



UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
ESCOLA SUPERIOR CIÊNCIAS DA SAÚDE - ESA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA - MBT

ARTHUR JUNIO DE MORAES CASTRO

PREVALÊNCIA DO CARREAMENTO DE FORMAS SEXUAIS DE *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA ENDÊMICA, NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS

MANAUS

2014

ARTHUR JUNIO DE MORAES CASTRO

PREVALÊNCIA DO CARREAMENTO DE FORMAS SEXUAIS DE *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA ENDÊMICA, NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei

Co-orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Guimarães Lacerda

MANAUS

2014

Ficha Catalográfica

Castro, Arthur Junio de Moraes

M827p
2014

Prevalência do carreamento de formas sexuais de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* em uma área endêmica, no município de Manaus, Amazonas / Arthur Junio de Moraes Castro. - Manaus: [s.n.], 2014.
xv, 102 f.: il.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2014.

Inclui referências bibliográficas

1. Doenças tropicais - Dissertações. 2. Malária - Controle. 3. Biotecnologia. I. Tadei, Wanderli Pedro II. Universidade do Estado do Amazonas III. Título

CDU 1997 – 616.936 (811.3) (043.3)

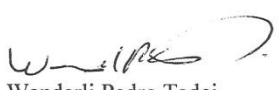


GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA – MBT**

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
ARTHUR JUNIO DE MORAES CASTRO
EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA.

Aos vinte e nove dias do mês de maio do ano de dois mil e quatorze as quatorze horas e trinta minutos, realizou-se no Miniauditório do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, localizado no 4º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde ESA, situado na Avenida Carvalho Leal, n.º1.777, Cachoeirinha, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de Arthur Junio de Moraes Castro, sob o título “Prevalência do Carreamento de Formas Sexuais de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* em Uma Área Endêmica, no Município de Manaus, Amazonas”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientador o Prof. Dr. Wanderli Pedro Tadei segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dr. Wanderli Pedro Tadei (Presidente), Dra. Maria das Graças Vale Barbosa (membro), e Dr. Wuelton Marcelo Monteiro (membro). Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo o aluno sido Aprovado


Dr. Wanderli Pedro Tadei

CPF: 717.029.948-15

Dra. Maria das Graças Vale Barbosa

CPF: 68.611.212-15


Dr. Wuelton Marcelo Monteiro

CPF: 042.892.789-06

Universidade do Estado do Amazonas
Av.: Djalma Batista, 3578 - Flores
CEP: 69050-010 / Manaus - AM
www.uea.edu.br

UEA
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DO
AMAZONAS


AMAZONAS
GOVERNO DO ESTADO

*Aos meus pais, que sempre
me apoiaram e acreditaram nas minhas decisões.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por terem me apoiado, me protegido em todos os momentos e me dado coragem para vencer os desafios.

Aos meus pais Selvanir e Gerson, minhas fontes de inspiração, pela dedicação, apoio, carinho, principalmente pelo seu amor.

Aos meus irmãos Kelly e Felipe pelo carinho e atenção.

À minha avó Maria por suas orações.

Ao meu orientador, Dr. Wanderli Pedro Tadei, por ter me recebido como aluno, pelos seus ensinamentos, por compreender minhas dificuldades e, principalmente, por sua amizade.

Ao Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, pela co-orientação na realização deste trabalho, bem como pela oportunidade dada de trabalhar com malária na FMT-HVD.

À Fundação Melinda Gates e Bill Gates, pelo financiamento do projeto e pela bolsa de estudo.

Ao Dr. Wuelton Marcelo Monteiro por todo auxílio durante o trabalho.

À Dra. Maria das Graças Vale Barbosa e Dra. Flor Ernestina Martinez-Espinosa, pela participação em meu exame de qualificação e pelas suas sugestões.

Agradecimento mais que especial a Andrea Kühn, sem a qual o trabalho provavelmente não teria sido possível. Obrigada por sua irrestrita disposição em me ajudar.

A equipe do trabalho de campo: Sheila Vitor, Reginaldo Nascimento, Rodrigo Sabóia, Ruan Silveira, Lidiane Ipuchima, Juscelino Torres e Tálita Larissa pela colaboração na coleta de amostras.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Gerencia de Malaria da FMT-HVD Andrea Kühn, Ane Almeida, Regina Nelson, Keillen Campos, Tereza Sanchez pelas trocas de experiências, favores cedidos e pelos bons momentos de convivência.

Aos Motoristas da FMT-AM, pela contribuição durante a etapa de campo: Senhores Pedro, Francisco de Assis, Raimundo Alves, e Taurio Junior.

A todos os moradores das localidades dos Ramais do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara que participaram do estudo, por me mostrarem uma realidade desconhecida.

Enfim, muito obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Nós temos uma vida uma vida cheia de desafios. Eles podem parecer impossíveis de serem vencidos mas lembre-se: Descanse no Senhor, passe tempo com Ele e depois parta para a luta, sabendo que além da tormenta brilha o sol

(Isaías 40:31)

RESUMO

PREVALÊNCIA DO CARREAMENTO DE FORMAS SEXUAIS DE *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* EM UMA ÁREA ENDÊMICA, NO MUNICÍPIO DE MANAUS, AMAZONAS

Gametócitos são essenciais para a transmissão da malária e endemicidade da doença, assim são alvos para estratégias de controle da malária. A prevalência de indivíduos infectados por *Plasmodium vivax* que carregam gametócitos permanece mal caracterizado em áreas endêmicas. Este trabalho teve como objetivo estimar a prevalência e fatores associados ao carreamento de formas sexuais de *P. falciparum* e *P. vivax* em participantes com infecção assintomática e sintomática em uma área endêmica de malária na Amazônia Brasileira. Realizamos um corte com 2072 participantes, residentes em área periurbana da cidade Manaus-AM, com aplicação de questionários e coleta de amostras de sangue para detecção de infecção malárica pelo método de qPCR, e de formas sexuais de *P. vivax*, pela técnica de RT-qPCR. A partir dos dados apurados e dos resultados moleculares foi possível estabelecer as prevalências e os fatores associados à infecção e ao carreamento de gametócitos de *P. vivax*, utilizando análise univariada. A prevalência de infecção por *P. vivax* foi de 3,38% e de gametocitemia foi de 1,64%. A prevalência de infecção por *P. vivax* e da gametocitemia em assintomáticos correspondeu a 67,14% do total deste parasito (47/70) e 61,76% (21/34), respectivamente, com baixa densidade de parasitos circulantes (37,62 cópias/ μ L). Os fatores associados à infecção malárica foram: malária recente (OR=3,07; IC 95%=1,18-7,95; p=0,21), uso recente de antimalárico (OR=3,41; IC 95%=1,57-7,37; p<0,0001), e presença de febre (OR=6,90; IC 95%=3,67-12,99; p<0,0001). Os fatores de proteção para a infecção por *P. vivax* foram: gênero, faixa etária e histórico de malária. Os fatores associados ao carreamento de gametócitos de *P. vivax* foram: malária recente (OR=4,98; IC95%=1,80-15,62; p=0,011), uso recente de antimalárico (OR=4,57; IC95%=1,72-12,13; p=0,009), localidade (OR=2,84; IC95%=1,08-7,44; p=0,034), presença de febre (OR=6,60; IC95%=2,79-15,63; p<0,001) e infecção prévia apresentando-se como maior risco para a gametocitemia de *P. vivax*, na categoria 4-10 infecções (OR=18,40; IC95%=2,42-193,93; p<0,001). A faixa etária acima de 15 anos foi o único fator de risco para carreamento dos gametócitos de *P. vivax* em assintomáticos (OR=33,25; IC95%=3,90-283,46; p=0,001). Neste estudo, o carreamento de gametócitos em infecções assintomáticas por *P. vivax* evidencia relevância epidemiológica e sugere intervenções no controle de malária. A realização de estudos longitudinais se faz necessária para determinar a contribuição para a infecção de longa duração em portadores assintomáticos com baixa densidade de gametócitos, os quais são deixados sem diagnóstico e tratamento.

Palavras-chave: Malária, Gametócitos, RT-qPCR, *Plasmodium vivax*.

Área de Concentração: Prospecção e Uso de Recursos Naturais

Linha de Pesquisa: Conservação e Uso Sustentável da Biodiversidade

ABSTRACT

PREVALENCE OF SEXUAL WAYS CARRYING OF *Plasmodium falciparum* AND *Plasmodium vivax* MALARIA IN AN ENDEMIC AREA, IN MANAUS, AMAZONAS

Gametocytes are essential for the transmission of malaria endemicity of the disease and thus are targets for malaria control strategies. The prevalence of individuals infected with *Plasmodium vivax* gametocytes that carriage remains poorly characterized in endemic areas. This study aimed to estimate the prevalence and factors associated with carrying of sexual forms of *P. falciparum* and *P. vivax* in participants with asymptomatic and symptomatic infection in an endemic area of malaria in the Brazilian Amazon. We performed a cut with 2072 participants residing in peri-urban area of Manaus-AM city with questionnaires and collection of blood samples for the detection of malarial infection qPCR method, and sexual forms of *P. vivax*, the RT technique -qPCR. From the data gathered and molecular results was possible to establish the prevalence and factors associated with infection and carrying of gametocytes of *P. vivax*, univariate analysis. The prevalence of *P. vivax* infection was 3.38% and gametocitemia was 1.64%. The prevalence of *P. vivax* infection in asymptomatic gametocitemia and corresponded to 67.14% of this parasite (47/70) and 61.76% (21/34), respectively, with low density circulating parasites (37, 62 copies / uL). Factors associated with malaria infection were: recent malaria (OR = 3.07; 95% CI = 1.18 to 7.95; p = 0.21), recent use of antimalarial (OR = 3.41; 95% CI = 1.57 to 7.37; p <0.0001), and the presence of fever (OR = 6.90; 95% CI = 3.67 to 12.99; p <0.0001). The protection factors for infection with *P. vivax* were: gender, age and malaria history. Factors associated with the carrying of gametocytes of *P. vivax* malaria were: recent (OR = 4.98, 95% CI 1.80 to 15.62; p = 0.011), recent use of antimalarial (OR = 4.57; 95% CI = 1.72 to 12.13, p = 0.009), location (OR = 2.84, 95% CI 1.08 to 7.44; p = 0.034), presence of fever (OR = 6.60; 95% CI 2.79 to 15.63; p <0.001) and previous infection presenting as higher risk for gametocitemia of *P. vivax* in the category 4-10 infections (OR = 18.40; 95% CI = 2, 42 to 193.93, p <0.001). The age group above 15 years was the only risk factor for entrainment of gametocytes of *P. vivax* in asymptomatic (OR = 33.25, 95% CI 3.90 to 283.46; p = 0.001). In this study, the carrying of gametocytes in asymptomatic infections by *P. vivax* epidemiological relevance and evidence suggests interventions in malaria control. The longitudinal studies are needed to determine the contribution to the long-term infection in asymptomatic patients with low density gametocytes, which are left undiagnosed and untreated.

Keywords: Malaria, Gametocytes, RT-qPCR, *Plasmodium vivax*.

Concentration Area: Exploration and Use of Natural Resources

Research Interests: Conservation and Sustainable Use of Biodiversity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa dos países e territórios afetados pela malária em 2010.....	01
Figura 2 – Ciclo de vida do parasito da malária	03
Figura 3 – Mapa evidenciando o risco de transmissão da malária no Brasil em 2012.....	06
Figura 4 – Índice parasitário anual (IPA) do Município de Manaus no período de 2010 a 2014, por local provável de infecção	07
Figura 5 – Morfologia e biologia do gametócitos	08
Figura 6 – Localização geográfica das localidades do estudo.....	17
Figura 7 – Curva de amplificação de plasmídeo (padrão obtido 10^2 - 10^6 cópias/ μ L), obtida em PCR de tempo real, para a quantificação do número de cópias de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	22
Figura 8 – Curva-padrão de plasmídeo (padrão obtido 10^2 - 10^6 cópias/ μ L), obtida em PCR de tempo real, para a quantificação do número de cópias de <i>P. vivax</i> e <i>P. falciparum</i>	23
Figura 9 – Prevalência da infecção por <i>P. vivax</i> e de gametócitos em indivíduos assintomáticos e sintomáticos.....	34
Figura 10 – Correlação entre o número de cópias do <i>P. vivax</i> e de <i>pvs25</i> , detectados por qPCR e RT-qPCR.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mix da reação para detecção da presença do parasito da malária	20
Tabela 2 – Mix da reação para detecção de amostras positivas de <i>P. vivax</i>	20
Tabela 3 – Mix da reação para detecção de amostras positivas de <i>P. falciparum</i>	20
Tabela 4 – <i>Primers</i> e sondas empregadas na amplificação e controles positivos, respectivamente, na detecção de <i>Plasmódium</i> spp. e na determinação das espécies de <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i>	21
Tabela 5 – Mix da reação para detecção de amostras positivas de <i>pfs25</i> e <i>pvs25</i>	24
Tabela 6 – <i>Primers</i> e sondas empregados na amplificação e controles positivos, respectivamente, dos transcritos específicos <i>Pfs25</i> em <i>P. falciparum</i> e <i>Pvs25</i> em <i>P. vivax</i> ..	25
Tabela 7 – Número de participantes, prevalência e fatores associados à infecção por <i>P. vivax</i>	30
Tabela 8 – Prevalência e fatores de risco para o carregamento de gametócitos de <i>P. vivax</i> em participantes com infecção por <i>P. vivax</i>	32
Tabela 9 – Prevalência e fatores de risco dos participantes carreadores de gametócitos de <i>P. vivax</i> em infecção assintomática	35
Tabela 10 – Comparação entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos, através da densidade média do número de cópias de <i>P. vivax</i>	36
Tabela 11 – Densidade média cópias de <i>P. vivax</i> e <i>pvs25</i> em amostras positivas por qPCR e qRT-PCR	36

LISTA DE ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

AM – Estado do Amazonas

cDNA – ácido desoxirribonucleico complementar

CEP – Comissão de Ética e Pesquisa em Seres Humanos

CQ – Cloroquina

CT – cycle threshold (ciclo limiar)

