e 56 sequências de *pfhrp3* foram. Altos níveis de variação genética foram encontrados, com diferenças nos tipos de repetição e comprimentos. O tamanho

dos produtos amplificados variou de 100-1000 bp para *pfhrp2* e 50-600 bp para *pfhrp3*. Uma análise comparativa com um banco global revelou que amostras de diferentes países compartilham características estruturais com os genes dos parasitos de Myanmar. Na maioria das amostras estudadas, o gene *pfhrp2* começou com a repetição tipo 1 e terminou com repetição do tipo 12. Esta organização estrutural também foi identificada nos genes analisados globalmente.

Como limitações do estudo, podem ser colocadas a ausência da descrição da parasitemia de cada amostra, a amplificação isolada do exon 2, não ter sido realizada a amplificação dos genes flanqueadores e a testagem com RDT baseado em HRP2 e com RDT de outro antígeno ou ELISA. Estudos futuros deverão ajudar a esclarecer essas questões.

Finalmente, para estimar a prevalência de deleção de gene *pfhrp2* na região e a necessidade de medidas de reformulação nos testes de triagem empregados, serão necessárias mais pesquisas. Porém, os resultados do atual estudo foram compatíveis com estudos globais em áreas de alta prevalência dos parasitos mutantes. Portanto, é altamente recomendável implementar um programa de vigilância ativa para detectar infecções por parasitos com exclusão de *pfhrp2* e *pfhrp3* no município de Barcelos e em territórios vizinhos.

8. CONCLUSÕES

Neste estudo foi encontrado um alto percentual de deleção dos genes *pfhrp2* (52,44%) e *pfhrp3* (41,46) em amostras clínicas de indivíduos do município de Barcelos, estado do Amazonas. As características das deleções encontradas são correspondentes com estudos de campo em países de alta transmissão como em países da África Subsaariana, com frequência relevante do genótipo *pfhrp2* - / *pfhrp3*+ em comparação com outros estudos na América do Sul. A discrepância na prevalência genotípica de parasitos mutantes pode ser devida à emergência específica de um determinado isolado no local e da seleção de uma variante de deleção em particular. Os fragmentos obtidos foram mais variáveis para o gene *pfhrp2* que para o gene *pfhrp3*, em concordância com o descrito na literatura.

O padrão clínico observado no nosso estudo, em que infecção assintomática ocorreu com mais frequência em indivíduos mais velhos e teve maior chance de ocorrer em participantes com grande número episódios prévios da doença também é compatível com o padrão observado em localidades de alta endemicidade e já foi descrito no local.

Infecção por parasitos com deleção dos genes em estudo ocorreu mais em indivíduos de maior idade e assintomáticos. A chance de um indivíduo assintomático estar infectado por um parasito com dupla deleção foi consideravelmente maior do que entre os indivíduos com malária clínica, sendo este resultado estatisticamente significativo.

9. PERSPECTIVAS

Nosso estudo pode ser incluso em uma análise mais abrangente de prevalência de deleções dos genes *pfhrp2* e *pfhrp3*, visto que foi realizado com amostras coletadas em serviço público de saúde em área endêmica para malária por *P. falciparum*, com participantes sintomáticos inclusos. É importante realizar novas pesquisas de acompanhamento para monitorar a prevalência dos parasitos deletados, conforme preconizado pela OMS.

A inclusão de mais etapas no método de investigação de exclusões como cálculo da parasitemia de cada amostra, amplificação do exon 1 e do íntron de cada gene, amplificação dos genes flaqueadores, testagem com RDT baseado em HRP2 e com RDT de outro antígeno ou ELISA promoverá maior robustez aos resultados encontrados.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBA, K. et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane database of systematic reviews*, n. 7, 2011.
2. ABDALLAH, J. F. et al. Prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. *Malaria journal*, v. 14, n. 1, p. 19, 2015.
3. ADEMOLUE, T. W., ANIWEH, Y., KUSI, K.A., AWANDARE, G.A. Patterns of inflammatory responses and parasite tolerance vary with malaria transmission intensity. *Malaria journal* v.16, p. 145, 2017.
4. ADU-GYASI, D., et al. Assessing the performance of only HRP2 and HRP2 with pLDH based rapid diagnostic tests for the diagnosis of malaria in middle Ghana, Africa. *PloS one*, v. 13, n. 9, p. e0203524, 2018.
5. AGABA, B. B. et al. Systematic review of the status of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletion, approaches and methods used for its estimation and reporting in *Plasmodium falciparum* populations in Africa: review of published studies 2010–2019. *Malaria journal*, v. 18, n. 1, p. 355, 2019.
6. AKINYI, S., et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Scientific reports*, v. 3, p. 2797, 2013.
7. ALVES, F. P. et al. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 66, n. 6, p. 641-648, 2002.
8. BAKER, J.R., et al. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 46, n. 4, p. 416-426, 1992.

9. BAKER, J., et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *The Journal of infectious diseases*, v. 192, n. 5, p. 870-877, 2005.
10. BAKER, J., et al. Transcription and expression of *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins in different stages and strains: implications for rapid diagnostic tests. *PloS one*, v. 6, n. 7, p. e22593, 2011.
11. BALDEVIANO, G. C., et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* malaria outbreak, Tumbes, Peru, 2010–2012. *Emerging infectious diseases*, v. 21, n. 5, p. 797, 2015.
12. BARBOSA, H. H. M. M. et al. Epidemiologia dos pacientes atendidos no programa de malária na unidade de saúde da pedreira, em Belém. *Revista Paraense de Medicina*, Belém, v. 20, n. 1, p. 58, 2006.
13. BELL, D.R., WILSON, D.W., et MARTIN, L.B. False-positive results of a *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2–detecting malaria rapid diagnostic test due to high sensitivity in a community with fluctuating low parasite density. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 73, n. 1, p. 199-203, 2005.
14. BELL, D., WONGSRICHANALAI, C., BARNWELL, J. W. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved?. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 9, p. 682-695, 2006.
15. BERHANE, A., et al. Major threat to malaria control programs by *Plasmodium falciparum* lacking histidine-rich protein 2, Eritrea. *Emerging infectious diseases*, v. 24, n. 3, p. 462, 2018.
16. BERZOSA, P., et al. First evidence of the deletion in the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *Plasmodium falciparum* from Equatorial Guinea. *Malaria Journal*, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2020.
17. BESHIR, K. B. et al. *Plasmodium falciparum* parasites with *histidine-rich protein 2 (pfhrp2)* and *pfhrp3* gene deletions in two endemic regions of Kenya. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

18. BHARTI, P. K. et al. Prevalence of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* gene deletion in *Plasmodium falciparum* population in eight highly endemic states in India. *PLoS One*, v. 11, n. 8, p. e0157949, 2016.
19. BOPP, S. E. R. et al. Mitotic evolution of *Plasmodium falciparum* shows a stable core genome but recombination in antigen families. *PLoS Genet*, v. 9, n. 2, p. e1003293, 2013.
20. BOSCO, A. B. et al. Molecular surveillance reveals the presence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in *Plasmodium falciparum* parasite populations in Uganda, 2017–2019. *Malaria Journal*, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2020.
21. BRANCH, O., et al. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria journal*, vol. 4, no 1, p. 1-16, 2005.
22. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de diagnóstico laboratorial da malária* (2^oed). Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
23. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. *Guia de tratamento da malária no Brasil*. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.
24. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Situação epidemiológica da malária no Brasil*. Atualizado em 16 de novembro 2020 [acesso em 20 novembro 2020]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/m/malaria>.
25. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Incidência de Falciparum Anual (IFA)*. [acesso em 20 novembro 2020]. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/July/19/Ficha-Qualifica----o-IFA-20.05.2020.pdf>.
26. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde GT-Malária/CGZV. *TESTES RÁPIDOS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA – Pf/Pv*. [acesso em 02 de fevereiro 2021]. Disponível em: <https://antigo-saude.gov.br/images/pdf/2020/July/19/folder-teste-rapido-malaria-2020.pdf>.

27. BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: A molecular epidemiological investigation. *Lancet Global Health*, v. 5, p. e1038-1046, 2017.
28. BRONNER, U.; KARLSSON, L.; EVENGÅRD, B. Evaluation of rapid diagnostic tests for malaria in Swedish travellers. *Apmis*, v. 119, n. 2, p. 88-92, 2011.
29. BUFFET, P. A. et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, v. 117, n. 2, p. 381-392, 2011.
30. CARLOS, B. C. et al. A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. *Pathogens and Global Health*, v. 113, n. 1, p. 1-13, 2019.
31. CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *The history of malaria, an ancient disease*. Atlanta, GA: CDC, 2010.
32. CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. [www.cdc.org]. *Malaria, Biology, Lifecycle*. Page last reviewed: July 16, 2020. [acesso em 20 setembro 2020]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>.
33. CERUTTI, C., et al. Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malaria Journal*, v. 6, n. 1, p. 33, 2007.
34. CHENG, Q., et al. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malaria journal*, v. 13, n. 1, p. 283, 2014.
35. CHIN, W., et al. A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science*, v. 149, n. 3686, p. 865-865, 1965.
36. CHIODINI, P.L. et al. The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 101, n. 4, p. 331-337, 2007.