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

FMT-AM – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

FVS – Fundação de Vigilância em Saúde

GE – gota espessa

h – horas

IC – intervalo de confiança

IBGE – Instituto Brasileiro de Estatística e Informática

ibpy – picadas infecciosas por pessoa ao ano

IPA – Incidência Parasitaria Anual

LVC – Lâmina de verificação de cura

mL – mililitro

n – número

ND – não detectado

OBIPA – Oficina sobre a infecção plasmodial assintomatica

OMS – Organizacao Mundial da Saúde

OR – odds ratio (razão de chances ou razão de possibilidades)

p – nível de significância

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

P. – *Plasmodium*

pvs25 – gene de detecção de gametócitos de *Plasmodium vivax*

pfs25 – gene de detecção de gametócitos de *Plasmodium falciparum*

Primer f – iniciador anterior

Primer r – iniciador reverso

QMAL – Quantificação de parasitos de malária

QT-NASBA – Amplificação quantitativa baseada na sequência de ácido nucléico

RNA – ácido ribonucléico

RNAr – ácido ribonucléico ribossômico

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

RT-LAMP – Reverse Transcription-Loop-mediated Isothermal Amplification (Circuito de amplificação isotérmica de transcrição reversa mediada)

RT-qPCR – Transcriptase reversa em reação em cadeia da polimerase em tempo real

SIVEP – Sistema de Vigilância Epidemiológica

SUSAM – Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas

TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido

Tris-HCL – (hidroximetil) aminometano cloridrato

\geq – maior ou igual

\leq – menor ou igual

μL – microlitro

% – porcentagem

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Epidemiologia da malária	01
1.2 Ciclo biológico do parasito da malária	03
1.3 Malária no Brasil	04
1.4 Morfologia e biologia dos gametócitos	07
1.5 Gametocitogênese	09
1.6 Métodos moleculares para detecção de gametócitos	11
1.7 A importância das infecções assintomáticas	13
2 OBEJTIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3 METODOLOGIA	16
3.1 Tipo de estudo	16
3.2 Área do estudo	16
3.3 Local do estudo	16
3.4 População do estudo	17
3.5 Visita domiciliar	17
3.6 Coleta e processamento das amostras	18
3.7 Diagnóstico molecular da malária	19
3.8 Detecção de gametócitos	23
3.9 Definição de caso de malária	25
3.10 Aspectos éticos	26
3.11 Análise dos dados	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Características epidemiológicas e clínicas	28
4.2 Prevalência e fatores associados à infecção por <i>P. vivax</i>	29
4.3 Prevalência e fatores associados ao carreamento de gametócitos de <i>P. vivax</i>	31
4.4 Prevalência de infecção malárica em assintomáticos e sintomáticos	33

4.5 Prevalência da gametocitemia em assintomáticos e sintomáticos.....	33
4.6 Fatores associados à infecção assintomática de <i>P. vivax</i>	34
4.7 Infecção sintomática vs infecção assintomática	35
4.8 Correlação entre parasitos de <i>P. vivax</i> e gametócitos.....	36
5 DISCUSSÃO	38
5.1 Prevalência da infecção malárica e dos gametócitos.....	38
5.2 Fatores associados ao carregamento de gametócitos.....	39
5.3 Carreamento de gametócitos em infecções sintomáticas e assintomáticas	40
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da malária

A malária é uma doença infecciosa parasitária presente em regiões endêmicas e apresenta uma grande importância em termos de saúde pública, oferecendo risco a cerca de 3,4 bilhões de pessoas. Atualmente, a malária ameaça um terço da população mundial em 104 países tropicais, onde é considerada doença endêmica. Segundo dados WHO (2013), 207 milhões de casos de malária ocorreram no mundo em 2012, ocorrendo 627 mil mortes. África, Sudeste da Ásia e Mediterrâneo Oriental são regiões com maior número de casos e mortes relatados, principalmente em crianças menores 5 anos de idade (WHO, 2013).

Em escala global, entre os anos de 2000 e 2009, observou-se tendência de aumento no número de casos até 2005, com declínio a seguir, atribuído ao sucesso parcial das medidas de vigilância e controle da malária. Nas Américas, 21 países são afetados pela doença, com 1,1 milhões de casos e 1,1 milhões de mortes registradas em 2010. Nestas regiões, 30% da população vive em risco e 8% são classificadas como alto risco (WHO, 2012; PAHO, 2013).

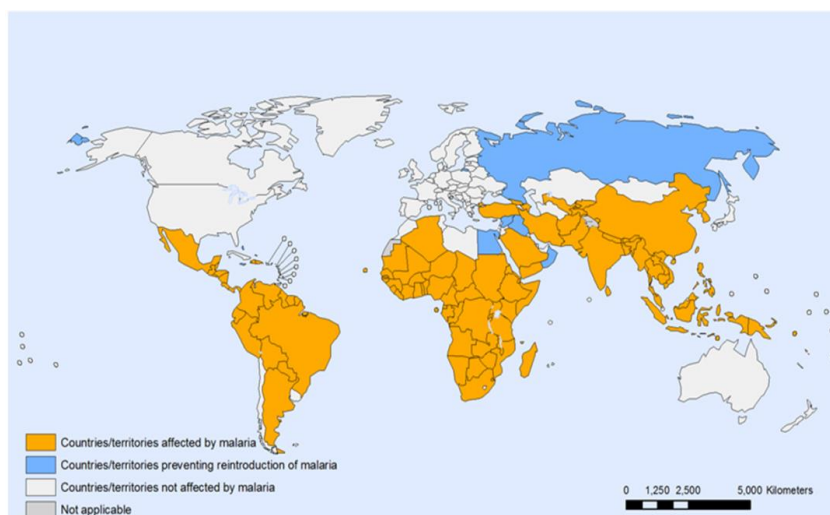


Figura 1: Mapa dos países e territórios afetados pela malária em 2010. Fonte: WHO, 2012.

O gênero *Plasmodium* Marchiafava e Celli, 1885, pertence ao Reino Protista, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Ordem Hemosporidida, Família Plasmodidae. São reconhecidos como agentes etiológicos da malária humana: *Plasmodium vivax*

Grassi e Feletti, 1890, *Plasmodium falciparum* Welch, 1897, *Plasmodium malariae* Laveran, 1881 e *Plasmodium ovale* Stephens, 1922, e uma quinta espécie recentemente descrita, foi considerada responsável também pela malária em seres humanos, o *Plasmodium knowlesi* Sinton e Mulligan, 1932 (McCUTCHAN, 2008; DE SOUZA; RILEY, 2002; NGOUNGOU; PREUX, 2008).

A infecção por essas diferentes espécies tem suas características próprias, bem como apresenta diferenças em suas áreas de distribuição. *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* são os principais parasitos causadores da doença e responsáveis pela maior parte dos casos de malária em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Plasmodium falciparum é considerado a espécie mais virulenta devido aos elevados níveis de morbidade e mortalidade, principalmente nos países da África (MENDIS *et al.*, 2001).

P. vivax apresenta uma ampla distribuição geográfica no mundo: Ásia Central (82%), Sudeste da Ásia (9%) e Américas (6%) (GUERRA *et al.*, 2009). A espécie *P. vivax* é responsável pelo maior número de casos podendo haver complicações clínicas severas e mortes (ALEXANDRE *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2012).

Embora a interação entre parasitos do gênero *Plasmodium* e o homem seja conhecida há longa data, as estratégias de controle desenvolvidas até o presente momento ainda não foram capazes de eliminar a malária, que permanece como uma das doenças infecciosas mais importantes pelo fato de estar associada à elevada morbidade e mortalidade (MILLER *et al.*, 2002).

O controle da malária baseia-se atualmente no tratamento dos indivíduos infectados e no tratamento profilático de populações que residem em áreas de alto risco, além do controle do mosquito vetor, que é realizado pela borrifação intra-domiciliar de inseticidas e o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas (KAPPE *et al.*, 2003).

A transmissão da malária de um hospedeiro humano infectado para um mosquito suscetível é mediada por estágios sexuais altamente especializados, os gametócitos. Um importante determinante da transmissão é a frequência com que o vetor se alimenta em hospedeiros infectados com densidades de gametócitos suficientes em seu sangue periférico. Portanto, é extremamente importante definir o reservatório infeccioso da malária dentro de uma área, isto é, as pessoas capazes de transmitir a malária aos mosquitos, já que este reservatório constitui a parcela da população que deve ser alvo

das intervenções para diminuição da transmissão da malária (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

1.2 Ciclo biológico do parasito da malária

O ciclo de vida do agente etiológico passa por uma fase de reprodução sexuada, e três assexuadas. A fase sexuada (fertilização) e a primeira assexuada (esporogonia) ocorrem no estômago do mosquito *Anopheles*; a segunda ocorre nas células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exoeritrocítica) e a terceira, no sangue (esquizogonia eritrocítica) do hospedeiro vertebrado, repetindo-se várias vezes (ÁVILA *et al.*, 1996).

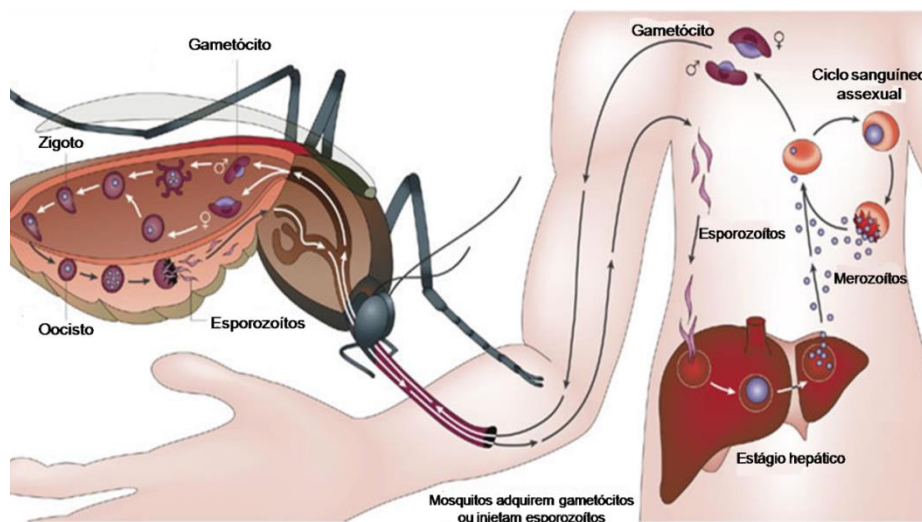


Figura 2: Ciclo de vida do parasito da malária. Fonte: Nature Reviews.

A fase sexual inicia-se quando o mosquito anofelino se infecta ao picar uma pessoa com gametócitos, durante o repasto sanguíneo da fêmea. O gametócito é a fase do parasito que permite a transmissão do plasmódio a partir de hospedeiro humano para o inseto vetor. É fundamental a formação de gametócitos para garantir a continuação do ciclo de vida do plasmódio no mosquito. Gametócitos não causam doença clínica, mas uma vez ingeridos pelo anofelino que tomam uma refeição de sangue, podem evoluir para oocinetos, oocistos e esporozoítos, finalmente, tornando o mosquito infeccioso para os seres humanos (SINDEN *et al.*, 1996; SINDEN *et al.*, 2002).

De acordo com BOUSEMA *et al.* (2011) a formação e maturação de gametócitos ocorrem em cinco etapas morfológicamente reconhecíveis. No entanto, somente quando os gametócitos estão maduros e circulando no sangue periférico, que podem ser ingeridos pelos mosquitos, durante o repasto sanguíneo. Uma vez infectado os mosquitos, cada gametócito faz um macrogameta feminino ou até 8 microgametas masculino. Os gametas (macro e microgametas) livres iniciam o processo de fertilização, intestino médio do mosquito, produzindo um zigoto que vai se desenvolver em uma forma invasiva, o oocineto móvel, que caminha em direção ao intestino médio do mosquito podendo formar oocistos.

Na esporogonia, o oocisto cresce e se divide, produzindo milhares de esporozoítos invasivos, migrando pelo corpo do mosquito até invadirem as glândulas salivares, eliminando esporozoítos, durante a picada. Este ciclo dura cerca de oito a trinta e cinco dias (ÁVILA, 1996; BRASIL, 2005).

Segundo FERREIRA *et al.* (2004), a forma infectante inicial (esporozoíto) penetra no organismo humano através da saliva introduzida no sangue dos capilares subcutâneos, pela picada da fêmea do mosquito anofelino infectado, desaparecendo do sangue circulante após 30 minutos. Alguns esporozoítos são destruídos por macrófagos, os que passam pelo fígado penetram nos hepatócitos, onde ocorre a esquizogonia, resultando na formação de esquizontes. Esses, após 16 dias de infecção, rompem-se e libertam os merozoítos (até 10.000 para o *P. vivax*, 40.000 para o *P. falciparum* e 7.500 a 18.600 para o *P. malariae*), casando assim a doença clínica.

Nas infecções por *P. falciparum* e por *P. malariae*, os esquizontes teciduais se rompem todos ao mesmo tempo e nenhum persiste no interior dos hepatócitos. Em *P. ovale* e *P. vivax*, algumas formas exoeritrocíticas (hipnozoítos), ficam latentes no fígado por meses ou anos, e são responsáveis pelas recaídas (FERREIRA *et al.*, 2004).

1.3 Malária no Brasil

Entre as endemias parasitárias brasileiras, a malária permanece entre as principais. No Brasil a incidência anual de malária multiplicou-se por dez entre 1970 e meados da década de 1990, estabilizando-se por vários anos em torno de 500.000 casos anuais (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2008). No ano de 2011, foram registrados 265.919 casos de malária, a transmissão concentra-se em 99,9% na Amazônia Legal, que compreende os estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima,

Rondônia, Amapá, Mato Grosso, Tocantins e Maranhão, onde a predominância de casos nessa região se deve as condições socioeconômicas e ambientais que favorecem a exposição de grandes contingentes populacionais ao risco de infecção (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; SIVEP-Malária, 2012).

P. vivax é responsável por mais de 80% dos casos da doença em humanos no Brasil. Apesar de *P. falciparum* ser responsável pela malária grave, atualmente apresenta um percentual baixo nos casos notificados no país, desde a última década (13,15%). *P. malariae* é a espécie menos prevalente (0,037%) (ALEXANDRE *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012; LACERDA *et al.*, 2012).

O principal vetor da malária em áreas endêmicas brasileiras é *Anopheles darlingi* (DEANE, 1948; TADEI *et al.*, 1998; TADEI, 2000; TAKKEN *et al.*, 2005). A transmissão é cíclica, aumentando consideravelmente, após o período chuvoso do ano, o número de casos positivos (período de alta transmissão), nos meses de junho a outubro (SANTOS-CAMPOS *et al.*, 2012; TADEI *et al.*, 2003).