37. CHIODINI, P. L. Malaria diagnostics: now and the future. *Parasitology*, v. 141, n. 14, p. 1873-1879, 2014.
38. COATNEY, G. R. *The primate malarias*. US National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 1971.
39. COSTA, M.R.F., et al. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 381-385, 2008.
40. COURA, J.R., SUÁREZ-MUTIS, M., LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.
41. COUTO, R., et al. Autochthonous malaria notified in the State of São Paulo: clinical and epidemiological characteristics from 1980 to 2007. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2010.
42. CURADO, I., et al. Malaria epidemiology in low-endemicity areas of the Atlantic Forest in the Vale do Ribeira, São Paulo, Brazil. *Acta tropica*, v. 100, n. 1-2, p. 54-62, 2006.
43. DALRYMPLE, U., et al. How long do rapid diagnostic tests remain positive after anti-malarial treatment?. *Malaria journal*, v. 17, n. 1, p. 228, 2018.
44. DATASUS. DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS [http://www.tabnet.datasus.gov.br]. *Índice parasitário anual (IPA) de malária – D.4*. [acesso em 27 out 2020]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/tabdata/Livro-IDB/2edrev/d04.pdf>.
45. DHARIA, N. V., et al. Genome scanning of Amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. *Genome research*, v. 20, n. 11, p. 1534-1544, 2010.
46. DE MENDONÇA, T. B. *Estudo da dinâmica da transmissão de malária*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.
47. DE MENEZES, E. S. O trabalho extrativista da piaçaba em Barcelos-AM, Brasil: servidão por dívida e resistência dos piaçabeiros. *Revista Latinoamericana de Antropología del Trabajo*, v. 2, n. 4, 2018.

- 48.DEANE, L.M., et al. Monkey malaria in Brazil: A summary of studies performed in 1964-1966. *Bulletin of the World Health Organization*, 1967.
- 49.DEANE, L.M., DEANE, M.P., NETO, J. F. Studies on transmission of simian malaria and on a natural infection of man with *Plasmodium simium* in Brazil. *World Health Organization*, v. 35, n. 5, p. 805, 1966.
- 50.DEANE, L.M. Malaria vectors in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 81, n. Suppl II, p. 5-14, 1986.
- 51.DESPOMMIER, D.D., GWADZ, R.W., HOTEZ, P.J. Malaria: *Plasmodium falciparum* (Welch 1898), *Plasmodium vivax* (Grassi and Filetti 1889), *Plasmodium ovale* (Stephens 1922), *Plasmodium malariae* (Laveran 1881). In : *Parasitic Diseases*. Springer, New York, NY, p. 174-189, 1995.
- 52.DINI, S., et al. Investigating the efficacy of triple artemisinin-based combination therapies for treating *Plasmodium falciparum* malaria patients using mathematical modeling. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 62, n. 11, 2018.
- 53.DOCTOR, S. M. et al. Malaria surveillance in the Democratic Republic of the Congo: comparison of microscopy, PCR, and rapid diagnostic test. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 85, n. 1, p. 16-18, 2016.
- 54.DONDORP, A. M. et al. Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. *The Journal of infectious diseases*, v. 197, n. 1, p. 79-84, 2008.
- 55.DONDORP, A. M., et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 272-280, 2010.
- 56.DOOLAN, D. L., DOBAÑO, C., BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 1, p. 13-36, 2009.
- 57.DORADO, E. J., et al. Genetic characterisation of *Plasmodium falciparum* isolates with deletion of the *pfhrp2* and/or *pfhrp3* genes in Colombia: the Amazon region, a challenge for malaria diagnosis and control. *PLoS One*, v. 11, n. 9, p. e0163137, 2016.

- 58.FERREIRA, M.U., CASTRO, M.C. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malaria journal*, v. 15, n. 1, p. 1-18, 2016.
- 59.FINNEY, C.A.M., et al. Divergent roles of IRAK4-mediated innate immune responses in two experimental models of severe malaria. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 83, n. 1, p. 69-74, 2010.
- 60.FLORENS, L. et al. A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature*, v. 419, n. 6906, p. 520-526, 2002.
- 61.FONTTECHA, G. et al. Deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes of *Plasmodium falciparum* from Honduras, Guatemala and Nicaragua. *Malaria journal*, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2018.
- 62.FRANCISCHETTI, I.M.B., SEYDEL, K.B., MONTEIRO, R.Q. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*, v. 15, n. 2, p. 81-107, 2008.
- 63.FUNWEI, R., et al. Molecular surveillance of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes deletion in *Plasmodium falciparum* isolates and the implications for rapid diagnostic tests in Nigeria. *Acta tropica*, v. 196, p. 121-125, 2019.
- 64.FVS-AM. Fundação de Vigilância em Saúde - Amazonas. [<http://www.fvs.am.gov.br>]. *Mais de 63 mil casos de malária foram registrados no Amazonas em 2019*. [acesso em 27 out 2020]. Disponível em: http://www.fvs.am.gov.br/noticias_view/22.
- 65.GAMBOA, D., et al. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PloS one*, v. 5, n. 1, p. e8091, 2010.
- 66.GATTON, M. L., et al. Impact of *Plasmodium falciparum* gene deletions on malaria rapid diagnostic test performance. *Malaria Journal*, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2020.
- 67.GENDROT, M. et al. Genetic diversity and deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 5, p. 580-585, 2019.
- 68.GILLET, P., et al. Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. *Malaria journal*, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2009.

69. GILLET, P., et al. Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed?. *Malaria journal*, v. 10, n. 1, p. 166, 2011.
70. GOMES, A. P. et al. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 3, p. 358-369, 2011.
71. GOMES, M. D. S. M. et al. Malária na fronteira do Brasil com a Guiana Francesa: a influência dos determinantes sociais e ambientais da saúde na permanência da doença. *Saúde e Sociedade*, v. 29, p. e181046, 2020.
72. GRIFFING, S. M., et al. A historical perspective on malaria control in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 701-718, 2015.
73. GUPTA, Himanshu et al. Molecular surveillance of *pfhrp2* and *pfhrp3* deletions in *Plasmodium falciparum* isolates from Mozambique. *Malaria journal*, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2017.
74. HAYWARD, R. E., SULLIVAN, D. J.; DAY, K. P. *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II is expressed during gametocyte development. *Experimental parasitology*, v. 96, n. 3, p. 139-146, 2000.
75. HERMAN, C., et al. Multiplex malaria antigen detection by bead-based assay and molecular confirmation by PCR shows no evidence of *Pfhrp2* and *Pfhrp3* deletion in Haiti. *Malaria journal*, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.
76. HOUZÉ, S., et al. Combined deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes result in *Plasmodium falciparum* malaria false-negative rapid diagnostic test. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 7, p. 2694-2696, 2011.
77. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [http://www.ibge.gov.br]. *Brasil. Amazonas. Barcelos* [acesso em 27 out 2020]. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/barcelos/panorama>.
78. JOHANSEN, I. C.; RODRIGUES, P. T.; FERREIRA, M. U. Human mobility and urban malaria risk in the main transmission hotspot of Amazonian Brazil. *PloS one*, v. 15, n. 11, p. e0242357, 2020.
79. JIANG, H., et al. Detection of genome-wide polymorphisms in the AT-rich *Plasmodium falciparum* genome using a high-density microarray. *Bmc Genomics*, v. 9, n. 1, p. 398, 2008.

80. JONES, S., et al. One-step PCR: A novel protocol for determination of *pfhrp2* deletion status in *Plasmodium falciparum*. *Plos one*, v. 15, n. 7, p. e0236369, 2020.
81. KASSIM, O. O., et al. Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. *Journal of Tropical Pediatrics*, v. 46, n. 2, p. 92-96, 2000.
82. KOITA, O. A. et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 86, n. 2, p. 194-198, 2012.
83. KOJOM, L. P., Vineeta, S. Prevalence of *Plasmodium falciparum* field isolates with deletions in histidine-rich protein 2 and 3 genes in context with sub-Saharan Africa and India: a systematic review and meta-analysis. *Malaria journal*, v. 19, n. 1, p. 46, 2020.
84. KOZYCKI, C.T. et al. False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of *Plasmodium falciparum* isolates lacking *hrp2* and declining malaria transmission. *Malaria journal*, v. 16, n. 1, p. 123, 2017.
85. KREIDENWEISS, A. et al. Monitoring the threatened utility of malaria rapid diagnostic tests by novel high-throughput detection of *Plasmodium falciparum* *hrp2* and *hrp3* deletions: A cross-sectional, diagnostic accuracy study. *EBio-Medicine*, v. 50, p. 14-22, 2019.
86. KUMAR, N., et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. *Acta tropica*, v. 125, n. 1, p. 119-121, 2013.
87. KYABAYINZE, D. J., et al. HRP2 and pLDH-based rapid diagnostic tests, expert microscopy, and PCR for detection of malaria infection during pregnancy and at delivery in areas of varied transmission: a prospective cohort study in Burkina Faso and Uganda. *PLoS One*, v. 11, n. 7, p. e0156954, 2016.
88. LAFERI, H., KANDEL, K., PICHLER, H. False positive dipstick test for malaria. *New England Journal of Medicine*, v. 337, n. 22, p. 1635-1636, 1997.

89. LÊ, H. G. et al. Genetic variations in histidine-rich protein 2 and histidine-rich protein 3 of Myanmar *Plasmodium falciparum* isolates. *Malaria journal*, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2020.
90. LEE, N. et al. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests for malaria. *Journal of clinical microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2773-2778, 2006.
91. LEECH, J. H., et al. *Plasmodium falciparum* malaria: association of knobs on the surface of infected erythrocytes with a histidine-rich protein and the erythrocyte skeleton. *Journal of Cell Biology*, v. 98, n. 4, p. 1256-1264, 1984.
92. LI, P. et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the China–Myanmar border area. *Acta tropica*, v. 152, p. 26-31, 2015.
93. LI, B., et al. Performance of pfHRP2 versus pLDH antigen rapid diagnostic tests for the detection of *Plasmodium falciparum*: a systematic review and meta-analysis. *Archives of medical science: AMS*, v. 13, n. 3, p. 541, 2017.
94. LIANG, D. et al. Evaluating the implementation of rapid diagnostic tests in a malaria elimination setting. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2020.
95. MACHADO, P. et al. A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 4, p. 85-96, dez. 2010 .
96. MAJORI, G. Combined antimalarial therapy using artemisinin. *Parassitologia*, v. 46, n. 1-2, p. 85, 2004.
97. MAKLER, M.T., PIPER, R. C. Rapid malaria tests: where do we go after 20 years?. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 81, n. 6, p. 921-926, 2009.
98. MALTHA et al., et al. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PLoS ONE*, v. 7: e43094. 2012.