Embora o território brasileiro apresente uma extensa superfície onde há risco de transmissão de malária, este não é o mesmo em todas as áreas geográficas, originando níveis endêmicos diferentes na dependência da variedade e intensidade de associação dos fatores de risco (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

A área urbana do município de Manaus, por exemplo, a partir da metade da década de 1980 começou a sofrer forte ação antrópica, resultando em seu desmatamento e conseqüentemente na alteração ambiental. antes cobertas por vegetação foram gradativamente sendo desmatadas dando espaço à expansão urbana da cidade. Estas pressões ambientais tornaram os ambientes propícios ao desenvolvimento do *Anopheles* e conseqüentemente casos de malária (BARBOSA, 2008).

As condições ambientais, climáticas e a grande extensão geográfica, favorecem o desenvolvimento dos vetores e dos parasitos da malária no estado do Amazonas. A temperatura média no verão, entre 28° e 29°C, contribui para o aumento da densidade vetorial e o desenvolvimento de plasmódios nos mosquitos vetores (MOTTA, 1992; TADEI *et al.*, 2003; TADEI *et al.*, 2009).

Rios, igarapés e lagos são grandes facilitadores da transmissão da doença, junto com as enchentes e vazantes, que determinam a formação de criadouros temporários de vetores. As coleções hídricas artificiais constituídas de barragens e tanques de piscicultura têm se configurado como importantes criadouros permanentes de mosquito

transmissor da malária, devendo ser considerados entre os fatores ambientais de riscos passíveis de intervenções (TADEI *et al.*, 2009; TADEI *et al.*, 2003).

O risco de adquirir malária está baseado no índice parasitário anual (IPA), que corresponde ao número de infecções diagnosticadas em cada localidade ao longo de um ano dividido por sua população. Com base no IPA, definem-se áreas de alto risco (IPA maior que 49,9 casos de malária/1.000 habitantes), médio risco (IPA, entre 10 e 49,9 casos/1.000 habitantes) e baixo risco (IPA de 0,1 a 9,9 casos/1.000 habitantes) (SARAIVA *et al.*, 2009). É possível observar que, apesar das diversas estratégias de controle aplicadas no país, os níveis de transmissão estão em constante mudança, e isso requer um monitoramento frequente a fim de aperfeiçoar o alcance e eficácia das medidas empregadas (OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

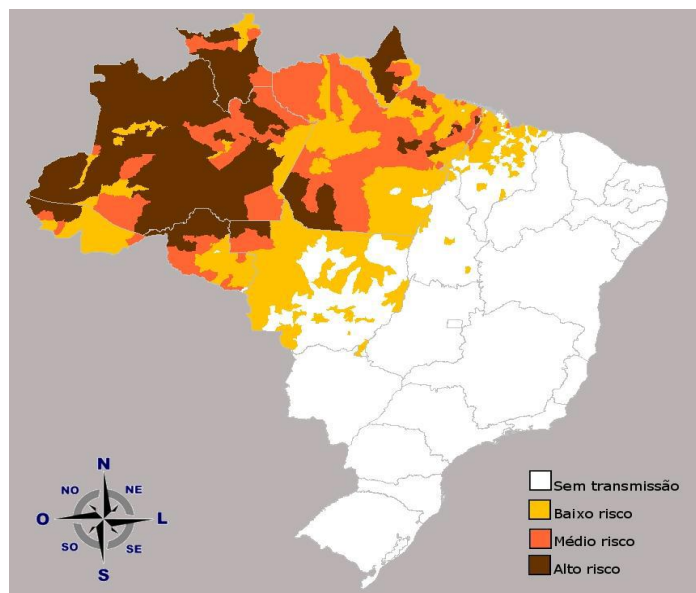


Figura 3: Mapa evidenciando o risco de transmissão da malária no Brasil em 2012. Fonte: Secretaria de Vigilância em saúde, 2013.

De acordo com MINISTÉRIO DA SAÚDE (2008) as áreas de alto risco têm como características epidemiológicas floresta tropical úmida que favorece a transmissão perene e focalmente intensa para populações migrantes com escassa imunidade, altas densidades de *A. darlingi*, moradias precárias sem proteção (BRASIL, 2008).

Área de médio risco tem como características: população humana mais antiga com maior imunidade; migração em áreas rurais a urbanas; habitações mais protegidas, baixas densidades de *A. darlingi*, predomínio de *P. vivax* e infra-estrutura social mais desenvolvida, (BRASIL, 2008).

E as áreas de baixo risco são aquelas com incidência de malária instável, apresentando populações com infra-estrutura social bem desenvolvida, onde a transmissão foi interrompida, mas ainda conserva o potencial de surtos da doença. As áreas sem risco são aquelas com ausência de fatores epidemiológicos necessários para a transmissão de malária (BRASIL, 2008).

O município de Manaus é uma área de baixa transmissão de malária, ocorrendo mais em áreas rurais e peri-urbanas (SIVEP-Malária, 2012). O índice parasitário anual (IPA) de 2010 até o presente momento (2014), gerado pelo SIVEP-Malária, indica uma redução progressiva da transmissão nos últimos cinco anos (figura 04).

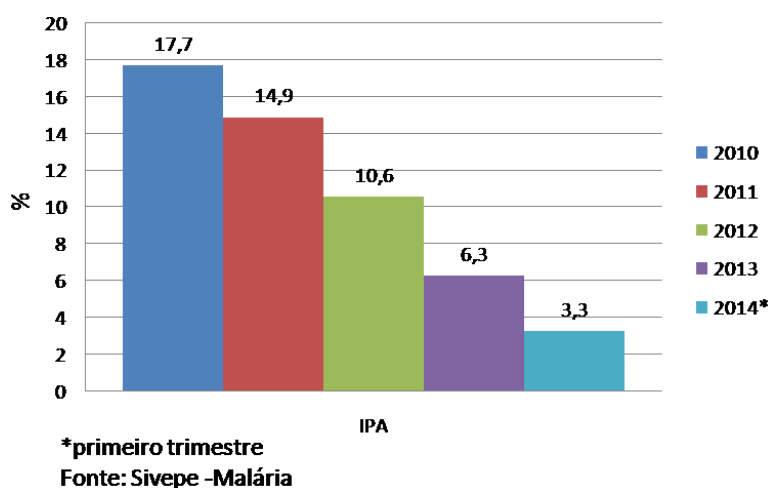


Figura 4: Índice parasitário anual (IPA) do Município de Manaus no período de 2010 a 2014, por local provável de infecção. Fonte: SIVEP-Malária.

1.4 Morfologia e biologia dos gametócitos

Gametócitos são os parasitos do estágio sexual que infectam os mosquitos *Anopheles* e participam da transmissão da doença. Apesar deste papel crucial na transmissão da malária, os gametócitos foram pouco estudados, mas com o recente interesse na eliminação da malária, voltaram a ser estudados. Esta avaliação, destaca o conhecimento de desenvolvimento e longevidade de gametócitos de *P. falciparum* e *P. vivax* no hospedeiro humano e os fatores que influenciam sua distribuição em populações endêmicas (LIMA *et al.*, 2012).

Há evidência de que o sexo do gametócito é pré-determinado no esquizonte comprometido com o estágio sexual, e todos os merozoítos liberados a partir de um esquizonte comprometido sexualmente, tornam-se somente gametócito masculino ou somente gametócito feminino (SILVESTRINI; ALANO; WILLIAMS, 2000).

Dividem-se em cinco estágios morfológicamente reconhecíveis e durante o crescimento alongam-se ocupando gradualmente a maior parte do eritrócito (HAWKING; WILSON; GAMMAGE, 1971; BAKER, 2010). Os gametócitos maduros de *P. vivax* de ambos os sexos são grandes, redondos ou ovais, preenchendo quase todo o eritrócito do hospedeiro (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

Morfológicamente, os gametócitos maduros de *P. falciparum* são caracterizados por uma forma alongada com extremidades pontiagudas. Gametócitos femininos são caracterizados por um núcleo relativamente pequeno, com um nucléolo e pigmento concentrado. Gametócitos masculinos apresentam núcleo maior e o pigmento é mais difuso, aparentando não ter um nucléolo, em lâminas coradas com Giemsa, como células cor de rosa, ao contrário dos femininos que se coram em violeta (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

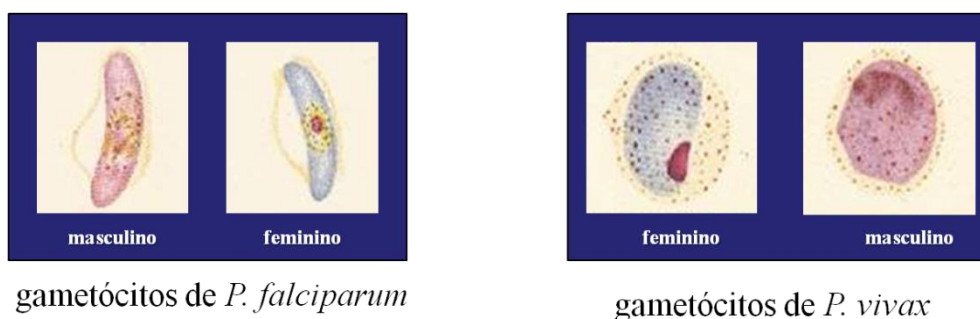


Figura 5: Morfologia celular dos gametócitos maduros masculinos e femininos de *P. falciparum* e *P. vivax*. Fonte: Manual de Diagnóstico de Malária, 2011.

Os fatores que determinam o sexo de gametócitos são pouco compreendidos. Os parasitos da malária não possuem cromossomos sexuais, um clone do parasito pode produzir tanto gametócitos masculinos como gametócitos femininos e se auto-fertilizar (SINDEN *et al.*, 1983).

A proporção entre gametócitos femininos e masculinos tem um impacto imediato no sucesso de transmissão (MITRI *et al.*, 2009), e a proporção ideal varia em diferentes circunstâncias. Razões de 3 ou 4 gametócitos femininos para 1 masculino são

comumente observados em infecções naturais por *P. falciparum*, mas há variações na proporção de sexos entre clones e durante o curso das infecções (BOUSEMA; DRAKELEY, 2011).

Quando gametócitos de *P. vivax* são ingeridos por mosquitos, os gametas emergem do eritrócito e sofrem ativação comparável à de *P. falciparum* (IHALAMULLA *et al.*, 1987), com as alterações nos níveis de transcrição de proteínas que ocorrem durante o processo (WESTENBERGER *et al.*, 2010). A esporogonia demora 8-10 dias a 28°C e 16 dias a 20°C para ambas as espécies de parasitos, mas *P. vivax* tem um limite mais baixo de desenvolvimento de 14,5°C, em comparação a 16°C por *P. falciparum* (GUERRA *et al.*, 2008; SINDEN *et al.*, 2002).

A presença de gametócitos tem sido relatada mais comumente em infecções por *P. vivax* do que em infecções por *P. falciparum* e são detectados através de microscopia, na maioria das infecções, com densidades de <10% de parasitos assexuados (SATTABONGKOT *et al.*, 1991; SUWANABUN *et al.*, 2001; NACHER *et al.*, 2004; MCKENZIE *et al.*, 2006; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2008; HUH *et al.*, 2011).

Em episódios clínicos de malária, a gametocitemia de *P. vivax* tem sido associada com maiores densidades de parasitos, idade mais jovem e presença de febre (GAMAGE-MENDIS *et al.*, 1991; NACHER *et al.*, 2004; MCKENZIE *et al.*, 2006; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2008).

Em relação às taxas de infecções de *P. vivax* nos mosquitos vetores são similares para o caso de *P. falciparum*. A associação entre a densidade gametócitos de *P. vivax* e a taxa de infecção no mosquito é frequentemente descrita como fraco ou mesmo ausente (GRAVES *et al.*, 1988; COLEMAN *et al.*, 2004; BHARTI *et al.*, 2006; GAMAGI MENDIS *et al.*, 2006).

O sucesso de transmissão pode depender da duração da infecção, ou seja, o nível de maturação gametócitos, e a proporção de gametócitos masculinos (McKENZIE *et al.*, 2006). Duas comparações diretas na transmissão de *P. vivax* e *P. falciparum* sugeriu que a transmissão da malária por *P. vivax* pode ser mais eficiente do que por *P. falciparum*, com menores concentrações de gametócitos, resultando em infecção no mosquito (BOYD *et al.*, 1937; PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2008).

A longevidade de gametócitos de *P. vivax* é reduzida com todos os medicamentos antimaláricos comumente utilizados, considerados eficazes contra estágios sexuais tanto imaturos e maduros (BAIRD 2009; COVEL *et al.*, 1955;

NACHER *et al.*, 2004). O tempo de produção de novos gametócitos é em média 24 horas (NACHER *et al.*, 2004) e são eliminados da grande maioria dos pacientes dentro de 4 dias após o tratamento antimalárico bem sucedido (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2008).

1.5 Gametocitogênese

A gametocitogênese é o processo pelo qual gametócitos masculinos e femininos se desenvolvem a partir de parasitos assexuados (TALMAN *et al.*, 2004). De acordo com BOUSEMA *et al.*, 2011) muitas questões permanecem ainda abertas ou pouco compreendidas sobre a investigação da gametocitogênese no hospedeiro humano como os fatores desencadeadores do processo.

Há duas hipóteses que tentam explicar o estímulo responsável pela produção de gametócitos: a primeira sugere que os merozoitos já estão comprometidos em se transformar em formas assexuadas ou em gametócitos antes da invasão no eritrócito (LOBO *et al.*, 1998). A segunda hipótese sugere que fatores ambientais promovam o desenvolvimento dos parasitos em gametócitos (LOBO *et al.*, 1998; DIER *et al.*, 2000).

Não se sabe até que ponto a gametocitogênese é um processo no qual uma subpopulação de parasitos assexuados aleatórios se diferenciam em estágios sexuais, ou se é especificamente estimulada por fatores ambientais, tratamento medicamentoso ou resposta imune do hospedeiro (KUEHN; PRADEL, 2010).

No entanto, é interessante notar que nos últimos anos a questão de diferenciação dos estágios assexuados e de gametócitos tem sido objeto de crescente interesse e foram descobertos que alguns fatores particularmente aqueles de inibição da proliferação de parasitos assexuados, quer por mecanismos imunológicos (imunidade do hospedeiro contra a parasitemia assexuada correlacionada com aumento ou diminuição na gametocitemia) ou antimaláricos (primaquina e cloroquina) (DIER *et al.*, 2000; PAUL *et al.*, 2002).

A mudança da fase assexuada para o desenvolvimento sexual envolve uma reprogramação significativa da atividade de transcrição, resultando na expressão específica de mais de 25% dos 5.500 genes do genoma do plasmódio (FLORENS *et al.*, 2002; HAYWARD *et al.*, 2000; LASONDER *et al.*, 2002; LE ROCH *et al.*, 2003).

Para *P. falciparum* as fases de desenvolvimento dos gametócitos diferem substancialmente dos seus precursores assexuados, sendo que pelo 250-300 genes são

especificamente associados ao desenvolvimento dos gametócitos e aproximadamente 300 proteínas são encontradas exclusivamente nestas formas (LASONDER *et al.*, 2002; YONG *et al.*, 2005).

Gametócitos maduros de *P. falciparum* são detectáveis na corrente sanguínea entre 7 a 15 dias após o aparecimento das formas assexuadas e o tempo médio de circulação de gametócitos maduros pode ser estimado entre 3 a 22 dias (EICHNER *et al.*, 2001).

Em contraste com *P. falciparum*, gametócitos maduros de *P. vivax* podem ser encontrados no sangue no início do curso da infecção, após três dias, durante os primeiros ciclos de replicação assexuada, produzindo gametócitos de forma quase contínua durante os primeiros meses de infecção e muitas vezes antes do aparecimento dos sintomas e do início do tratamento (BOUSEMA *et al.*, 2011).

A carga de gametócitos de *P. vivax* é acentuadamente menor comparado a *P. falciparum*, na ausência de tratamento, gametócitos da primeira espécie podem circular por um período máximo de três dias, (CARTER, 1988).

Estudos evidenciam que há uma limitação para a compreensão da gametocitogênese, como diferenças entre as zonas de diferente intensidade de transmissão ou após redução na intensidade, embora a presença de gametócitos, geralmente é mais comum em áreas de maior endemicidade (DRAKELEY *et al.*, 2005; MABUNDA *et al.*, 2008; MUTURI *et al.*, 2006).

No entanto, o sucesso nas etapas de transmissão pode ser maior em ambientes de baixa endemicidade. No Quênia, 18% dos portadores de parasitos que vivem em uma área exposta a 10 picadas infecciosas por pessoa ao ano (ibpy), foram detectados mais gametócitos, em comparação a 11% dos portadores do parasito, em uma área exposta de 20 a 50 ibpy (DRAKELEY *et al.*, 2005; MWANGI *et al.*, 2005).

Na Tanzânia, a prevalência de gametócitos foi 17% entre os portadores do parasito, expostos a aproximadamente 100ibpy (picadas infecciosas por pessoa ao ano), em comparação com 24%, entre os portadores expostos a aproximadamente 1ibpy (DRAKELEY *et al.*, 2005; DRAKELEY *et al.*, 2006).

1.6 Métodos moleculares para detecção de gametócitos

O exame gota espessa tem limitações inerentes ao limite de detecção de plasmódio, aproximadamente 10-20 parasitos/ μ L. Muitas vezes, a microscopia pode

subestimar a prevalência e imprecisão das contagens do parasito, especialmente para gametócitos que durante a infecção malárica, são encontrados na circulação dos pacientes em densidades muito mais baixas e frequentemente situadas em um nível perto ou abaixo da detecção microscópica (DRAKELEY *et al.*, 2006).

Métodos moleculares recém-desenvolvidos para a detecção e quantificação de gametócitos, cuja sensibilidade é suficiente para detectar e quantificar gametócitos em densidades muito baixas, permitem estudos sobre a biologia e epidemiologia de gametócitos em infecções naturais (BDEL-WAHAB *et al.*, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2006), e mais importante, trazem contribuições consideráveis à transmissão (SCHNEIDER *et al.*, 2007).

Ferramentas moleculares de detecção de gametócitos são baseadas na amplificação de transcritos de RNAm que são exclusivamente expressos durante as fases do gametócito. RNA é utilizado especificamente para detecção de gametócitos, ao contrário do DNA que carrega a codificação para todos os estágios do parasito (BABIKER; SCHNEIDER, 2008).

A detecção de gametócitos é realizada com base, na transcriptase reversa em reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), desenvolvida para a detecção de transcritos específicos do gene *pfs25* de *P. falciparum* e *pvs25* de *P. vivax*. Quando submetidos à gametocitogênese, os parasitos entram em um período de intensa síntese de RNA e as proteínas de superfície *pfs25* e *pvs25*, são produzidas rapidamente e em grandes quantidades após a ativação do gametócito, no intestino médio do mosquito (VERMEULEN, 1986).

RT-PCR, QT-NASBA (BABIKER; SCHNEIDER, 2008) e RT-LAMP (BUATES *et al.*, 2010) utilizam como alvos principais de métodos para a detecção e a quantificação de gametócitos os transcritos *pfs25* e *pvs25*.

Entre as técnicas moleculares, a RT-PCR apresenta mais sensibilidade e especificidade comparada à QT-NASBA e RT-LAMP. Através da qRT-PCR tanto o gene *pfs25* quanto o *pvs25*, detectam de 1-2 transcritos em tão pouco μL de sangue. A comparação entre as contagens de cópias de qPCR mostra que a expressão *pvs25* é muito mais elevada do que a expressão *pfs25* (BEURSKENS *et al.*, 2009).

1.7 A importância das infecções assintomáticas

Atualmente, estudos que forneçam evidências científicas que possam ser traduzidos em intervenções eficazes para o controle da malária na região estão em voga. Uma hipótese é que as infecções assintomáticas representam uma importante fonte de gametócitos infectantes para o mosquito vetor e por serem prevalentes em regiões endêmicas (ROPER *et al.*, 2000; MENDIS *et al.*, 2009).

Um estudo realizado por ALVES *et al.* (2005) testaram a infectividade de mosquitos entre pacientes sintomáticos e assintomáticos, a fim de verificar a importância desses tipos de infecções para o quadro epidemiológico. Observou-se que, apesar da taxa de infecção obtida no estudo, ser menor entre os mosquitos alimentados com o sangue de indivíduos sem sintomas, os indivíduos assintomáticos foram capazes de infectar mosquitos.

Após invadirem o hospedeiro, os parasitos permanecem em estado de incubação durante um período de uma a duas semanas antes da manifestação da doença (o período varia em função do tipo de *Plasmodium*). Ultrapassado o período de incubação, adquire-se um estado de imunidade clínica, ou seja, o indivíduo não manifesta os sintomas da doença, mas permanece com o parasito circulante. O portador pode manter-se neste estado durante várias semanas e até meses, condição adquirida depois de sucessivas infecções (MALES *et al.*, 2008; LE PORT *et al.*, 2008; COURA *et al.*, 2006).

Em áreas de alta e baixa transmissão de malária, pessoas sofrem picadas infectantes frequentes, observa-se aquisição progressiva de imunidade clínica levando a uma diminuição no número de infecções, à medida que aumenta a idade (BRANCH *et al.*, 2005; LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2009).

Nestas áreas, o maior número de casos de malária acontece em crianças entre 6 meses e 2 anos de idade, infecções com altas parasitemias. A imunidade clínica vai aparecendo nas crianças entre um e quatro anos, ou entre cinco e nove anos, dependendo do nível de endemidade do local (BLOLAND *et al.*, 1999).

A partir dos 14-15 anos, observa-se uma diminuição da parasitemia chegando a níveis indetectáveis pela gota espessa. No entanto, com as técnicas de biologia molecular, tem sido demonstrado que a infecção permanece até a idade adulta (BOTTIUS *et al.*, 1996; ROPER *et al.*, 1996; LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2009).

Não há limitação da infecção assintomática, somente em regiões de alta transmissão, onde a exposição está relacionada com desenvolvimento de imunidade,

mas também tem sido relatada em regiões de baixa transmissão (ROPER *et al.*, 1996; ALVES *et al.*, 2005; CUCUNUBA *et al.*, 2008). O diagnóstico da malária assintomática não é simples, devido à falta de manifestações clínicas e na maioria das vezes os parasitos são imperceptíveis ao microscópico (BOTTIUS *et al.*, 1996).

Vários estudos publicados mostram diferentes metodologias para caracterizar a infecção assintomática para a malária, oferecendo apenas uma ideia imprecisa sobre da infecção (BOWERS *et al.*, 2009; LECCA, 2009).

O uso da técnica da PCR espécie-específica para malária, mais sensível que a microscopia, mostra-se uma ferramenta eficaz para detecção de infecção assintomática dentro de uma população (GRAVENOR *et al.*, 1998; SHOKOPLES *et al.*, 2009).

Na "II Oficina Brasileira sobre a Infecção Plasmodial Assintomática - OBIPA", com o intuito de trabalhar na padronização das diferentes áreas de interesse da infecção assintomática no Brasil, foi mantida a definição de infecção assintomática criada na I OBIPA, a qual é usada até hoje, quanto aos aspectos clínicos: pessoa que após a detecção de parasitemia não teve nenhum sintoma 30 dias antes e até 30 dias depois da coleta da amostra de sangue, sem ter sido tratada com medicamentos antimaláricos no período (LECCA, 2009).

Com muitos portadores assintomáticos contribuindo para a transmissão, a viabilidade e impacto na saúde pública do controle direcionado ao gametócito talvez tenha de ser revisto (DUNYO *et al.*, 2006; SHEKALAGHE *et al.*, 2007). Estratégias de controle destinadas à interrupção do processo de transmissão da malária exigem, portanto, conhecimento sobre os portadores de gametócitos em cada área endêmica.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estimar a prevalência e fatores associados ao carreamento de formas sexuais de *P. falciparum* e *P. vivax* em indivíduos com infecção assintomática e sintomática em uma área endêmica de malária, no município de Manaus, Amazonas.

Objetivos Específicos

- Estimar a prevalência da infecção sintomática e assintomática em humanos por *P. vivax* e *P. falciparum*;
- Verificar fatores de risco associados à gametocitemia e à infecção malárica;
- Relacionar variáveis ao carreamento de gametócitos de *P. vivax* e *P. falciparum*, em infecções assintomáticas;
- Correlacionar o número de cópias total de plasmódio com o número de cópias de gametócitos em *P. vivax* e *P. falciparum*.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal, realizado no período de 12 de agosto a 16 de setembro de 2013, correspondente à alta transmissão de malária, em indivíduos residentes em área endêmica da doença. Este estudo faz parte de um projeto multicêntrico: Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné.

3.2 Área do estudo

O Município de Manaus tem uma população estimada em 1.832.423 habitantes, a maioria delas vivendo na zona periurbana. Nestas áreas as atividades de subsistência estão mais concentradas no setor agropecuário e no extrativismo (IBGE, 2010). Neste município, o intenso processo migratório, aliado à precária vigilância epidemiológica e entomológica, resulta na transmissão ativa de malária nas áreas rurais e periurbanas. A Incidência Parasitária Anual (IPA) no município oscila de baixo a médio risco nas áreas rurais, e entre as zonas periurbanas, varia de sem risco a alto risco (SIVEP-Malária, 2012).

3.3 Local do estudo

O estudo foi realizado em três ramais localizados na zona leste da cidade de Manaus, Amazonas: Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara. Há 4.966 residentes nas três localidades. A ocorrência de malária nessa população é comum, devido ser uma área onde há maior receptividade e vulnerabilidade de transmissão da doença.

Cada localidade conta com um posto de microscopia, onde é realizado o diagnóstico de malária, em período integral. Diariamente os agentes de saúde municipais visitam os moradores através de busca ativa (BA) e busca passiva (BP). Os microscopistas têm a responsabilidade de corar as lâminas fazer a leitura das mesmas e calcular o esquema de tratamento antimalárico. O tratamento é oferecido no próprio posto de saúde ou levado até o domicílio do paciente pelos agentes de saúde, no mesmo dia da coleta.

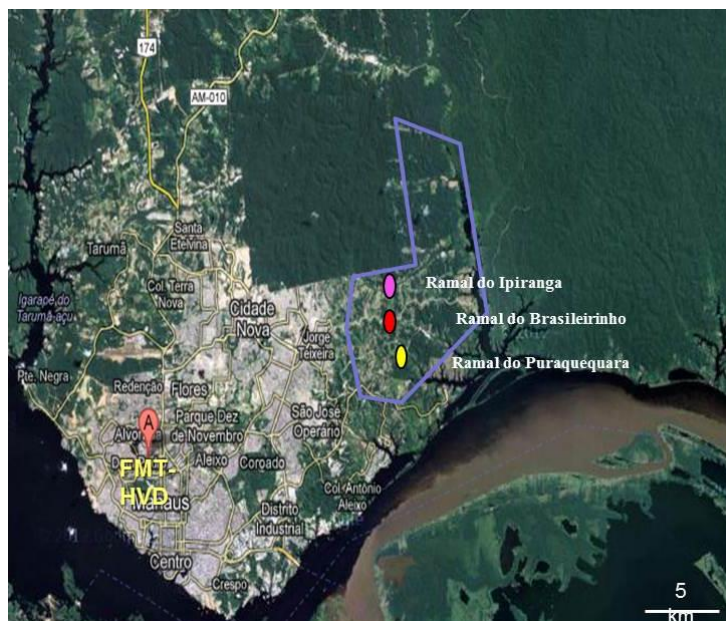


Figura 6: Localização geográfica das localidades do estudo. Fonte: <http://maps.google.com.br>

3.4 População do Estudo

Participaram do corte transversal 2.072 moradores, residentes na área por mais de dois meses e que aceitaram participar assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.5 Visita domiciliar

O corte transversal teve duração de cinco semanas por meio de visita domiciliar diária (Vide anexo POP_MAL_TC_004_v01D_PT). Durante a visita foi aplicado questionário constituído de perguntas sobre característica do participante, medidas preventivas para malária e histórico da doença (Vide anexo POP_MAL_TC_004_A01_v02_PT).

No momento da entrevista foi aferida a temperatura empregando-se o termômetro para verificar a presença de febre ($>37,5$ °C). Um segundo questionário de detecção passiva e o formulário do Sistema de Informações de Vigilância Epidemiológica (SIVEP) foram preenchidos somente dos participantes que apresentaram febre ou outros sintomas clínicos durante a visita.

3.6 Coleta e processamento das amostras

Durante os inquéritos, foram coletadas amostras de sangue para detecção de infecções maláricas independentemente do estado clínico dos indivíduos (busca ativa de infecção malárica). De cada participante foi coletado aproximadamente 300 µL de sangue total, por punção digital utilizando-se lanceta de alto fluxo, utilizando-se EDTA como anticoagulante (Vide anexo POP_MAL_TC_005_v01D_PT). Este volume de sangue foi distribuído em dois microtubos.