- 99.MÉNARD, D., et al. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *New England Journal of Medicine*, [s. l.], 2016.
- 100.MEYER, C. G. et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum*: asexual stages. *Tropical Medicine & International Health*, v. 7, n. 5, p. 395-408, 2002.
- 101.MINKAH, N. K.; SCHAFER, C.; KAPPE, S. HI. Humanized mouse models for the study of human malaria parasite biology, pathogenesis and immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 807, 2018.
- 102.MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical microbiology reviews*, v. 15, n. 1, p. 66-78, 2002.
- 103.MOUATCHO, J.C.; GOLDRING, J.P.D. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *Journal of medical microbiology*, v. 62, n. 10, p. 1491-1505, 2013.
- 104.MUELLER, I., ZIMMERMAN, P.A., REEDER, J.C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends in parasitology*, v. 23, n. 6, p. 278-283, 2007.
- 105.MURILLO S., et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*pfhrp2*) and histidine-rich protein 3 (*pfhrp3*) genes in Colombian parasites. *PloS one*, v. 10, n. 7, p. e0131576, 2015.
- 106.MURRAY, L., et al. Multiplication rate variation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.
- 107.NAHRENDORF, W., IVENS, A., SPENCE, P. J. Inducible mechanisms of disease tolerance provide an alternative strategy of acquired immunity to malaria. *bioRxiv*, 2020.
- 108.NIMA, M. K., et al. Case report: a case of *Plasmodium falciparum* *hrp2* and *hrp3* gene mutation in Bangladesh. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 97, n. 4, p. 1155-1158, 2017.
- 109.NDOUR, P. A., et al. Measuring the *Plasmodium falciparum* HRP2 protein in blood from artesunate-treated malaria patients predicts post-artesunate delayed hemolysis. *Science translational medicine*, v. 9, n. 397, 2017.

110. OCHOLA, L. B., et al. The reliability of diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *The Lancet infectious diseases*, v. 6, n. 9, p. 582-588, 2006.
111. OKOTH, S. A., et al. Variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*Pfhrp2*) and *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 3 (*Pfhrp3*) gene deletions in Guyana and Suriname. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0126805, 2015.
112. OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial de Saúde [www.paho.org]. *Casos de malária aumentam na região das Américas*. Publicado em 2 de fevereiro de 2018 [acesso em 27 setembro 2020]. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5591:casos-de-malaria-aumentam-na-regiao-das-americas&Itemid=812.
113. OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde / Organização Mundial de Saúde [www.paho.org]. *OPAS destaca importância de se manter queda de casos de malária no Brasil*. Publicado em 25 de abril de 2020 [acesso em 27 setembro 2020]. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6156:opas-destaca-necessidade-de-manter-queda-de-casos-de-malaria-no-brasil&Itemid=812.
114. PASSOS A. D. C., FIALHO R. R. Malária: aspectos epidemiológicos e de controle. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 3, n. 1, p. 93-105, 1998.
115. PARR, J. B. et al. *Pfhrp2*-deleted *Plasmodium falciparum* parasites in the Democratic Republic of the Congo: a national cross-sectional survey. *The Journal of infectious diseases*, v. 216, n. 1, p. 36-44, 2017.
116. PARR, J. B. et al. Streamlined, PCR-based testing for *pfhrp2*- and *pfhrp3*-negative *Plasmodium falciparum*. *Malaria journal*, v. 17, n. 1, p. 137, 2018.
117. PATI, P., et al. High proportions of *pfhrp2* gene deletion and performance of HRP2-based rapid diagnostic test in *Plasmodium falciparum* field isolates of Odisha. *Malaria journal*, v. 17, n. 1, p. 394, 2018.

- 118.PLUCINSKI, M., et al. Malaria surveys using rapid diagnostic tests and validation of results using post hoc quantification of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2. *Malaria journal*, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2017.
- 119.POTI, K. E., et al. HRP2: transforming malaria diagnosis, but with caveats. *Trends in parasitology*, v. 36, n. 2, p. 112-126, 2020.
- 120.RACHID VIANA, G.M., et al. Histidine-rich protein 2 (*pfhrp2*) and *pfhrp3* gene deletions in *Plasmodium falciparum* isolates from select sites in Brazil and Bolivia. *PLoS One*, v. 12, n. 3, p. e0171150, 2017.
- 121.RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. et al. Molecular analysis of recrudescence parasites in a *Plasmodium falciparum* drug efficacy trial in Gabon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, n. 6, p. 719-724, 1997.
- 122.REY, L., *Parasitologia*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- 123.RILEY, E. M., et al. Lack of association between maternal antibody and protection of African infants from malaria infection. *Infection and immunity*, v. 68, n. 10, p. 5856-5863, 2000.
- 124.ROCK, E. P., et al. Comparative analysis of the *Plasmodium falciparum* histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology*, v. 95, n. 2, p. 209-227, 1987.
- 125.SABBATANI, S., FIORINO, S., MANFREDI, R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*): a public health concern?. *Braz J Infect Dis*, v. 14, n. 3, p. 299-309, 2010.
- 126.SÁENZ, F. E., et al. Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malaria journal*, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015.
- 127.SATYA, P., et al. The Isolation and Description of *Plasmodium cynomolgi* (Mayer, 1907) and *Plasmodium inui* (Halberstadter and Prowazek, 1907) from Naturally Occurring Mixed Infections in Macaca radiata a radiata Monkeys of the Nilgiris, Madras State, India. *Indian Journal of Malariology*, v. 16, n. 3, p. 303-11, 1962.

- 128.SAYANG, C., et al. Use of a histidine-rich protein 2-based rapid diagnostic test for malaria by health personnel during routine consultation of febrile out-patients in a peripheral health facility in Yaounde, Cameroon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 81, n. 2, p. 343-347, 2009.
- 129.SEPÚLVEDA, N., et al. Global analysis of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 (*pfhrp2*) and *pfhrp3* gene deletions using whole-genome sequencing data and meta-analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 62, p. 211-219, 2018.
- 130.SHIFF, C. J., PREMJI, Z., MINJAS, J. N. The rapid manual Para Sight®-F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 87, n. 6, p. 646-648, 1993.
- 131.SILVA, M. D. C. B. *Avaliação farmacológica de complexos metálicos com amodiaquina para o tratamento da malária experimental*. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz. 2019.
- 132.SINGH, B., et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, v. 363, n. 9414, p. 1017-1024, 2004.
- 133.SIVEP-Malária. Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica Malária. Base nacional atualizada em 12/12/2019. *Lista de municípios pertencentes às áreas de risco ou endêmicas para malária Ano de referência: 2018*. [acesso em 27 outubro 2020]. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/25/Lista-de-municipios-pertencentes-as-areas-de-risco-ou-endemicas-para-malaria.pdf>.
- 134.SIVEP-Malária. Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica Malária. Dados atualizados em: 24/11/2020. [acesso em 27 de novembro 2020]. Disponível em: https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidado_201925_03_2020/Autctone_UF.
- 135.SNOUNOU, G., et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 61, p. 315-320, 1993.

- 136.SNOUNOU, G., et al. Biased distribution of *msp1* and *msp2* allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 4, p. 369-374, 1999.
- 137.SOUSA JO. *Diversidade genética de Plasmodium vivax em uma área de alta endemicidade para malária no médio Rio Negro, Amazonas, Brasil*. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Instituto Oswaldo Cruz. Fiocruz. Rio de Janeiro. 112p. 2020.
- 138.STAHL, H. D., et al. Sequence of a cDNA encoding a small polymorphic histidine-and alanine-rich protein from *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Research*, v. 13, n. 21, p. 7837-7846, 1985.
- 139.SUAREZ-MUTIS M. C., MARTINEZ-ESPINOSA, F. E., ALBUQUERQUE B. C. Malária. In: COURA J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2v. p. 833-858, 2005.
- 140.SUAREZ-MUTIS, M. C., COURA, J. R. Mudanças no padrão epidemiológico da malária em área rural do médio Rio Negro, Amazônia brasileira: análise retrospectiva. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 795-804, 2007.
- 141.SULLIVAN, J.R., DAVID J., AYALA, Y. M., GOLDBERG, D. E. An unexpected 5' untranslated intron in the *P. falciparum* genes for histidine-rich proteins II and III. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 83, n. 2, p. 247-251, 1996.
- 142.SULLIVAN, D. J., GLUZMAN, I. Y.; GOLDBERG, D. E. *Plasmodium* hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*, v. 271, n. 5246, p. 219-222, 1996.
- 143.TADEI, W.P., et al. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria in the Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 59, n. 2, p. 325-335, 1998.
- 144.TAYLOR, J. E., et al. The evolutionary history of *Plasmodium vivax* as inferred from mitochondrial genomes: parasite genetic diversity in the Americas. *Molecular biology and evolution*, v. 30, n. 9, p. 2050-2064, 2013.