No primeiro microtubo foram aliqotados 200µL de sangue total, amostra utilizada para detecção de DNA de *Plamodium spp.* E para conservação do RNA, foram transferidos 50 µL de sangue total para o segundo microtubo contendo 250 µL de RNAProtect (Qiagen[®]) (substância estabilizadora que permite a conservação do RNA a longo prazo), tendo como volume final 300 µL RNA que foi utilizado para detecção e quantificação de gametócitos.

Na mesma ocasião da coleta, o indivíduo que apresentou sinais ou sintomas de malária e temperatura axilar >37,5°C foi confeccionado uma gota espessa (Vide anexo POP_MAL_LB_001_v02_PT) visando o diagnóstico parasitológico da infecção malárica e a quantificação microscópica da parasitemia assexual e da gametocitemia. As lâminas foram encaminhadas ao posto da comunidade para serem lidas no mesmo dia. Quando o diagnóstico foi confirmado positivo para malária os agentes de endemias entregaram o medicamento nas residências dos participantes os quais foram tratados segundo as orientações do ministério da saúde.

As amostras de sangue foram identificadas, mantidas a 4°C e encaminhadas ao laboratório de Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) para serem processadas. No laboratório todas as amostras contendo 200µL de sangue total foram centrifugadas a 4000rpm por 5 minutos. Em seguida 100µL do sobrenadante (plasma) foram separados do *pellet* de glóbulos vermelhos. Todas as amostras foram incluídas no banco de dados e armazenadas no freezer a -80°C até o diagnóstico molecular (Vide anexo POP_MAL_TC_005_v01D_PT).

3.7 Diagnóstico Molecular da Malária

Para diagnóstico confirmatório, da infecção por plasmódio, amostras de DNA foram isoladas a partir do *pellet* celular contendo 200µl de sangue total (formas sexuadas e assexuadas do parasito). A extração do DNA plasmodial foi realizada em placa de 96 poços, utilizando o kit de extração Favor prep 96-well genomic DNA Kit (FAVORGEN®), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações (Vide anexo POP_MAL_LB_018_v01D_PT).

Para a detecção do número de cópias de *P. falciparum* e *P. vivax* foi padronizada uma reação de PCR em Tempo Real baseada no gene que codifica a menor subunidade do RNA ribossômico (rRNA) (DE MONBRISON, *et al.*, 2003). O número mínimo de cópias de genes do parasito de *P. falciparum* é três cópias/µL, no entanto, para *P. vivax* o nível de sensibilidade é maior, uma cópia/µL, ambos detectados através das técnicas molecular qPCR.

Os iniciadores (*primers*) foram usados para amplificação um fragmento gênero-específico e espécie-específica do gene 18S RNAr *Plasmodium spp.* (QMAL), *P. vivax*, *P. falciparum* flanqueiam regiões espécie-específicas de 140pb, 215pb, 220pb respectivamente (ROSANAS-URGELL *et al.*, 2010; WAMPFLER *et al.*, 2013).

Para a detecção da presença do parasito (*Plasmodium spp.*) no sangue humano foi preparada a reação Mastermix QMAL em placa para 96 poços. Na tabela a seguir são apresentados os reagentes e seus volumes (Mix da reação) para a detecção da positividade de plasmódio.

Nas tabelas 1, 2 e 3 são apresentados os reagentes e seus respectivos volumes (Mix da reação) para a detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*.

Tabela 1: Mix da reação para detecção da presença do parasito da malária.

Componente	Concentração final	Quantidade da reação
Gene Expression Mastermix2x	1x	660 μ L
Primer f+r 10 μ M	416 nM	110 μ L
Probe 10 μ M	833 nM	55 μ L
Água		55 μ L
DNA/plasmideo		4 μ L
TOTAL		12μL

Tabela 2: Mix da reação para detecção de amostras positivas de *P. vivax*.

Componente	Concentração final	Quantidade da reação
GeneEx Buffer 2x	1x	6 μ L
Primer f+r 10 μ M	0.833 μ M	1 μ L
Probe 10 μ M	0.417 μ M	0.5 μ L
Água		0.5 μ L
DNA/plasmideo		4 μ L
TOTAL		12μL

Tabela 3: Mix da reação para detecção de amostras positivas de *P. falciparum*.

Componente	Concentração final	Quantidade da reação
Universal Mastermix 2x	1x	6,0 μ L
Primer f+r 10 μ M	600 nM	0,72 μ L
Probe 10 μ M	250 nM	0,3 μ L
Água		0,98 μ L
DNA/plasmideo		4 μ L
TOTAL		12μL

Os *primers* e as sondas a seguir, respectivamente, permitiram a amplificação de um fragmento espécie-específica do gene 18S RNAr em tempo real (KIMURA *et al.*, 1997; ROSANAS-URGELL *et al.*, 2010).

Tabela 4: *Primers* e sondas empregados na amplificação e controles positivos, respectivamente, na detecção de *Plasmódium* e na determinação das espécies de *P. falciparum* e *P. vivax*.

Espécie	Primer	Sequência
<i>Plasmodium</i> <i>spp.</i>	Anterior:	
	QMAL	5'- TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG - 3'
<i>P. falciparum</i>	Reverso:	
	QMAL	5'- TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA - 3'
<i>P. falciparum</i>	Anterior:	
	FALC	5'- GCT TTG TAA TTG GAA TGA TGG GAA T - 3'
<i>P. vivax</i>	Reverso:	
	FALC	5'- ATG CGC ACA AAG TCG ATA CGA AG - 3'
<i>Plasmodium</i> <i>spp.</i>	Anterior:	5'- TAT TGC TTT TGA GAG GTT TTG TTA CTT TG
	VIVAX	- 3'
<i>P. falciparum</i>	Reverso:	
	VIVAX	5'- ACC TCT GAC ATC TGA ATA CGA ATG C - 3'
<i>P. vivax</i>	Anterior:	5'- TAT TGC TTT TGA GAG GTT TTG TTA CTT TG
	VIVAX	- 3'
<i>Plasmodium</i> <i>spp.</i>	QMAL-probe	5'- TCAATTCTTTTAACTTTCTCGCTTGCGCGA BHQ1 - 3'
	FALC-probe	5'- VIC – AGC AAC GCT TCT AGC TTA – MGB – NFQ - 3'
<i>P. falciparum</i>	VIVAX-probe	5'- 6FAM – ACG GGT AGT CAT GAT TGA GTT – MGB – NFQ - 3'
	VIVAX-probe	MGB – NFQ - 3'

Durante a realização das reações, os plasmídeos foram utilizados como controle positivo e para criar uma curva padrão para a quantificação de DNA das amostras. Eles contêm um fragmento do gene que está sendo amplificado. Além disso, permitem comparação da quantidade de DNA das amostras de várias placas.

Considerando-se as concentrações de plasmídeos de 10^6 - 10^2 cópias/ μL , três diluições foram usadas: 10^2 , 10^4 e 10^6 cópias/ μL . As diluições de iniciadores e plasmídeos são preparados com tampão TE (Tris-EDTA). Também foram realizados em placas, três controles negativos (mastermix com água em lugar de DNA) e três vezes cada diluição de controle plasmidial. As amostras foram testadas uma vez em cada experimento.

As soluções contendo os plasmídeos com a sequência alvo foram quantificadas por espectrofotometria e o número de cópias por μL da sequência-alvo foi calculado. Para cada espécie foi construída uma curva padrão de 10 pontos a partir de diluição seriada (fator dediluição: 10) da solução plasmidial. O primeiro ponto corresponde a $1,39 \times 10^9$ cópias da sequência alvo. Na figura 06, é possível visualizar um exemplo dos valores de fluorescência gerados a cada ciclo de amplificação e na figura 07, é possível ver um exemplo de curva-padrão de plasmídeo obtida com os valores da fluorescência.

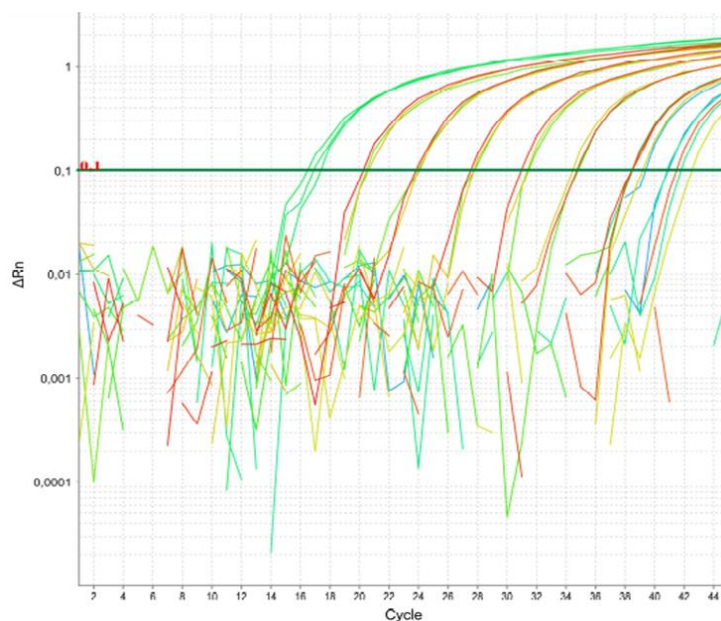


Figura 7 - Exemplo da curva de amplificação de plasmídeo (padrão obtido 10^2 - 10^6 cópias/ μL), obtida em PCR de tempo real, para a quantificação do número de cópias de *P. vivax* e *P. falciparum*.

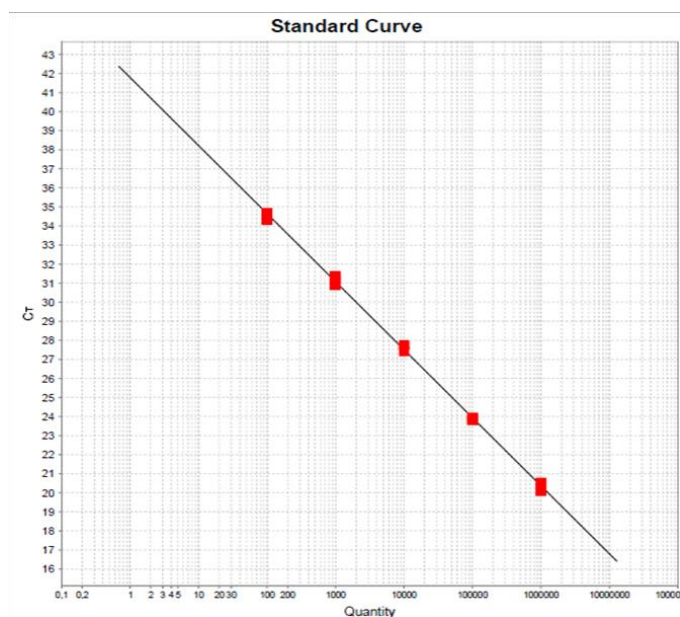


Figura 8: Exemplo de curva-padrão de plasmídeo (padrão obtido 10^2 - 10^6 cópias/ μ L), obtida em PCR de tempo real, para a quantificação do número de cópias de *P. vivax* e *P. falciparum*.

A qPCR foi realizada com o equipamento 7500 Fast Real Time PCR (AppliedBiosystems®) com as seguintes condições de ciclagem, 50°C por 2 minutos, desnaturação a 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 58°C, com aquisição de fluorescência no final de cada etapa de extensão (Vide anexo POP_MAL_LB_021_v01D_PT).

As análises foram realizadas pelo software distribuído pelo fabricante – AppliedBiosystems “7500 Fast System SDS Software”. Os valores do CT dos plasmídeos padrão foram usados para construir uma Curva Padrão, com a qual puderam ser determinados os números de cópias do respectivo gene detectados para cada amostra.

3.8 Detecção de Gametócitos

Foram utilizadas para extração de RNA, amostras contendo 50 μ L de sangue conservadas em 250 μ L de RNAProtect de todos os participantes com diagnóstico molecular positivo para presença de plasmódio. As amostras foram descongeladas e o

RNA das mesmas foi extraído utilizando o Kit comercial *RNeasy Plus 96*, da Qiagen[®], seguindo protocolo especificado pelo fabricante (Vide anexo POP_MAL_LB_019_v01D_PT).

Para a detecção de portadores das formas sexuais do parasito, foi padronizada uma reação de PCR em Tempo Real amplificando o transcrito dos genes alvo expresso somente em gametócitos (WAMPFLER *et al.*, 2013). O número mínimo de cópias do gene *pfs25* para a detecção de gametócitos de *P. falciparum* foi uma copia/ μ L e para o gene *pvs25* o qual detecta gametócitos de *P. vivax* foi 0,5 copia/ μ L.

A síntese de cDNA e amplificação em tempo real foram os dois passos necessários para a realização da qRT-PCR. Plasmídeos foram utilizados como controle positivo e como padrão para quantificação de DNA das amostras. Os protocolos para amplificação de transcritos do gene *pfs25* e *pvs25* foram padronizados tendo como base os métodos descritos por WAMPFLER *et al.*, (2013).

Tabela 5: Mix da reação para detecção de amostras positivas de *pfs25* e *pvs25*.

Componente	Concentração final	Quantidade da reação
1-Step Mix 2x	1x	6 μ l
Primer f+r 10 μ M	10 μ M	1 μ l
Probe 10 μ M	10 μ M	0.5 μ l
Transcriptase reversa		0.3 μ l
Água		0.2 μ l
RNA/plasmídeo		4 μ l
TOTAL		12μl

A tabela à seguir apresenta as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação por PCR dos segmentos de cada um dos genes espécie específica.

Tabela 6: *Primers* e sondas empregados na amplificação e controles positivos, respectivamente, dos transcritos específicos *pfs25* em *P. falciparum* e *Pvs25* em *P. vivax*.

Espécie	Primer/Sondas	Sequência
<i>P. falciparum</i>	Anterior: <i>pfs25</i>	5'- GAA ATC CCG TTT CAT ACG CTT G - 3'
	Reverso: <i>pfs25</i>	5'- AGT TTT AAC AGG ATT GCT TGT ATC TAA - 3'
<i>P. vivax</i>	Anterior: <i>pfs25</i>	5'- ACA CTT GTG TGC TTG ATG TAT GTC - 3'
	Reverso: <i>pfs25</i>	5'- ACT TTG CCA ATA GCA CAT GAG CAA - 3'
<i>P. falciparum</i>	<i>pfs25</i> -probe	5'- HEX – TGT AAG AAT GTA ACT TGT GGT AAC GGT- BHQ1 - 3'
		5'- 6FAM –TGC ATT GTT GAG TAC CTC TCG GAA- BHQ1- 3'
<i>P. vivax</i>	<i>pfs25</i> -probe	TTC GAA- BHQ1- 3'

Para detecção e quantificação de transcritos do gene *pfs25* e *pvs25* foi utilizado o equipamento 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems®) com as seguintes condições de ciclagem, 48°C por 15 minutos, desnaturação a 95 °C por 10 minutos e 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 58 °C, com aquisição de fluorescência no final de cada etapa de extensão (Vide anexo POP_MAL_LB_020_v01D_PT).

As análises foram realizadas pelo software distribuído pelo fabricante – Applied Biosystems “7500 Fast System SDS Software”. Os valores do CT dos plasmídeos padrão são usados para construir uma Curva Padrão, com a qual podem ser determinados os números de cópias do respectivo gene detectados para cada amostra.

3.9 Definição de Caso de Malária

Sintomático:

- participante com um ou mais das seguintes propriedades:

sinais e sintomas no momento da visita;

temperatura > 37,5°C;

febre nas últimas 48 horas;

resultado positivo na lâmina de gota espessa com PCR positivo;

Tratado de acordo com a orientação do Manual de Tratamento da Malária do Ministério da Saúde (2010);

- participante que teve diagnóstico positivo na PCR e não apresentou sinais nem sintomas durante a visita domiciliar, mas desenvolveu malária nos 30 dias após a coleta (dados obtidos através do SIVEP-Malária).

Assintomático:

- Participante sem sinais ou sintomas durante a visita, com resultado positivo na PCR para plasmódio, que não estava em tratamento e sem diagnóstico clínico 30 dias após a coleta (dados obtidos através do SIVEP-Malária).

3.10 Aspectos éticos

Foram explicados em detalhes aos voluntários os objetivos e procedimentos do estudo, assim como seus direitos como participantes em linguagem acessível. Como a maior idade no Brasil é de 18 anos, foi pedido aqueles que tinham 18 anos ou mais e estavam de acordo em participar que assinassem o TCLE (Termo de Consentimento Esclarecido para Adultos).

No caso dos participantes menores de idade, foram explicados o propósito e os procedimentos do estudo aos pais ou tutores legais e lhes pedido a permissão para incluir seu filho no estudo, após, então, foi-lhes solicitado que assinassem o Termo de Consentimento Esclarecido para Menores de Idade. No caso de pessoas analfabetas, foram-lhes pedido um consentimento verbal e a impressão digital sobre o termo após a leitura em linguagem apropriada.

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FMT-HVD (parecer número 51536/2012). Todos os participantes que aceitaram participar do estudo, após a explicação da sua importância e dos seus objetivos, assinaram uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver ANEXO I) e do Termo de Assentimento, para indivíduos de 12 a 17 anos (ver ANEXO II). Para crianças menores, o termo foi assinado pelo seu representante legal.

Todas as informações dos participantes são confidenciais, qualquer paciente que decidisse não participar do estudo foi avaliado pelo pessoal de saúde de campo de

maneira usual, recebendo o tratamento antimalárico padrão fornecido pela Fundação Nacional de Saúde. Um médico da FMT-HVD do estudo se prontificou a atender o participante, caso fosse solicitado.

3.11 Análise dos dados

Foram obtidas as prevalências da infecção malárica e da presença de gametócitos por local, sexo, faixa etária, ocupação, exposição prévia, presença de febre, uso de antimalárico, malária nas últimas duas semanas e medidas preventivas.

A relação de risco entre as variáveis acima citadas com a infecção malárica e com a presença de gametócitos foi realizada pelo teste exato de Fisher. Considerou-se um nível de significância (p) de 0,05.

A correlação entre o número de cópias de transcritos do gene *pvs25* e a densidade de parasitos geral de *P. vivax* foi estimada pela correlação de Pearson, considerando $p > 0,05$. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%. Os testes foram realizados com o auxílio do programa IBM SPSS statistics 20.0.

4 RESULTADOS

4.1 Características epidemiológicas e clínicas

Foram pesquisados 2072 participantes em uma área endêmica do município de Manaus-AM. Os participantes foram distribuídos em três localidades: 1044 (50,39%) no Brasileirinho, 559 (26,98%) no Ipiranga e 469 (22,64%) no Puraquequara. Houve mais participantes do sexo masculino, 1082 (52,22%) e apenas 990 (47,78%) do sexo feminino. 97,3% dos participantes moravam na área endêmica há mais de dois meses.

A idade dos participantes variou entre 0 a 94 anos. Com o aumento da idade variou a proporção de faixas etárias: 250 pessoas tinham menos de cinco anos, 299 entre cinco até 10 anos, 233 entre 11 e 15 anos e 1290 apresentaram-se com idade acima de 15 anos, esta última faixa etária correspondeu a mais da metade da população estudada.

Em relação à ocupação, 527 (25,43%) eram estudantes, 354 (17,08%) donas de casa, 277 (13,37%) dedicados à agricultura ou piscicultura, 255 (12,31%) funcionários, 84 (4,05%) aposentados, 20 (0,97) desempregados e outras atividades somam 550 (26,54%). As características epidemiológicas e clínicas dos participantes estão indicadas na tabela 7.

Entre os participantes que relataram alguma exposição prévia à malária, 503 desenvolveram entre uma a três sequências de infecções, 477 (23,02%) nunca adquiriram malária, 403 entre quatro e 10, 360 mais de 10 infecções e 142 não souberam responder ou não lembraram.

Mais de 97% da população do estudo não desenvolveu malária nas últimas duas semanas, anteriores ao dia da visita. Relato de uso de algum antimalárico 60 dias anteriores à visita, em consequência de um diagnóstico positivo por microscopia, foi referido por 81 (3,91%) participantes. Destes, 74 consumiram cloroquina e primaquina, um somente Coartem, um somente cloroquina e cinco não lembraram o nome do medicamento.

No momento da amostragem, mais de 95% dos participantes não apresentaram febre e em geral eram de boa saúde. Apenas 4,05% tinham febre ($<37,5^{\circ}\text{C}$) ou relato nas últimas 48 horas, aferida ou não.

4.2 Prevalência e fatores associados à infecção por *P. vivax*

A prevalência da infecção por *P. vivax* e os fatores de risco estão indicados na tabela 7. Durante o inquérito realizado em 2072 participantes, 70 amostras foram diagnosticadas como positivas por PCR em tempo real para o número de cópias do gene alvo 18s rRNA de *P. vivax*, os resultados obtidos mostram uma prevalência total de 3,38% de infecção por *P. vivax*.

Foi realizada uma análise de risco (odds ratio por análise univariada) para determinar os fatores associados ao carregamento de *P. vivax*, no total de participantes e em indivíduos assintomáticos (não febris), utilizando as prevalências obtidas pela técnica de qPCR, por sua maior sensibilidade de detecção do parasito.

As categorias ocupação e localidade não apresentaram risco significativo de infecção. A frequência da infecção por gênero foi maior entre os participantes do sexo masculino, 4,62%. Os resultados apontam que as mulheres mostraram-se mais protegidas da infecção por *P. vivax* (OR=0,43; IC95%=0,25-0,72; p=0,001).

Um número maior de casos positivos para *P. vivax* foi mais frequente (4,26%), em participantes com mais de 15 anos de idade. Os resultados apontam que participantes com idade entre cinco a 10 anos mostraram-se mais protegidos de infecção por *P. vivax* (OR=0,31; IC 95% =0,11-0,85; p = 0,023).

Em relação à infecção prévia, os participantes que relataram nunca ter adquirido malária ou adquiriram entre uma e três infecções mostraram-se mais protegidos (OR=0,19; IC 95% =0,07-0,50; p<0,0001), e (OR=0,29; IC 95% =0,11-0,77; p=0,011), respectivamente.

Participantes que relataram casos de malária duas semanas anteriores à data de coleta apresentaram risco de infecção por *P. vivax* (OR=3,07; IC 95%=1,18-7,95; p=0,21). O relato de uso de antimaláricos dois meses antecedentes à coleta e a presença de febre no momento da visita (<37,5°C ou nas últimas 48 horas aferida ou não) também foram fatores de risco para infecção malárica (OR=3,41; IC 95%=1,57-7,37; p<0,0001) e (OR=6,90; IC 95%=3,67-12,99; p<0,0001), respectivamente.

Tabela 7: Número de participantes, prevalências e fatores associados à infecção por *P. vivax*.

Fator	Participantes		qPCR PV		OR (95% IC)	Valor de p**
	N	%	n	%*		
Total	2072	100	70	3,38		
Gênero						
Masculino	1082	52,22	50	4,62	1,00	
Feminino	990	47,78	20	2,02	0,43 (0,25-0,72)	0,001
Faixa etária						
≥ 16 anos	1290	62,26	55	4,26	1,00	
<5 anos	250	12,07	5	2,00	0,46 (0,18-1,16)	0,107
≥5 - <11 anos	299	14,43	4	1,34	0,31 (0,11-0,85)	0,023
≥11 - <16 anos	233	11,25	6	2,58	0,6 (0,25-1,40)	0,235
Ocupação						
Agricultor	277	13,37	13	4,69	1,00	
Funcionário	255	12,31	7	2,75	0,53 (0,23-1,46)	0,243
Dona de casa	354	17,08	14	3,95	0,89 (0,39-1,81)	0,649
Estudante	527	25,43	12	2,28	0,47 (0,21-1,05)	0,066
Aposentado	84	4,05	1	1,19	0,24 (0,03-1,90)	0,203
Desempregado	20	0,97	0	0,00	0	
Outro	555	26,79	23	4,14	0,89 (0,44-1,78)	0,733
Infecção prévia						
>10	477	23,02	24	5,03	1,00	
0	503	24,28	5	0,99	0,19 (0,07-0,50)	<0,001
01-03	403	19,45	14	3,47	0,68 (0,35-1,33)	0,318
04-10	360	17,37	22	6,11	1,23 (0,68-2,23)	0,542
Não informado	329	15,88	5	1,52	0,29 (0,11-0,77)	0,011
Malária prévia						
Não	54	2,61	5	9,26	1,00	
Sim	2018	97,39	65	3,22	3,07 (1,18-7,95)	0,021
Antimalárico recente						
Não	81	3,91	62	76,54	1,00	

Sim	1989	95,99	8	0,40	3,41 (1,57-7,37)	<0,001
Não informado	2	0,1	0	0,00	0	
<hr/>						
Comunidade						
Ipiranga	559	26,98	13	2,33	1,00	
Brasileirinho	1044	50,39	39	3,74	1,63 (0,86-3,08)	0,132
Puraquequara	469	22,64	18	3,84	1,68 (0,81-3,46)	0,162
<hr/>						
Febre						
Sem febre	1988	95,95	56	2,82	1,00	
febre)	84	4,05	14	16,67	6,90 (3,67-12,99)	<0,001

* prevalência por categorias; ** teste exato de Fisher.

4.3 Prevalência e fatores associados ao carregamento de gametócitos de *P. vivax*

A presença da gametocitemia de *P. vivax* foi avaliada pelo método RT-qPCR através do transcrito *pvs25*. A prevalência do carregamento de gametócitos de *P. vivax*, na população geral do estudo foi de 1,74%.

Foi realizada uma análise de risco (odds ratio por análise univariada) para determinar os fatores associados ao carregamento de gametócitos de *P. vivax*, no total de participantes, utilizando as prevalências obtidas pela técnica de RT-qPCR, por sua maior sensibilidade de detecção do parasito. A prevalência do carregamento das formas sexuais de *P. vivax* por RT-qPCR e os fatores de risco estão indicados na tabela 9.

Os principais fatores de risco para presença de gametócitos foram: presença de febre, infecção prévia, uso recente de antimalárico, malária nas últimas duas semanas e localidade. Não houve diferença significativa para o carregamento de gametócitos entre as seguintes categorias: gênero, faixa etária e ocupação.

Em relação à infecção prévia, todos os participantes de idade acima de três anos, apresentaram risco de carrear gametócitos de *P. vivax*. Entre todas as categorias analisadas, a infecção prévia (4-10) apresentou-se como o maior fator de risco para a gametocitemia de *P. vivax* (OR=18,40; IC95%=2,42-193,93; p<0,001).

Participantes que tiveram episódios clínicos de malária duas semanas anteriores a coleta e que fizeram uso recente de antimaláricos apresentaram prevalências de 7,41% e 6,17% no carregamento de gametócitos de *P. vivax*.

A prevalência de gametocitemia de *P. vivax* entre as comunidades do estudo foi maior na comunidade do Puraquequara com 2,35%, seguida da comunidade do

Brasileirinho com 1,34% e 0,89% no Ipiranga. Puraquequara apresentou-se como a localidade de risco para o carregamento de gametócitos de *P. vivax* (OR=2,84; IC 95%=1,08-7,44; p=0,034).

Tabela 8: Prevalência e fatores de risco para o carregamento de gametócitos de *P. vivax* em participantes com infecção por *P. vivax*.

Fator	RT-qPCR		OR (95% IC)	Valor de p**
	n	%*		
Total	34	1,64		
Gênero				
Masculino	23	2,13	1,00	
Feminino	11	1,11	0,52 (0,25-1,08)	0,079
Faixa etária				
≥ 16 anos	26	2,02	1,00	
<5 anos	2	0,80	0,21 (0,09-1,68)	0,297
≥5 - <11 anos	2	0,67	0,33 (0,08-1,41)	0,143
≥11 - <16 anos	4	1,72	0,85 (0,30-2,46)	1,000
Ocupação				
Agricultor	8	2,89	1,00	
Funcionário	2	0,78	0,27 (0,06-1,29)	0,109
Dona de casa	7	1,98	0,68 (0,24-1,90)	0,459
Estudante	8	1,52	0,52 (0,19-1,40)	0,194
Aposentado	0	0,00	0,00	
Desempregado	0	0,00	0,00	
Outro	9	1,64	0,56 (0,21-1,47)	0,237
Infecção prévia				
0	1	0,21	1,00	
1-3	5	0,99	4,78 (0,57-41,06)	0,218
4-10	15	3,72	18,40(2,42-193,93)	<0,001
>10	9	2,50	12,21 (1,54-96,78)	0,003
Sim, mas não souberam informar	0	0,00	10,40 (1,16-93,71)	0,024
Sim, mas desconhecido total	4	2,14	11,06 (1,51-81,10)	0,001

Malária (últimas 2 semanas)				
Não	30	1,49	1,00	
Sim	4	7,41	4,98 (1,80-15,62)	0,011
Antimalárico (últimos 2 meses)				
Não	29	1,46	1,00	
Sim	5	6,17	4,57 (1,72-12,13)	0,009
Comunidade				
Ipiranga	6	1,07	1,00	
Brasileirinho	14	1,34	1,25 (0,48-3,28)	0,646
Puraquequara	14	2,99	2,84 (1,08-7,44)	0,034
Febre				
Não	27	1,36	1,00	
sim (<37.5°C ou últimas 48h)	7	8,33	6,60 (2,79-15,63)	<0,001

*prevalência por categorias; **teste exato de Fisher.