145. THOMSON, R., et al. *Pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions that affect malaria rapid diagnostic tests for *Plasmodium falciparum*: analysis of archived blood samples from 3 African countries. *The Journal of infectious diseases*, v. 220, n. 9, p. 1444-1452, 2019.
146. THOMSON, R., et al. Prevalence of *Plasmodium falciparum* lacking histidine-rich proteins 2 and 3: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 98, n. 8, p. 558, 2020.
147. TIRASOPHON, W., et al. A novel detection of a single *Plasmodium falciparum* in infected blood. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 175, n. 1, p. 179-184, 1991.
148. TROUVAY, M., et al. High performance of histidine-rich protein 2 based rapid diagnostic tests in French Guiana are explained by the absence of *pfhrp2* gene deletion in *P. falciparum*. *PloS one*, v. 8, n. 9, p. e74269, 2013.
149. VAN DER PLUIJM, R. W., et al. Triple artemisinin-based combination therapies versus artemisinin-based combination therapies for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a multicentre, open-label, randomised clinical trial. *The Lancet*, 2020.
150. WATSON, O. J., et al. Modelling the drivers of the spread of *Plasmodium falciparum* *hrp2* gene deletions in sub-Saharan Africa. *Elife*, v. 6, p. e25008, 2017.
151. WELLEMS, T. E., et al. Chromosome size variation occurs in cloned *Plasmodium falciparum* on in vitro cultivation. *Rev. Bras. Genet*, p. 813-25, 1988.
152. WHITE, N. J. Primaquine to prevent transmission of *falciparum* malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 175-181, 2013.
153. WHO. *Guidelines for the treatment of malaria*. 2nd Ed. Geneva, World Health Organization. 2010.
154. WHO. *Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 3 (2010-2011)*. Geneva: World Health Organization, 2011.

- 155.WHO. *Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 6 (2015)*. Geneva: World Health Organization, 2015.
- 156.WHO. *Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030 (2015)*. Geneva: World Health Organization, 2015.
- 157.WHO. *P. falciparum hrp2/3 gene deletions*. Geneva: World Health Organization, 2016. [acesso em 27 novembro 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/malaria/mpac/mpac-sept2016-hrp2-consultation-short-report-session7.pdf>.
- 158.WHO. *WHO malaria policy advisory committee meeting: meeting report, March 2017*. Geneva: World Health Organization, 2017.
- 159.WHO. *World malaria report 2018*. Geneva: World Health Organization; 2018.
- 160.WHO. *World Malaria Report 2019*. Geneva: World Health Organization, 2019.
- 161.WHO. *Malaria rapid diagnostic test performance: results of WHO product testing of malaria RDTs: round 8 (2016-2018)*. Geneva, World Health Organization, 2018. [acesso em 27 novembro 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241514965/en/>.
- 162.WHO. *False-negative RDT results and implications of new reports of P. falciparum histidine-rich protein 2/3 gene deletions*. Geneva, World Health Organization, 2019.
- 163.WHO. *Master protocol for surveillance of pfhrp2/3 deletions and biobanking to support future research. In : Master protocol for surveillance of pfhrp2/3 deletions and biobanking to support future research*. Geneva: World Health Organization, 2020.
- 164.WILLIE, N., et al. Insights into the performance of SD Bioline malaria Ag Pf/ Pan rapid diagnostic test and *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 gene variation in Madagascar. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 98, n. 6, p. 1683-1691, 2018.

- 165.WOLFARTH-COUTO, B, SILVA, R. A. D., FILIZOLA, N. Variabilidade dos casos de malária e sua relação com a precipitação e nível d'água dos rios no Estado do Amazonas, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 35, p. e00020218, 2019.
- 166.WONGSRICHANALAI, C. et al. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 77, n. 6, Suppl, p. 119-127, 2007.
- 167.WOODROW, C. J., FANELLO, C. *Pfhrp2* deletions in the Democratic Republic of Congo: evidence of absence, or absence of evidence?. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. 4, p. 504-506, 2017.
- 168.WURTZ, N., et al. Retard de diagnostic d'un accès palustre à *Plasmodium falciparum* chez un militaire en Ouganda: négativité des tests de diagnostic rapide associée à un polymorphisme de l'antigène HRP2. *Med Sante Trop*, v. 23, p. 181e4, 2013.
- 169.WURTZ, N., et al. *Pfhrp2* and *pfhrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malaria journal*, v. 12, n. 1, p. 34, 2013.

APÊNDICE I

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Vigilância genômica da malária na Amazônia Brasileira.

Pesquisador: simone da silva santos

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Estudos com populações indígenas;

Versão: 5

CAAE: 75000917.7.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.733.678

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos “Apresentação do Projeto”, “Objetivo da Pesquisa” e “Avaliação dos Riscos e Benefícios” foram copiadas do parecer pendente nº 2.638.600 emitido pela Conep em 08/05/2018.

INTRODUÇÃO

A malária humana é uma doença infecciosa, não contagiosa, com manifestações clínicas episódicas de caráter agudo. É causada por protozoários do gênero Plasmodium e transmitida ao homem na natureza através da picada de fêmeas de mosquitos do gênero Anopheles. A malária está entre as doenças negligenciadas catalogadas pelo Plano Global o combate às Doenças Tropicais Negligenciadas e é considerada Pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a doença parasitária mais devastadora sócio economicamente. Aproximadamente 3,3 bilhões de pessoas (metade da população mundial) vivem em áreas onde há risco de transmissão da doença, sendo que a África é a região de maior risco. A pesar dos avanços na diminuição da morbidade e mortalidade por

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

malária nos últimos 15 anos, essa doença continua sendo um importante problema de saúde pública em 91 países do mundo. No ano de 2015 em todo o mundo, estima-se que ocorreram cerca de 212 milhões de casos da doença (uma diminuição na incidência de 41% em relação ao ano 2000) e que ocorreram 429.000 mortes (diminuindo em 62% em relação ao ano 2000). No Brasil, o número de casos confirmados de malária no ano de 2015 foi de 142.659 com 26 mortes. Quatro espécies de Plasmodium infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Recentes estudos no Sudeste Asiático relataram casos de infecções pelo Plasmodium knowlesi, um Plasmodium que tem no macaco seu hospedeiro natural, mas que também pode infectar humanos. Cerca de 4% dos casos estimados globalmente são devidos a Plasmodium vivax, mas fora do continente africano a proporção de infecções por esta espécie é de 41%. A grande maioria das mortes (99%) é devida à malária por Plasmodium falciparum, estima-se que Plasmodium vivax tenha sido responsável por 3.100 mortes em 2015, com 86% ocorrendo fora de África. No Brasil, a maioria dos casos, mais de 85% são pelo *P. vivax*. A prevalência de infecções por *P. malariae* é baixa, mas alguns estudos sugerem que pode alcançar 10% em algumas regiões. No Brasil não há malária causada pelo *P. ovale*. A malária possui grande importância epidemiológica, devido sua gravidade clínica e elevado potencial de disseminação, em áreas com densidade vetorial que favoreça a transmissão. Na região da Amazônia brasileira causa consideráveis perdas sociais e econômicas na população sob risco. O *P. vivax*, embora menos patogênico do que *P. falciparum*, tem um grande impacto sócio-econômico entre as pessoas que vivem em áreas de risco para a infecção. Existem várias estratégias de controle da malária, entretanto os esforços de prevenção e controle da doença precisam ser projetados para o ambiente específico em que eles serão utilizados e precisam levar em conta a epidemiologia da malária no local, nível de recursos disponíveis e vontade política. O controle da malária no Brasil representa um desafio real para as autoridades de saúde devido a vários fatores, incluindo a dificuldade de manter medidas preventivas nas comunidades do Amazonas, e transformações no ecossistema que promovem a transmissão da malária em várias localidades, tais como a construção de rodovias e represas além de programas de colonização e migração para a Amazônia. Além disso, indivíduos assintomáticos, com baixas parasitemias e que vivem nas áreas endêmicas, contribuem para a transmissão da malária já que não apresentam manifestações clínicas e não sabem que estão infectados. A Resistência às drogas antimaláricas emergiu como um dos maiores desafios para o controle da malária hoje em dia. A resistência aos medicamentos tem sido implicado na propagação da malária para novas áreas e re-emergência da doença em áreas onde a doença havia sido erradicada. Resistência à medicamentos também tem desempenhado um papel significativo na ocorrência e

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

gravidade da epidemia de malária em algumas partes do mundo. A resistência aos antimaláricos foi descrita para duas das quatro espécies de parasita da malária que naturalmente infectam os seres humanos, *P. falciparum* e *P. vivax*. O *P. vivax* apresenta resistência à cloroquina e/ou primaquina em algumas áreas. O *P. falciparum* desenvolveu resistência à quase todos antimaláricos de uso corrente, embora a distribuição geográfica de resistência à um único antimalárico varia muito. As terapias combinadas com os derivados da artemisinina (TCAs) são atualmente os antimaláricos mais efetivos e potentes para a eliminação de forma rápida e segura da parasitemia do *P. falciparum*, que em conjunto com estratégias de controle vetorial, vêm gerando uma grande diminuição da morbidade e mortalidade da malária no mundo. Apesar do enorme sucesso dos TCAs na luta contra a malária por *P. falciparum*, nos últimos anos têm se detectado a emergência da resistência à artemisinina. Esta resistência se encontra ainda localizada na Ásia e em algumas regiões da África. Nas Américas, casos de diminuição da sensibilidade já foram reportados na Guiana Francesa e Suriname, próximos à fronteira com o Brasil. Em infecções causadas por *P. vivax*, a resistência à cloroquina (CQ) é limitada apesar do seu amplo uso. Os primeiros relatos de resistência nesta espécie foram descritos entre australianos repatriados de Papua-Nova Guiné em 1989. Na América do Sul, 11 casos de baixa resposta terapêutica à CQ foram observados na Colômbia em 1989 e na Guiana em 1996. No Brasil, a resistência à CQ por *P. vivax* foi primeira mente descrita no Estado do Amazonas em 1999 e mais recentemente, estudos de eficácia clínica mostraram fracasso na terapêutica da malária por *P. vivax* em 13% dos pacientes com níveis sanguíneos adequados de cloroquina. Em *P. vivax*, os estudos de resistência à CQ têm sido focados nas modificações moleculares nos genes ortólogos à *pfcr1* e *pfmdr1* (*pvcr1* e *pvm1*), já descritos como determinantes na resistência à CQ por *P. falciparum*. No Brasil, um estudo mostrou que isolados de *P. vivax* resistentes à CQ estão circulando no país, porém esses isolados não mostraram associação com as mutações nos genes *pvcr1* e *pvm1*. Entretanto, um pequeno número de amostras foi utilizado nesses estudos, o que pode não estar revelando o real papel destes genes na resistência à CQ como ocorre em *P. falciparum*. Outros estudos têm especulado ainda que a resistência à CQ por *P. vivax* estaria associada com os casos de malária grave causadas por esta espécie, pois após o aparecimento da resistência à CQ pelo *P. vivax*, inúmeros relatos de malária com gravidade clínica, exclusivamente associados com este parasito, começaram a ser evidenciados, inclusive na cidade de Manaus, na região Amazônica brasileira. Recentemente, estudos também mostraram um aumento dos níveis de expressão dos genes *pvcr1* e *pvm1*, aparentemente envolvidos na resistência à CQ, em pacientes com malária grave por *P. vivax* comparado com pacientes com malária não complicada. Fatores de risco para o

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

aparecimento da resistência aos medicamentos antimaláricos incluem grande migração de/para áreas isoladas de mineração de ouro, a automedicação frequente sem seguir um curso completo de tratamento, o acesso limitado das populações rurais aos serviços de saúde, e a migração de latino-americanos, asiáticos e africanos em trânsito para os Estados Unidos. Esses fatores também podem contribuir para aumentar a transmissão, levar a um aumento de casos graves, causar surtos de malária, e reintroduzir a doença em áreas livres de malária. Portanto, há uma necessidade urgente para vigiar a circulação de parasitas nas fronteiras da América do Sul. A Organização Mundial da Saúde e outras agências internacionais em conjunto promovem um esforço global para eliminação da malária. A vigilância efetiva da população do parasita no surgimento e disseminação de novas variantes genéticas e monitoramento mundial de migração do parasita são pré-requisitos para a eliminação da doença. Isso exige caracterização da variação do genoma do parasita em diferentes regiões endêmicas e seleção evolutiva recente. Além disso, um entendimento dos fatores que determinam o fluxo gênico entre as localidades, tais como taxas de endogamia e estrutura da população são necessários para esta caracterização. O conhecimento da diversidade genética e genômica populacionais naturais do Plasmodium é crucial para a compreensão da extraordinária capacidade do parasita para escapar do sistema imunológico e de desenvolver resistência às drogas antimaláricas. A diversidade genética do Plasmodium é a presença, numa região, de sub-populações de parasitas geneticamente distintos, designados genótipos. Em áreas hiper endêmicas da malária tem se observado elevada diversidade genética por causa dos frequentes eventos de recombinação genética que podem ocorrer, entre os diversos genótipos, durante a fase sexuada no mosquito. Por causa da diversidade genética, as infecções naturais pelo *P. falciparum* e *P. vivax* num indivíduo podem ser constituídas por mais de um genótipo, sendo denominada de infecção múltipla. A multiplicidade das infecções depende, principalmente, da intensidade de transmissão e da idade, entre tanto outros fatores, tais como, a exposição ao vector, imunidade natural e adquirida, a quimio profilaxia e o tratamento com medicamentos antimaláricos são importantes. Até recentemente, *P. maláriae* tem sido relativamente pouco estudado na pesquisa sobre malária. Esta espécie resulta em uma forma menos grave de malária e o fardo socioeconômico desta espécie não é, portanto, tão grande como para *P. falciparum* ou *P. vivax*. No entanto, devido à biologia interessante desta espécie, incluindo um ciclo de vida mais longo, a capacidade de persistir no hospedeiro por décadas, sua freqüente ocorrência em co-infecções com *P. falciparum* e a possibilidade de que o *P. brasilianum* infeccioso para primatas do Novo Mundo possa ser a mesma espécie que *P. malariae*, houve um aumento de interesse em estudar essa espécie, pois pouco se sabe sobre sua estrutura genômica e diversidade

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

genética. Nossa abordagem neste projeto envolve a integração de dados genômicos de genética populacional com dados clínicos e epidemiológicos, a fim de desenvolver métodos inovadores para monitorar mudanças evolucionárias em populações de patógenos quase em tempo real. Este tipo de vigilância genômica pode fornecer informações cruciais para os esforços de controle da doença, além de gerar dados de interesse científico fundamental, como potenciais alvos de medicamentos e vacinas. Com os avanços tecnológicos atuais, os métodos usados para realizar o sequenciamento do genoma se tornaram mais acessíveis e muito mais baratos, facilitando os estudos epidemiológicos e filogenéticos. Além disso, novas técnicas permitem sequenciar o parasito da malária, a partir de pequenos volumes de sangue (punção digital). A informação da diversidade genômica e genética dos parasitos, em conjunto com os dados de epidemiologia, pode ser utilizada para monitorar a transmissão, o aparecimento / disseminação de resistência aos medicamentos e a eficácia das intervenções de controle da malária. Para maximizar a eficácia desta abordagem, será essencial estabelecer parcerias de investigação interdisciplinar e colaborações em várias regiões da Amazônia brasileira para informar os serviços de saúde e apoiar as estratégias de controle e vigilância da malária.

HIPÓTESE

Ocorre o aparecimento de novas variáveis genéticas de *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* e *P. malária* e na população de estudo que podem ser correlacionadas com o aparecimento e disseminação da resistência à drogas, aumento da transmissão e aumento dos casos graves de malária.

METODOLOGIA

Área e população de Estudo:- Município de Barcelos: Está situado ao norte do estado do Amazonas, no médio Rio Negro, sendo uma área altamente endêmica para malária com 3.865 casos em 2016 e uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 140,8 casos por mil habitantes, caracterizando a área como de alto risco epidemiológico.- Município de Atalaia do Norte: Serão selecionadas comunidades do município de Atalaia do Norte. Este município é um município no interior do estado do Amazonas. Mesorregião pertencente à região amazônica do Alto Solimões, localizado a sudoeste de Manaus, capital do estado, este município é altamente endêmico para malária com o registro de 2.551 casos positivos no ano 2016, sendo 2009 causados pelo *P. vivax*(78,7%) e 509 pelo *P. falciparum* (19,9%) com uma Incidência Parasitária Anual (IPA) de 140.6 casos por 1000 habitantes. Extração de DNA genômico: O DNA total das amostras clínicas será extraído a

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

partir de 300l (de sangue total de indivíduos com malária utilizando-se kit comercial QIAamp® (QIAGEN). O DNA extraído será inicialmente submetido à PCR para a confirmação do diagnóstico de infecção pelo Plasmodium spp. usando o protocolo de Snounou e colaboradores com algumas modificações. Genotipagem e análise dos microssatélites de P. vivax: Quatorze microssatélites (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9, MS10, MS11, MS12, MS15 EMS20) serão amplificados utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com uma metodologia previamente descrita. Os alelos serão visualizados e marcados utilizando eletroforese capilarem sequenciador automático de DNA (sequenciador 48 capilar ABI-3730, AppliedBiosystems) conforme especificado pelo protocolo do fabricante. Os resultados da eletroforese capilar serão analisados utilizando o software Gene Mapper versão 4.1 (AppliedBiosystems) para determinar os tamanhos dos fragmentos amplificados em termos de número de pares de bases e a altura dos picos (que corresponde aproximadamente à abundância relativa de parasitos na amostra). Reação de GWAS para ampliação do genoma de P. falciparum e P. vivax de amostras clínicas para sequenciamento de DNA: As reações de amplificação dos genomas de P. falciparum, P. vivax e P. malariae serão padronizadas de acordo com os protocolos publicados na literatura. Sequenciamento de DNA de alta geração: Para avaliar a possibilidade de outros genes estarem envolvidos na resistência aos antimaláricos vamos sequenciar o genoma de 50 amostras de P falciparum isolados de pacientes com diferentes respostas aos medicamentos. O Sequenciamento do genoma vai ser feito utilizando o sequenciador Illumina MiSeq, e será realizado em colaboração com o Professor Taane Clark e Susana Campino, ambos da London School of Tropical Higiene and Tropical Medicine em Londres, e Dr. Thomas Otto e Dr. Matt Berriman do Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, ambos situados no Reino Unido. Para identificar polimorfismos genéticos nos dados de sequenciamento obtidos pela tecnologia Miseq, vamos usar algoritmos desenvolvidos pela equipe do Prof. Taane Clark (dados não publicados) para identificar diferenças entre diferentes grupos de parasitas, vamos usar modelos de regressão para fazer testes de associação entre os fenótipos (por exemplo, resistência à tratamento com alguns antimaláricos) e os marcadores genéticos. Os resultados serão comparados com sequências públicas predominantemente de parasitas asiáticos africanos e da Oceania.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

– Como critérios de inclusão serão considerados todos os indivíduos com diagnóstico parasitológico de infecção pelo P. falciparum, P. vivax e P. malária e, seja pela gota espessa ou pela reação em cadeia da Polimerase (PCR) coletadas durante o período de estudo nos municípios

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

e que tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e que tenham acima de dois anos de idade.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

– Serão excluídas aquelas pessoas que não aceitarem participar do estudo e pacientes com doenças graves.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Determinar a diversidade genética de amostras clínicas de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *P. malariae* de pacientes com malária na região do Médio Rio Negro, estado do Amazonas, e utilizar esses dados no monitoramento e combate à malária junto ao programa de controle da malária na região Amazônica. A proposta irá integrar dados genômicos para modelar a dinâmica de transmissão em diferentes contextos epidemiológicos em tempo quase real, bem como detectar fontes de infecção e parasitas resistentes ao tratamento antimalárico. Deste modo podemos apoiar os sistemas de saúde pública para manter o controle de casos de malária e chegar mais rapidamente a uma fase de eliminação.