4.4 Prevalência de infecção malárica em assintomáticos e sintomáticos

Dos 70 casos positivos para infecção por *P. vivax* detectados pela qPCR, 47 (67,14%) eram assintomáticos, isto é, os participantes não relataram febre (<37.5°C ou nas últimas 48 horas) e nenhum outro sintoma no momento da coleta, não adquiriram malária 30 dias antes ou após a visita e não fizeram uso de antimalárico 30 dias antes.

Vinte e três (32,86%) participantes foram classificados como sintomáticos. Destes, 14 estavam com febre (<37.5°C ou nas últimas 48 horas) no momento da amostragem ou algum outro sintoma. Em seguida apresentaram diagnóstico positivo pela gota espessa e posteriormente pela qPCR. E nove participantes, após 30 dias, apresentaram estado clínico da doença (consulta através do SIVEP-Malária) e resultado positivo pela qPCR.

4.5 Prevalência da gametocitemia em assintomáticos e sintomáticos

A prevalência de carreadores de gametócitos de *P. vivax* foi maior entre os participantes com infecção assintomática, 21/34 (61,76%). A contribuição relativa de assintomáticos com baixa densidade de parasitos circulantes, provavelmente não

detectados pela busca ativa e busca passiva foi analisada utilizando o número total de gametócitos de *P. vivax*, estimada pela soma do número de transcritos do gene *pvs25*.

Entre os 13/34 (38,24%) participantes portadores de gametócitos em infecções sintomáticas por *P. vivax*, nenhum apresentou febre (<37,5°C ou últimas 48 horas) no momento da coleta, porém todos apresentaram resultado do exame microscópico de gota espessa positivo, confirmada como infecção malárica pelo SIVEP-Malária 30 dias após a coleta. A figura 9 mostra a frequência de infecção por *P. vivax* e da gametocitemia e em indivíduos sintomáticos e assintomáticos, utilizando as técnicas moleculares, qPCR e RT-qPCR.

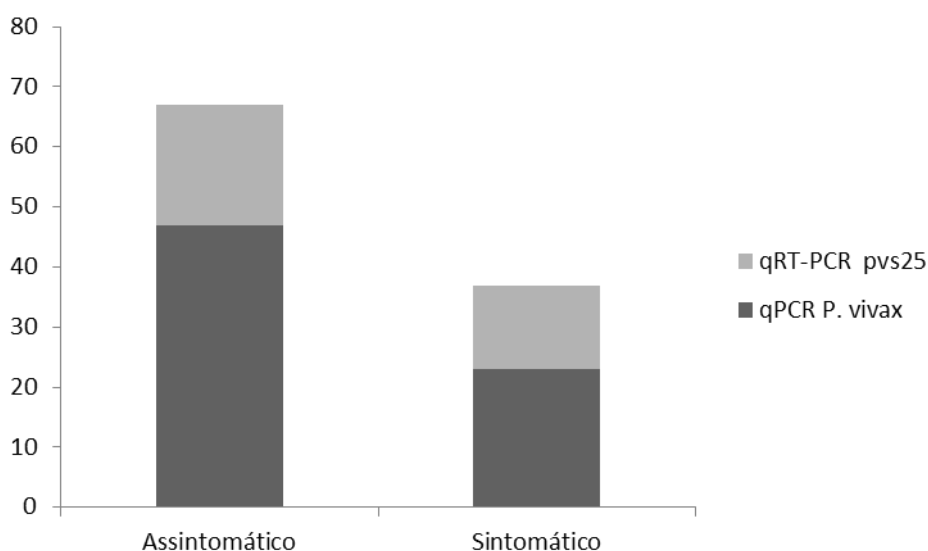


Figura 9: Prevalência da infecção por *P. vivax* e de gametócitos em indivíduos assintomáticos e sintomáticos.

4.6 Fatores associados à infecção assintomática de *P. vivax*

Foi realizada uma análise de risco (odds ratio por análise univariada) para determinar os fatores associados ao carregamento de gametócitos de *P. vivax*, no total de participantes e em indivíduos assintomáticos (não febris), utilizando as prevalências obtidas pela técnica de qRT-PCR, por sua maior sensibilidade de detecção do parasita. Entre as três categorias analisadas na tabela 9, a faixa etária foi a única a apresentar-se como fator de risco para o carregamento de gametócitos de *P. vivax* em indivíduos assintomáticos. Participantes com mais de 15 anos de idade foram mais prevalentes

carreadores de gametócitos de *P. vivax* (90,48%), como também apresentaram mais risco de gametocitemia de *P. vivax* (OR=33,25; IC95%=3,90-283,46; p=0,001).

Tabela 9: Prevalência e fatores de risco dos participantes carreadores de gametócitos de *P. vivax* em infecção assintomática.

Fator	Assintomático		OR (95% IC)	Valor de p
	N	%		
Total	21	61,76		
Gênero				
Feminino	09	42,86	1,00	
Masculino	12	57,14	0,24 (0,04-1,37)	0,109
Faixa etária				
≥11 - <16 anos	02	9,52	1,00	
<5 anos	0	0,00	0,20 (0,00-6,66)	0,368
≥5 - <11 anos	0	0,00	0,20 (0,00-6,66)	0,368
≥ 16 anos	19	90,48	33,25 (3,90-283,46)	0,001
Comunidade				
Ipiranga	05	23,81	1,00	
Brasileirinho	07	33,33	0,20 (0,18-2,18)	0,186
Puraquequara	09	42,86	0,36 (0,32-4,00)	0,405

4.7 Infecção sintomática vs infecção assintomática

A densidade média do número de cópias de transcritos do gene *pvs25* e de cópias de carreadores de *P. vivax* foi maior entre participantes sintomáticos.

No entanto, em indivíduos de idade média de aproximadamente 40 anos, foi observado um número maior de assintomáticos carreadores de gametócitos de *P. vivax*.

Não houve relação estatística significativa quanto ao número de episódios prévios de malária entre os participantes com infecção assintomática e sintomática.

Tabela 10: Comparação entre indivíduos sintomáticos e assintomáticos, através da densidade média do número de cópias de *P. vivax*.

	Estado clínico	Densidade		Valor de p
		n	Média	
cópias de <i>pvs25</i>	assintomático	55	37,62	159,44145
	sintomático	19	1345,61	2603,67759
cópias de <i>P. vivax</i>	assintomático	55	382,37	1614,44805
	sintomático	19	4874,14	8599,33831
idade	assintomático	55	39,46	16,78444
	sintomático	19	23,89	23,96162
malária prévia	assintomático	48	13,42	17,07285
	sintomático	17	12,47	23,90114

4.8 Correlação entre número de cópias de *P. vivax* e de gametócitos

A densidade média do número de cópias/ μ L de *P. vivax* foi maior que os transcritos do gene *pvs25* (tabela 11).

Tabela 11: Densidade média de cópias de *P. vivax* e *pvs25* em amostras positivas por qPCR e qRT-PCR.

Cópias	N	Média	Desvio padrão
<i>pvs25</i>	34	373,45	1421,74
<i>P. vivax</i>	70	1535,66	4905,60

A correlação de Pearson mostrou que o número de cópias de transcritos do gene *pvs25* detectados por RT-qPCR, se correlacionou positivamente com a densidade de parasitos geral estimada pela PCR em tempo real que tem como alvo o gene de rRNA 18S, que quantifica tanto estágios assexuados quanto estágios sexuais do parasito (R= 0,381; p=0,0001). Nesta análise, o aumento da densidade de parasitos de *P. vivax*

permaneceu significativamente associado ao aumento do número de transcritos de gametócitos de *P. vivax*.

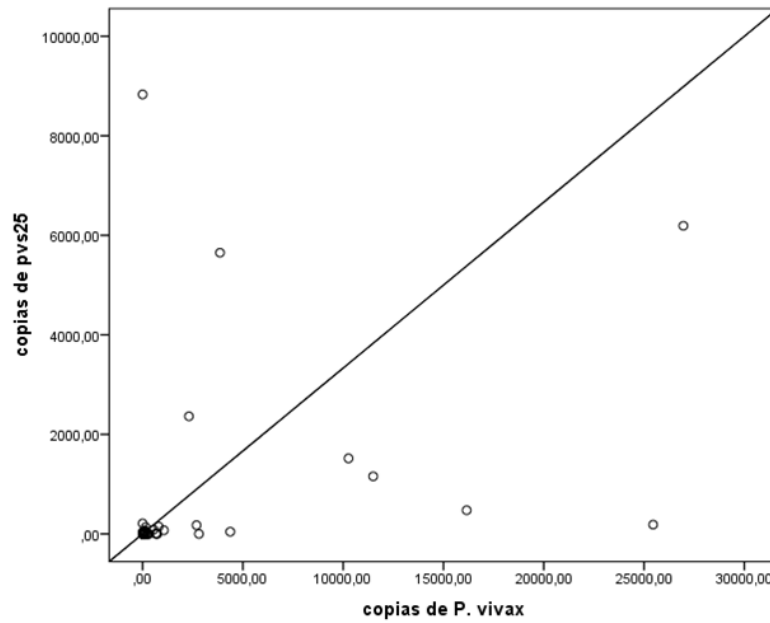


Figura 10: Correlação entre o número de cópias do *P. vivax* e o número de cópias de *pvs25*, detectados por qPCR e RT-qPCR.

5 DISCUSSÃO

5.1 Prevalência da infecção malárica e dos gametócitos

A prevalência de infecção malárica e a identificação dos carreadores de gametócitos em populações de áreas endêmicas são de grande importância para ações de controle da malária, incluindo indivíduos assintomáticos (com baixas parasitemias), os quais contribuem para transmissão da doença. Para isto, foram escolhidas três localidades adjacentes, situadas em área peri-urbana de Manaus-AM, a fim de identificar os portadores de plasmódio e gametócitos, bem como a identificação de fatores associados à infecção malárica e ao carregamento de gametócitos, utilizando as técnicas moleculares para detecção do parasito (qPCR) e de gametócitos (RT-qPCR).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, são raros os estudos realizados sobre a prevalência de gametócitos de *P. vivax* no Brasil, a espécie de plasmódio mais prevalente, o que ainda não permite uma compreensão do perfil do portador de gametócitos de *P. vivax* em uma área endêmica.

A prevalência de infecção por *P. vivax* foi de 3,38% pela qPCR, e do carregamento de gametócitos 1,64%. Esta prevalência foi mais baixa que a encontrada em um estudo anterior, na mesma área endêmica, como também em outros estudos transversais realizados na Amazônia Brasileira, como, por exemplo, os realizados em comunidades ribeirinhas e áreas peri-urbanas da cidade de Porto Velho (próximas ao Rio Madeira, no estado de Rondônia) e Barcelos (em áreas do Rio Negro, no estado do Amazonas) (SUAREZ-MUTIS, 2007, TADA *et al.*, 2007, KATSURAGAWA *et al.*, 2010) e em assentamento rural na Amazônia Brasileira (BARBOSA *et al.*, 2014), demonstrando prevalências de infecção entre 5 e 20%, os quais utilizaram também a PCR como diagnóstico.

No presente estudo, era esperada uma prevalência maior nesse período de seca. Durante esta estação, as infecções maláricas e episódios clínicos são comumente mais frequentes geralmente seguidos de chuvas sazonais e quando os mosquitos são mais abundantes (MOTTA, 1992; TADEI *et al.*, 2003; TADEI *et al.*, 2009). No entanto, mesmo em áreas ou períodos de baixa endemicidade, a população pode ser capaz de manter a infecção e sua transmissibilidade, ainda que os níveis de parasitemia apresentados sejam baixos.

A baixa prevalência encontrada pode ser provavelmente explicada devido à redução progressiva da transmissão nos últimos cinco anos na cidade de Manaus, através de números casos de malária gerados pelo Índice Parasitário Anual - IPA (figura 4). A redução dos casos clínicos na área do estudo pode ser o reflexo das medidas de intervenção do controle da doença, coordenada pela Fundação de Vigilância em Saúde - FVS e executada pelos agentes de saúde do município, especialmente nos locais da endêmica onde o risco de infecção é maior.

De acordo com o relatório anual de gestão da Semsu (RAG-SEMSU, 2012), várias medidas de intervenções foram realizadas a partir de 2011, pelos agentes de saúde do município, durante o período chuvoso, o qual antecede o período de alta transmissão. Entre as medidas de intervenções realizadas estão: distribuição de mosquiteiros impregnados com inseticidas, borrifação intra-domiciliar periódica, termonebulização, busca ativa e busca passiva de casos. Esta última medida também foi realizada pela equipe da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado no ano de 2013, durante a realização de uma coorte.

No presente estudo, observou-se que apesar da baixa prevalência de infecção malárica, foi possível a detecção de gametócitos de *P. vivax* em quase metade de todos os indivíduos infectados pelo parasito, quer sintomáticos ou não, e independentemente da sua carga parasitária.

5.2 Fatores associados ao carreamento de gametócitos

Poucos estudos têm determinado fatores de risco para carreamento de gametócitos de plasmódios. Parasitos provavelmente aperfeiçoam seus investimentos na produção de gametócitos baseado no nível global de transmissão, co-infecção com outras espécies de parasitos, diferentes clones da mesma espécie, densidades de parasitos assexuados, resposta ao tratamento medicamentoso ou reações imunológicas do hospedeiro humano (RAMIRO *et al.*, 2011).

Nossos resultados mostraram que os fatores de risco associados à infecção por *P. vivax* foram: infecção prévia, malária nas últimas duas semanas, uso de antimaláricos nos últimos dois meses, comunidade e presença de febre. Excluindo o item comunidade, todas as outras categorias estão de acordo com um estudo realizado por GOMES DE ALMEIDA (2014) na mesma área endêmica um ano anterior a este corte.