OBJETIVO SECUNDÁRIO

1. Estabelecer uma rede de vigilância genômica e epidemiológica da malária na região do Médio rio Negro, Amazônia brasileira;
2. Descrever a estrutura populacional das amostras clínicas de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* na região;
3. Monitorar o surgimento e a disseminação de novas variáveis genéticas de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* na região do médio rio Negro, através de sequenciamento de DNA de alta geração e genotipagem por microssatélites;
4. Identificar e estimar as frequências de novos marcadores de resistência às drogas antimaláricas;
5. Criação de um catálogo de variações genéticas (SNPs) e suas frequências alélicas em através do sequenciamento em larga escala em populações naturais de *P. falciparum* e *P. vivax* na Amazonia Brasileira;
6. Estimar a distância genética entre as amostras brasileiras e africanas de *P. malariae*;
7. Integrar dados genômicos e epidemiológicos para produzir modelos matemáticos a fim de monitorar a transmissão, a propagação da resistência aos antimaláricos e a eficácia das intervenções de controle da malária;

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

8. Converter os dados em ferramentas de pesquisa para informar os investigadores e programas de controle da malária.
9. Análise de dados genômicos e propagação da informação para a comunidade científica internacional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Os riscos para os participantes da pesquisa são mínimos e serão basicamente decorrentes da tomada da amostra de sangue que será feita em veia periférica no antebraço, por pessoas da equipe de pesquisa que são experientes nestes procedimentos. Como a equipe de pesquisa permanecerá em campo durante o tempo suficiente para a coleta das amostras, e se surgir alguma complicação por este procedimento, este poderá ser tratado pelos membros da equipe.

BENEFÍCIOS

Os benefícios da pesquisa para a população em forma direta, será o tratamento imediato das pessoas positivas na gota espessa na busca ativa no campo usando os esquemas terapêuticos preconizados pelo Ministério da Saúde. Há uma série de benefícios futuros em caso de encontrar algum vínculo com diversidade genética do Plasmodium sp. e resistência à drogas que podem servir como marcadores para estas populações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de análise de resposta ao parecer pendente nº 2.638.600 emitido pela Conep em 08/05/2018":
Vide itens "1"; "4.3" e "6".

1. No documento Informações Básicas do projeto, documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_963675", item "Desenho", lê-se: "Além destas amostras já coletadas (300), o projeto visa coletar novas amostras no período de 2018-2020

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

(aproximadamente 200) de indivíduos infectados pelo Plasmodium sp.". Solicita-se esclarecer se as amostras (ou dados) coletadas nos estudos anteriores serão utilizadas, novamente, para esse estudo. Caso seja novamente utilizada, solicita-se a garantia de que as amostras (dados), só serão utilizadas após consentimento dos participantes dos estudos anteriores.

RESPOSTA: As amostras de estudos anteriores serão utilizadas novamente para este estudo. Iremos pedir um re consentimento aos participantes dos estudos anteriores através de TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa. O laboratório de Doenças Parasitárias trabalha na região do Médio Rio Negro há mais de 20 anos com projetos na área de malária e possui um laboratório de expansão na cidade de Barcelos o que nos possibilita de trabalhar mais tempo no campo. Os pesquisadores do Laboratório contam com a ajuda de vários agentes de saúde do município na busca ativa e passiva de pacientes. No caso das amostras clínicas coletadas em estudos anteriores, teremos a ajuda destes agentes de saúde pois algumas áreas são de difícil acesso e nesta região ocorre grande mobilidade de pessoas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Não foi identificado nos documentos postados na Plataforma Brasil o TCLE específico para re consentimento dos participantes do estudo em tela para utilização de material biológico coletado em estudos anteriores e também não foi verificado nos Termos de consentimento livre e esclarecido e Termos de assentimento livre e esclarecido, apresentados em 15 de março de 2018, nenhuma informação ao participante da pesquisa referente à utilização de material biológico coletado em estudos anteriores. Solicita-se a apresentação do referido TCLE específico ou revisão dos documentos apresentados para inclusão desta informação aos participantes da pesquisa.

RESPOSTA: Já foi feita a adequação no TCLE para maiores de 18 anos, no TCLE dos responsáveis pelos menores e nos Termos de assentimento. Vide os documentos:

TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_maiores_de_18_anos

TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_responsaveis_pelos_menores

T e r m o _ d e _ a s s e n t i m e n t o _ V i g i l â n c i a
g e n ô m i c a _ d o _ P l a s m o d i u m _ 1 3 _ 1 7 _ a n o s _ r e v i s a d o _ p o s _ p a r e c e r _ d a _ c o n e p

T e r m o _ d e _ a s s e n t i m e n t o _ V i g i l a n c i a _ g e n o m i c a _ d o _ P l a s m o d i u m _ 8 _ 1 2 _ a n o s _ r e v i s a d o _ p o s _ p a r e c e r _ d a _ c o n e p

Sendo assim, os TCLEs e os Termos de assentimento da versão anterior, foram excluídos da plataforma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Solicita-se adequação deste protocolo na Plataforma Brasil, incluindo também a área temática

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

"Populações Indígenas", conforme item IX.4.1 da Resolução CNS nº 466 de 2012. (Observação: para que estes dados sejam aparentes na folha de rosto, faz-se necessário modificar o passo 2, "área de estudo", na Plataforma Brasil e marcar as áreas citadas).

RESPOSTA: Já foi feita a inclusão de "populações indígenas" na plataforma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto às autorizações, declarações e termos necessários. Quando a legislação brasileira dispuser sobre competência de órgãos governamentais, a exemplo da Fundação Nacional do Índio – FUNAI que deve autorizar a entrada em terra indígena, esta autorização deve ser obtida antes do início da pesquisa. Não foi apresentada a autorização da Presidência da FUNAI conforme estabelece a Instrução Normativa nº 01 / P R E S / 1 9 9 5 - FUNAI. Considerando-se que no documento intitulado "resposta_as_pendencias_01_novembro_2017_projeto_vigilancia.pdf", há a informação de que serão recrutados participantes de pesquisa indígenas. Solicita-se a apresentação da autorização da Presidência da FUNAI para entrada em terra indígena ou a declaração da pesquisadora de que esta será obtida antes do início da pesquisa, caso necessária. Solicita-se a apresentação da documentação.

RESPOSTA: Foi anexado o documento da presidência da FUNAI autorizando o início da pesquisa, com o nome: "Documento_autorizacao_FUNAI_vigilancia_genomica.pdf". Da mesma forma foi acrescentada a localidade indígena na área de estudo do projeto que foi reanexado com o nome: "Projeto_vigilancia_e_diversidade_plasmodium_completo_revisado". Da mesma forma, foi feita a alteração na plataforma brasil no passo 4 "detalhamento do estudo". Sendo assim, o documento do projeto anterior com o nome: "Projeto_vigilancia_e_diversidade_plasmodium_completo.pdf" foi excluído.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, intitulado "TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium", seguem as seguintes inadequações:

4.1. Solicita-se que o TCLE seja direcionado apenas aos participantes maiores de 18 anos.

RESPOSTA: Foi anexado o TCLE para maiores de 18 anos com o nome "TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_conep_maiores_de_18_anos" e excluído o arquivo de TCLE anterior que possuía o nome: "TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium.pdf".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

4.1.1. Adicionalmente, solicita-se apresentar um TCLE específico para os pais ou responsáveis pelos participantes menores de idade, com as todas as informações presentes no TCLE principal.

RESPOSTA: Foi anexado TCLE específico para os responsáveis pelos menores de idade com o nome: "TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_conep_responsavel_menores" e excluído o arquivo de TCLE anterior que possuía o nome: "TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium.pdf".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.2. Solicita-se que seja informado no TCLE o volume total de sangue a ser retirado do participante de pesquisa. Tendo em vista a existência de métodos analíticos que envolvem uso diminuto de amostras sanguíneas, solicita-se justificar os volumes propostos. Para melhor informar o participante de pesquisa, além de informar a quantidade total de sangue que será coletado, solicita-se que o volume total seja acompanhado de outra unidade de medida que possa facilitar o entendimento, como "colher de chá", por exemplo (Resolução CNS nº 466 de 2012, item II.23).

RESPOSTA: Foi feita a mudança solicitada: será feita a retirada de 5mL de sangue, que é equivalente à 1 colher de chá, que é volume suficiente para a realização dos exames de diagnóstico de Plasmodium e demais experimentos do projeto. Vide os arquivos:

"TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_conep_maiores_de_18_anos"

"TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_conep_responsavel_menores".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.3. Na primeira página, lê-se: "Barcelos é uma cidade muito pequena e não há meios de transporte massivo. Por esse motivo não há necessidade de nenhum tipo de ressarcimento econômico para que os participantes de pesquisa se desloquem até o hospital. De outro lado, A MAIOR PARTE de pesquisa será baseada na busca ativa nos próprios domicílios dos participantes."(Destaque nosso). Solicita-se a reformulação do trecho, pois outros gastos podem estar associados a pesquisa. Conforme a Resolução CNS nº 466 de 2012 item II.21 o ressarcimento é definido como: "compensação material, exclusivamente de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação". Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Os pesquisadores ficarão no hospital e postos de saúde das localidades e os pacientes com sintomas da malária que forem procurar atendimento serão convidados a participarem da

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

pesquisa. Foi acrescentado o seguinte trecho no TCLE: “Os pesquisadores realizarão a coleta do sangue de pessoas com malária que forem no hospital ou postos de saúde para serem atendidos, então o participante não precisará se deslocar até os pesquisadores; Por outro lado, parte da pesquisa será baseada na busca ativa nos próprios domicílios dos participantes, por estes motivos não há necessidade de nenhum tipo de ressarcimento econômico para que os participantes da pesquisa se desloquem até o hospital, pois estes já estarão lá sendo atendidos”.

Vide os arquivos:

“TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_conep_maiores_de_18_anos”

“TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_conep_responsavel_menores”.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Alguns participantes serão convidados a participar do estudo ao procurarem por atendimento em unidades de saúde local. Ao aceitarem participar do estudo, deverão permanecer tempo adicional na unidade de saúde para coleta de sangue e para responder ao questionário específico da pesquisa. Nestes casos, é possível que seja necessário alimentação ou os participantes tenham outros custos por permanecer um maior tempo na unidade de saúde. Desta forma, o TCLE deve assegurar de forma clara e afirmativa o ressarcimento de todos os gastos que o participante e seu(s) acompanhante(s) terão ao participar da pesquisa. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Já foi feita a adequação no TCLE para maiores de 18 anos e no TCLE dos responsáveis pelos menores. Vide os documentos: TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_maiores_de_18_anos TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_responsaveis_pelos_menores Sendo assim, os TCLEs da versão anterior, foram excluídos da plataforma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.4. No TCLE, lê-se: “Todos os seus dados ou os dados do seu filho e também o material coletado serão utilizados para esta pesquisa e uma parte do material será armazenado, para se for necessário, utilizarmos em estudos futuros”. As amostras biológicas armazenadas podem ser utilizadas em pesquisas futuras, desde que previamente aprovadas pelo Sistema CEP/Conep. Sendo assim, solicita-se descrever NESSE ITEM do TCLE que a cada nova pesquisa realizada pelo patrocinador ou por PESQUISADORES INDEPENDENTES está condicionada a: (a) apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/Conep e (b) re consentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

Termo pelo Comitê). Ressalta-se ainda que, se houver intenção de pesquisa futura com o material biológico, essa informação deverá constar claramente do TCLE (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 6; Portaria MS nº

2.201 de 2011, capítulo IV, seção II, artigos 17º, 18º e 22º e capítulo II, artigo 5º).

RESPOSTA: Este trecho sugerido foi adicionado no novo TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.5. No TCLE, lê-se: “Você ou seu filho podem sentir uma pequena dor no momento de coletar o exame de sangue e as vezes pode ficar um pouco roxo no local da coleta. Os pesquisadores cuidarão para que não existam problemas maiores nestes casos”. Solicita-se informar o participante de pesquisa sobre as providências e cautelas que serão empregadas para evitar e/ou reduzir danos ou riscos, garantindo que danos previsíveis sejam evitados (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.b e IV.3.c).

RESPOSTA: Já foi adequado ao novo TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.6. No TCLE, lê-se: “Não está previsto nenhum tipo de indenização por participar da pesquisa”. Solicita-se inserir no TCLE a explicitação acerca do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

RESPOSTA: Já foi adequado ao novo TCLE de acordo Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA..

4.7. Solicitam-se esclarecimentos quanto ao destino das amostras biológicas ao final das análises (exames) realizadas no estudo, isto é, se as amostras serão ou não destruídas. Caso as amostras sejam armazenadas para análises futuras, solicita-se adequar a documentação inserida na Plataforma Brasil à Resolução CNS nº 441 de 2011 e à Portaria MS nº 2.201 de 2011.

RESPOSTA: As amostras serão armazenadas para análises futuras, adequamos a documentação fazendo as alterações necessárias no TCLE; o regulamento do biorrepositório já constava na Plataforma, com o nome: “Regulamento_Biorrepositorio_2017_proj_eto_vigilancia.pdf”. Abaixo segue justificativa:

Justificativa para armazenagem das amostras de DNA: O laboratório de Doenças Parasitárias trabalha na região do Médio Rio Negro com projetos de mestrado e doutorado estudando a malária. Muitos projetos na área de Genética são feitos com a mesma população e uma vez

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

coletado o sangue e feita a extração de DNA genômico, o material genético pode ser usado em vários projetos sem a necessidade de nova coleta de sangue. Isso será realizado mediante o acordo do indivíduo no TCLE. Além disso, alguns experimentos são repetidos várias vezes para confirmação dos resultados com novas técnicas de diagnóstico.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.8. Solicita-se que seja expresso de forma clara e objetiva no TCLE que o pesquisador e o patrocinador NÃO irão onerar os planos de saúde, o SUS, ou o próprio participante da pesquisa, responsabilizando-se por todos os gastos relativos aos cuidados de rotina (exames e procedimentos) necessários após assinatura do consentimento livre esclarecido (Resolução nº 466 de 2012, item III.2.o).

RESPOSTA: Já foi adequado no TCLE de acordo com a resolução 466 de 2012.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.9. O TCLE não apresenta a numeração nas páginas. Com o objetivo de garantir a integridade do documento, solicita-se que sejam inseridos os números de cada página, bem com a quantidade total delas, como por exemplo: "1 de 3" e assim sucessivamente até a página "3 de 3".

RESPOSTA: Já foi inserida a numeração de páginas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.10. Na página 01, do segundo parágrafo do TCLE lê-se: "Vamos lhe fazer algumas perguntas". É necessário que o pesquisador esclareça em linguagem clara e acessíveis quais informações serão coletadas, local e duração, bem como, apresente o documento para coleta destas informações para análise ética.

RESPOSTA: Já foi feita a mudança e inserimos um questionário individual que deverá ser preenchido pelo pesquisador durante a entrevista.

Vide documento: Questionario_vigilancia_genomica".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.11. O TCLE deve trazer em linguagem simples o que representa um CEP. Ressalta-se que quando o estudo envolver análise ética da Conep, essa recomendação deve ser estendida a esta Comissão, bem como é necessário a apresentação dos meios de contato com a mesma. Solicita-se adequação.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

RESPOSTA: Já foi feita a adequação no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.12. Considerando a proteção do participante de pesquisa, a localidade de desenvolvimento do estudo, bem como os contatos fornecidos para os participantes de pesquisa no TCLE, solicita-se que seja disponibilizado também neste documento (TCLE) o contato de um CEP mais próximo dos participantes da pesquisa. Para tanto, o pesquisador deve contatar os CEPs da região na qual será desenvolvido o estudo (Amazonas) e obter um compromisso de colaboração de um CEP, de preferência o mais próximo da localidade de desenvolvimento do estudo, no sentido de que este comitê seja a referência para eventual necessidade de contato do participante de pesquisa.

RESPOSTA: Já entramos em contato com o CEP da Fundação de Medicina Tropical de Manaus CEP/FMTHDV que está de acordo". Vide documento: "Colaboracao_com_o_CEP_FMT".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Quanto aos Termos de Assentimento Livre e Esclarecido, seguem as seguintes inadequações:

5.1. Solicita-se substituir o termo "cópia" por "via", em todos os documentos, e descrever no TALE que este deverá ser assinado em duas VIAS, ficando uma retida com o pesquisador responsável/pessoa por ele delegado e a outra com o participante de pesquisa/responsável legal (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA: Já foi feita a mudança. Vide os documentos:

"Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_8_12_anos_revisado_conep"; "Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_13_17_anos_revisado_conep". Sendo assim, os termos de assentimento da versão anterior, foram excluídos da plataforma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.2. Nenhum dos documentos apresenta a numeração nas páginas. Com o objetivo de garantir a integridade do documento, solicita-se que sejam inseridos os números de cada página, bem com a quantidade total delas, como por exemplo: "1 de 3" e assim sucessivamente até a página "3 de 3".

RESPOSTA: Já foi inserida numeração de páginas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.733.678

5.3. Solicita-se que o termo "rabisco" seja devidamente explicado aos participantes para que entendam que se trata de uma rubrica.

RESPOSTA: Esse termo de assentimento (3-7 anos) foi retirado da plataforma de acordo com parecer 5.5 abaixo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.4. Foram anexados na PB quatro(4) termos de assentimento (Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium.pdf, Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_3_7_anos_revisado, Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_8_12_anos_revisado e Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_13_17_anos_revisado). Solicita-se que o pesquisador esclareça a que população se destina o documento intitulado "Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium.pdf".

RESPOSTA: Este termo de assentimento foi o primeiro a ser anexado na plataforma, mas após o parecer do CEP ele foi modificado por faixa etária e não será mais utilizado e foi excluído da plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.5. Considerando-se a maturação das crianças de 3 e 7 anos, e a pouca capacidade dessas de compreensão, interpretação de texto e capacidade de escolhas autônomas, a aplicação do "Termo de Assentimento de 3 a 7 anos" não é necessária. Dessa forma, solicita-se que o pesquisador não realize a aplicação deste documento a esta faixa etária. Portanto, solicita-se a remoção deste Termo de Assentimento (Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_3_7_anos_revisado) da Plataforma Brasil.

RESPOSTA: Esse termo de assentimento foi excluído da plataforma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

NOVA PENDÊNCIA A PARTIR DA RESPOSTA AO PARECER Nº 2.494.950:

6. Quanto ao novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para melhor esclarecer o participante da pesquisa, solicita-se incluir as informações relacionadas ao depósito, armazenamento e utilização do material biológico humano (Resolução CNS nº 441 de 2011, item

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conepe@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

2.II).

RESPOSTA: Já foi feita a adequação no TCLE para maiores de 18 anos e no TCLE dos responsáveis pelos menores. Vide os documentos:

TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_maiores_de_18_anos

TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_responsaveis_pelos_menores.

Sendo assim, os TCLEs da versão anterior, foram excluídos da plataforma.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_963675.pdf	14/06/2018 12:03:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_13_17_anos_revisado_pos_parecer_da_conep.pdf	14/06/2018 12:03:08	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Resposta_parecer_conep_junho_2018_projeto_vigilancia_genomica_alteracoes_destacadas_no_texto.pdf	14/06/2018 12:01:17	simone da silva santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_Vigilancia_genomica_do_Plasmodium_8_12_anos_revisado_pos_parecer_da_conep.pdf	14/06/2018 12:01:07	simone da silva santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_responsaveis_pelos_menores.pdf	14/06/2018 12:00:48	simone da silva santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Vigilancia_genomica_Plasmodium_revisado_pos_parecer_da_conep_maiores_de_18_anos.pdf	14/06/2018 12:00:35	simone da silva santos	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

Declaração de Pesquisadores	Resposta_parecer_conep_junho_2018_projeto_vigilancia_genomica.pdf	05/06/2018 11:58:11	simone da silva santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_projeto_vigilancia_genomica.pdf	05/06/2018 11:54:39	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Resposta_parecer_CONEP_vigilancia_genomica.pdf	15/03/2018 11:55:12	simone da silva santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Questionario_vigilancia_genomica.pdf	15/03/2018 11:52:38	simone da silva santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_vigilancia_e_diversidade_plasmidiodium_completo_revisado_CONEP.pdf	15/03/2018 11:52:20	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Documento_autorizacao_FUNAI_vigilancia_genomica.pdf	15/03/2018 11:52:08	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Colaboracao_com_o_CEP_FMT.pdf	15/03/2018 11:51:24	simone da silva santos	Aceito
Parecer Anterior	resposta_as_pendencias_01_novembro_2017_projeto_vigilancia.pdf	01/11/2017 15:25:49	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_taane_colaboracao_internacional_traduzida_projeto_vigilancia.pdf	01/11/2017 15:25:26	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_colaboracao_internacional_susy_traduzida_projeto_vigilancia.pdf	01/11/2017 15:25:00	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_colaboracao_internacional_Berriman_traduzida_projeto_vigilancia.pdf	01/11/2017 15:23:18	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio_2017_projeto_vigilancia.pdf	01/11/2017 15:23:01	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_responsabilidade_do_coordenador_Simone_Santos_projeto_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:15:49	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_confidencialidade_Simone_Santos_projeto_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:15:38	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade_Monica_Palma_projeto_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:14:58	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_confidencialidade_Martha_Murtis_projeto_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:14:43	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_confidencialidade_Jessica_Sousa_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:14:25	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_confidencialidade-Taane_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:12:49	simone da silva santos	Aceito
Declaração de	termo_confidencialidade_susana_vigi	27/07/2017	simone da silva	Aceito

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.733.678

Pesquisadores	lancia_genomica.pdf	16:12:39	santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_confidencialidade_Matt_Berriman_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:12:24	simone da silva santos	Aceito
Outros	Oficio_carta_Laene_Gadelha_vigilancia_genomica_Secretaria_de_Saude_de_Barcelos.pdf	27/07/2017 16:10:27	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Faculty_letter_of_support_Susana_Campino_Projeto_vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:09:36	simone da silva santos	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Berriman_Letter_of_Support_Projeto_Vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:09:22	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	letter_of_support_Simone_Santos_Taane_Clark_Projeto_Vigilancia_genomica.pdf	27/07/2017 16:08:09	simone da silva santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Justificativa_para_o_envio_das_amostras_de_DNA_para_London_School.pdf	27/07/2017 16:07:57	simone da silva santos	Aceito
Outros	AUTO_VIGILANCIA_GENOMICA_CONSELHO_DISTRIITAL_DE_SAUDE.pdf	27/07/2017 16:06:46	simone da silva santos	Aceito
Outros	AUTO_SECRETARIA_DE_SAUDE_VIGILANCIA_GENOMICA_ATALAIADO_NORTE.pdf	27/07/2017 16:06:07	simone da silva santos	Aceito
Outros	AUTO_DSEI_VIGELANCIA_GENOMICA_Atalaia_do_Norte.pdf	27/07/2017 16:05:16	simone da silva santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 25 de Junho de 2018

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-049

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

APÊNDICE II

Código	Ano de Coleta	Idade	Sexo	Malária pregressa	Quadro clínico	Espécie parasitária	p _{fh} p ₂	p _{fh} p ₃	Tamanho da banda	
									p _{hrp} 2	p _{hrp} 3
1 019-01	2003	31	M	6	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo	p _{hrp} 2	p _{hrp} 3
2 021-01	2003	36	M	6	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
3 037-01	2003	37	M	7	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	650
4 SS001.01	2006	16	F	7	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
5 SS001.02	2006	41	F	10	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
6 SS002.01	2006	9	M	6	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
7 SS010.01	2006	13	M	7	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
8 SS012.01	2006	5	M	8	Malaria	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Positivo	Positivo	850	500
9 SS012.07	2006	60	F	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
10 SS013.01	2006	1	F	7	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
11 SS014.01	2006	8	M	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
12 SS014.04	2006	8	F	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	500
13 SS015.08	2006	21	F	15	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativo	Negativo		
14 SS016.03	2006	28	F	2	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
15 SS016.04	2006	29	M	15	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativo	Negativo		
16 SS016.05	2006	33	M	15	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Positivo	Positivo	500	650
17 SS018.01	2006	21	M	6	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
18 SS018.02	2006	12	M	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	650
19 SS018.03	2006	15	M	15	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Positivo	Negativo	850	

Código	Ano de Coleta	Idade	Sexo	Malária pregressa	Quadro clínico	Espécie parasitária	p _{fhpr2}	p _{fhpr3}	Tamanho da banda	
									p _{fhpr2}	p _{fhpr3}
22 SS022.08	2006	22	M	15	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	p _{fhpr2} 400	p _{fhpr3} 650
23 SS024.01	2006	66	F	4	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
24 SS026.02	2006	76	M	4	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
25 SS026.03	2006	16	F	3	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
26 SS026.04	2006	24	M	4	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
27 SS027.01	2006	15	F	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
28 SS028.02	2006	3	M	5	Malaria	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativo	Negativo		
29 SS030.01	2006	46	M	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	500
30 SS030.05	2006	11	M	2	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Positivo	Positivo	500	500
31 SS031.01	2006	4	M	4	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
32 SS032.02	2006	51	F	6	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	500	
33 SS035.06	2006	24	F	8	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativo	Positivo		650
34 SS036.01	2006	4	M	5	Malaria	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Positivo	Negativo	850	
35 SS039.01	2006	6	M	5	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	500	
36 SS039.05	2006	12	F	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
37 SS040.01	2006	15	M	6	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	500	650
38 SS041.02	2006	9	F	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
39 SS041.03	2006	13	M	10	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	500
40 SS042.05	2006	18	F	4	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
41 SS042.12	2006	16	F	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
42 SS043.01	2006	29	F	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	500

Código	Ano de Coleta	Idade	Sexo	Malária progressa	Quadro clínico	Espécie parasitária	p _{fhpr2}	p _{fhpr3}	Tamanho da banda	
									p _{hrp2}	p _{hrp3}
43 SS044.01	2006	7	M	5	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	500
44 SS045.01	2006	9	F	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	500
45 SS049.01	2006	21	F	3	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	650
46 SS050.01	2006	64	M	3	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	850	
47 SF100.03	2006	7	M	3	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
48 SF100.04	2006	2	F	7	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
49 SF101.01	2006	24	F	5	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
50 SF101.03	2006	10	M	4	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	650
51 SF102.01	2006	73	M	1	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
52 SF106.03	2006	7	F	1	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
53 SF111.01	2006	24	M	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
54 SF112.01	2006	13	M	5	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
55 SF112.08	2006	15	M	4	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativo	Negativo		
56 SF112.10	2006	46	M	50	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
57 SF118.01	2006	14	M	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
58 SF122.03	2006	11	F	10	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	100	650
59 SF123.04	2006	33	M	20	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
60 SF126.01	2006	77	M	3	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
61 SF130.01	2006	9	F	1	Infecção assintomática	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Negativo	Negativo		

Código	Ano de Coleta	Idade	Sexo	Malária progressa	Quadro clínico	Espécie parasitária	p _{fhpr2}	p _{fhpr3}	Tamanho da banda	
									p _{hrp2}	p _{hrp3}
62 201 (048)	2007	16	M	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo	p _{hrp2}	p _{hrp3}
63 202 I / III (049)	2007	18	F	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
64 203 I / II (050)	2007	28	M	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	1000	
65 204 II (051)	2007	57	F	0	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
66 205 I / III / IV (052)	2007	61	M	2	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	400	
67 206 II / III (053)	2007	34	M	4	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
68 207 I (054)	2007	16	F	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	1000	
69 208 I (55)	2007	16	F	4	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	1000	
70 209 (056)	2007	6	F	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	1000	
71 210 II / IV (057)	2007	14	F	3	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		650
72 211 II (058)	2007	36	F	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
73 217 I/II (064)	2007	77	F	2	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	1000	500
74 218 II (065)	2007	62	M	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Positivo		500
75 222 (068)	2007	20	M	5	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	1000	500
76 223 (069)	2007	71	M	1	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	1000	
77 224	2007	15	F	2	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Negativo	1000	
78 225 (070)	2007	14	M	3	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	1000	650
79 228 (072)	2007	28	M	4	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
80 HOSP19/2016	2016	34	F	6	Malaria	<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	Positivo	Negativo	850	
81 MSS	2016	44	F	3	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Negativo	Negativo		
82 ROC	2016	14	F	8	Malaria	<i>P. falciparum</i>	Positivo	Positivo	850	650