Malária nas últimas duas semanas (OR= 3,07; IC95%= 1,18-7,95) e o uso de antimalárico (OR= 3,41; IC95%= 1,57-7,37) estão associados à presença de gametócitos possivelmente porque estes indivíduos apresentam parasitemia submicroscópica crônica decorrente de recaídas/reinfecções e, apesar das baixas parasitemias, pode ocorrer a formação constante de gametócitos viáveis, permitindo a transmissão do parasito.

Nossos resultados demonstram que as pessoas febris têm seis vezes mais chances de portar gametócitos de *P. vivax*, dentre todos os indivíduos febris nas comunidades (OR= 6,90; IC95%= 3,67-12,99). A presença de febre mostrou ser bom indicador do carreamento de gametócitos nas localidades estudadas, em período de baixa transmissão, apesar das baixas densidades de gametócitos e da maior prevalência de gametocitemia em assintomáticos. Estudo realizado por MCKENZIE *et al.* (2007), em infectados por *P. vivax*, demonstrou que pacientes com febre apresentavam gametócitos e parasitemia superiores aos pacientes sem gametocitemia.

A ocorrência de episódios prévios de malária na maior parte da população estudada deve-se provavelmente a maior exposição destas pessoas a infecção, já que residem em área endêmica; uma justificativa para o maior risco de infecção (OR=18,40; IC95%= 2,42-193,93) nesses indivíduos seria a presença de uma parasitemia residual decorrente de recaídas ou re-infecções, que na maioria das vezes não evoluem para doença clínica devido ao nível de transmissão da área endêmica, imunidade adquirida ao parasito por esta população, fatores genéticos do hospedeiro humano, espécie de parasito prevalente, entre outros, como apontam estudos anteriores na região Amazônica (ALVES *et al.*, 2002; SUAREZ-MUTIS, 2007).

Em relação à correlação, encontramos uma positividade entre o número de cópias de transcritos do gene *pvs25*, detectados por qRT-PCR e a densidade parasitária total (estágios assexuados e estágios sexuais do parasito), por qPCR ($p > 0,0001$). Estes dados são consistentes com um estudo recente realizado na Amazônia, onde também correlacionaram positivamente densidade de gametócitos e densidade parasitária total (LIMA *et al.*, 2012).

5.3 Carreamento dos gametócitos de *P. vivax* em infecções assintomáticas

Estudos de fatores de risco para o desenvolvimento de gametócitos foram realizados quase que exclusivamente com pessoas que visitam um centro de saúde para a malária sintomática com alta parasitemia em *P. falciparum* (BEURSKENS *et al.*,

2009; KUAMSAB *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012). Poucos estudos há sobre os fatores de risco para carregamento de gametócitos em infecções assintomáticas para *P. vivax*.

No presente trabalho foi possível realizar um corte em uma área endêmica, onde os participantes estavam em sua maioria sem sintomas para malária. Entre os participantes com infecção, um pouco mais da metade (61,76%) apresentaram gametócitos em infecções assintomáticas por *P. vivax*, com baixa densidade de número de cópias de *pvs25*.

Provavelmente, se este estudo fosse aplicado pelas estratégias de controle de rotina de malária apresentariam parasitemias subpatentes. Este achado está de acordo com os trabalhos de BOUSEMA *et al.* (2006); DRAKELEY *et al.* (2000) e OUEDRAOGO *et al.* (2007), os quais encontraram gametócitos em indivíduos assintomáticos, embora em densidades mais baixas e verificaram também que de modo geral, a prevalência de gametócitos em indivíduos assintomáticos segue de perto ao de parasitos assexuados, tanto por microscopia quanto por instrumentos de detecção molecular.

DOUGLAS *et al.* (2013), encontraram prevalências maiores em infecções sintomáticas com presença de gametócitos por *P. vivax* 84,3% na Tailândia, e em 66,6 % em Papua, Indonésia. No entanto, na Amazônia brasileira a prevalência parece ser maior entre os assintomáticos portadores de gametócitos. Um estudo realizado em um assentamento agrícola de fronteira conhecido como Remansinho, foi possível observar uma prevalência global de infecções maláricas pelo diagnóstico molecular de 17,8%. Entre as infecções diagnosticadas, observou-se que a maioria (61,9%) dos portadores de gametócitos foi assintomática (LIMA *et al.*, 2012).

No estado do Amazonas, em regiões do Rio Negro, foi demonstrado que a malária assintomática por *P. vivax* e *P. falciparum* está presente, e nestas áreas endêmicas, as infecções assintomáticas seriam de 4-5 vezes mais elevadas do que as sintomáticas e, mostram-se correlacionadas com grupos de idade avançada (ALVES *et al.*, 2002; SUAREZ-MUTIS *et al.*, 2007).

Nossos resultados também mostram uma relação dos gametócitos de *P. vivax* em assintomáticos com participantes acima de 15 anos de idade (OR=33,25; IC95%=3,90-283,46). Infecções assintomáticas não tratadas permitem a circulação de gametócitos potencialmente infectantes por períodos de tempo prolongados (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 2008). Com o avanço da idade estes indivíduos podem

continuar em estado de imunidade clínica e podem manter a transmissão mesmo em baixas densidades de parasitos.

6 CONCLUSÃO

A prevalência da infecção malárica por *P. vivax* foi de 3,38% nas comunidades do estudo, em período de alta transmissão da doença. A prevalência da infecção assintomática correspondeu a 67,14% do total de carreadores de *P. vivax*.

Os principais fatores de risco para a presença de *P. vivax* foram: malária recente, uso recente de antimalárico e presença de febre. O sexo feminino apresentou-se como um fator de proteção para infecção por *P. vivax*, como também, faixa etária e infecção prévia.

A prevalência do carreamento de formas sexuais de *P. vivax* e *P. falciparum*, foi de 1,64% e 0,19%, respectivamente. Quase metade dos infectados por *P. vivax* carregavam gametócitos, sendo estes participantes potenciais transmissores do parasito para o mosquito anofelino.

Os fatores de risco para a gametocitemia de *P. vivax* foram: infecção prévia, malária recente, uso recente de antimalárico, localidade e presença de febre.

A prevalência do carreamento de gametócitos de *P. vivax* e *P. falciparum* em infecções assintomáticas foram 61,76% e 4,29%, respectivamente. As baixas parasitemias e a infecção submicroscópica encontradas demonstraram ser suficientes para manter a transmissão da malária na área do estudo.

A faixa etária acima de 15 anos foi o único fator de risco para carreamento dos gametócitos de *P. vivax* em assintomáticos (OR=33,25; IC95%=3,90-283,46; p=0,001). Este achado pode ser explicado pelo fato de moradores antigos da área terem adquirido imunidade clínica ao *P. vivax*, após sucessivas infecções maláricas ao longo da vida, sendo assim importantes reservatórios de gametócitos. Estes indivíduos podem ser os responsáveis por manter a transmissão da área endêmica, mesmo em baixa prevalência de infecção.

A presença de febre e a prevalência de gametócitos de *P. vivax* em assintomáticos com baixas densidades de parasitos, mostraram-se bons indicadores da manutenção da transmissão da doença em uma área de baixa transmissão.

Houve uma correlação positiva entre o número de cópias de parasitos/transcritos de *18S rRNA* e gametocitemia/transcritos de *pvs25* demonstrada pela RT-qPCR ($R^2=0,381$). Este resultado indica que, quanto maior o número de cópias de parasitos assexuais, maior é a quantidade de gametócitos, indicando que os carreadores de altas parasitemias seriam os mais propensos a transmitir a infecção.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, A.; ABDEL-MUHSIN, A.M.; ALI, E.; SULEIMAN, S.; AHMED, S.; WALLIKER, D. *et al.* Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J Infect Dis.* Jun 15;185(12):1838-42. 2002.
- ALEXANDRE, M.A.; FERREIRA, C.O.; SIQUEIRA A.M.; MAGALHÃES, B.L.; MOURÃO, M.P.G.; LACERDA, M.V.; ALECRIM, M.G.C. Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v.16, p.1611-1614, 2010.
- ALVES, F.P.; DURLACHER, R.R.; MENEZES, M.J.; KREIGER, H.; SILVA, L.H.P.; CAMARGO, E.P. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian populations. *Am J Trop Med Hyg* 66: 641-648. 2002.
- ALVES, F.P.; GIL, L.H.; MARRELLI, M.T.; RIBOLLA, P.E.; CAMARGO, E.P.; DA SILVA, L.H. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol.* Sep;42(5):777-9. 2005.
- AVILA, S.L.M.; FERREIRA, A.W. Malaria diagnosis: a review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29: 431-443, 1996.
- BABIKER, H.A.; SCHNEIDER, P. Application of molecular methods for monitoring transmission stages of malaria parasites. *Biomed Mater.* Sep;3(3):034007. 2008.
- BABIKER, H.A.; SCHNEIDER, P.; REECE, S.E. Gametocytes: insights gained during a decade of molecular monitoring. *Trends Parasitol.* Nov;24(11):525-30. 2008.
- BAKER, D. A., O. Daramola, M. V. McCrossan, J. Harmer, and G. A. Targett. 1994. Subcellular localization of Pfs16, a *Plasmodium falciparum* gametocyte antigen. *Parasitology* 108:129–137.
- BARBOSA, M. G. V.; FÉ, N. F.; MARCIÃO, A. H. R.; SILVA, A. P. T.; MONTEIRO, W. M.; GUERRA, M. V. F. GUERRA, J. A. O. Registro de Culicidae de importância epidemiológica na área rural de Manaus, Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 41(6): 658-663, nov-dez, 2008.
- BARBOSA, S.; GOZZE, A.B.; LIMA, N.F.; BATISTA, C.L.; BASTOS, M. S. NICOLETE, V.C., *et al.* Epidemiology of Disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A Case Study in Rural Amazonia. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014;8(8):e3109. Epub 2014/08/29.
- BEURSKENS, M.; MENS, P.; SCHALLING, H.; SYAFRUDDIN, D.; ASIH, P.B.; *et al.* Quantitative determination of *Plasmodium vivax* gametocytes by real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg* 81: 366-369. 2009.

- BOUSEMA, J. T., *et al.* Increased *Plasmodium falciparum* gametocyte production in mixed infections with *P. malariae*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:442–448. 2008.
- BAKER, D. A. Malaria gametocytogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 172, p. 57-65, 2010.
- BEURSKENS, M.; MENS, P.; SCHALLIG, H.; SYAFRUDDIN, D.; ASIH, P.B.; HERMSEN, R.; *et al.* Quantitative determination of *Plasmodium vivax* gametocytes by real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg.* Aug;81(2):366-9. 2009.
- BARRATA, R.C.B. Malária no Brasil: panorama epidemiológico na última década. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 11 (1), p. 128-136, 1995.
- BALIRRAINE, F. A.; AMENYA, D.; BONIZZONI, M.; MENGE, D.; ZHOU, G.; ZHONG, D.; *et al.* High Prevalence of Asymptomatic *Plasmodium falciparum* Infections in a Highland Area of Western Kenya: a Cohort Study. *J Infect Dis*, 200 (1), 66-74. 2009.
- BDEL-WAHAB, A.; BDEL-MUHSIN, A. M.; ALI, E.; SULEIMAN, S.; AHMED, S.; WALLIKER, D.; BABIKER, H. A. Dynamics of gametocytes among *Plasmodium falciparum* clones in natural infections in an area of highly seasonal transmission. *J. Infect. Dis.*, v. 185, p. 1838-1842, 2002.
- BHARTI, A.R.; CHUQUIYAURI, R.; BROUWER, K.C.; STANCIU, J.; LIN, J.; LLANOS-CUENTAS, A.; *et al.* Experimental infection of the neotropical malaria vector *Anopheles darlingi* by human patient-derived *Plasmodium vivax* in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* Oct;75(4):610-6. 2006.
- BILLKER, O.; LINDO, V.; PANICO, M.; ETIENNE, A.E.; PAXTON, T.; DELL, A.; *et al.* Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*. Mar 19;392(6673):289-92. 1998.
- BLOLAND, P.B.; BORIGA, D.A.; RUEBUSH, T.K.; McCORMICK, J.B.; ROBERTS, J.M.; OLOO, A.J.; HAWLEY, W.; LAL, A.; NANLEN, B.; CAMPBELL, C.C. Longitudinal cohort study of the epidemiology of malaria infections in an area of intense malaria transmission. II. Descriptive epidemiology of malaria infection and disease among children. *Am J Trop Med Hyg* 60: 641-648. 1999.
- BOTTIUS, E.; GUANZIROLLI, A.; TRAPE, J.F.; ROGIER, C.; KONATE, L.; DRUILLHE, P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jan-Feb;90(1):15-9. 1996.
- BOUDIN, C., J., *et al.* Epidemiology of *Plasmodium falciparum* in a rice field and savanna area in Burkina Faso: seasonal fluctuations of gametocytaemia and malarial infectivity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85:377–385. 1991a.
- BOUDIN, C.J., *et al.* *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* epidemiology in a West African village. *Bull. World Health Organ.* 69:199–205. 1991b.

BOUSEMA, J. T., DRAKELEY, C. J.; SAUERWEIN, R. W. 2006. Sexual-stage antibody responses to *P. falciparum* in endemic populations. *Curr. Mol. Med.* 6:223–229.

BOUSEMA, T.; DRAKELEY, C. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev.* Apr;24(2):377-410, 2011.

BOUSEMA, J.T.; GOUAGNA, L.C.; DRAKELEY, C.J.; MEUTSTEGE, A.M.; OKECH, B.A.; AKIM, I.N.; *et al.* *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J.* Jun 17;3:18. 2004.

BOWERS, K. M.; BELL, D.; CHIODINI, P. L.; BARNWELL, J.; INCARDONA, S.; YEN, S.; LUCHAVEZ, J.; WATT, H. Inter-rater reliability of malaria parasite counts and comparison of methods. *Malar J*, v. 8, p. 267, 2009.

BRANCH, O.L.; CASAPIA, W.M.; GAMBOA, D.V.; HERNANDEZ, J.N.; ALAVA, F.F.; RONCAL, N.; ALVAREZ, E.; PEREZ, E.J.; GOTUZZO, E. Clustered local transmission and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria J* 4: 27-42. 2005.

BRASIL, P.; COSTA, A.P.; PEDRO, R.S.; BRESSAN, C.S.; SILVA, S.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Unexpectedly long incubation period of *Plasmodium vivax* malaria, in the absence of chemoprophylaxis, in patients diagnosed outside the transmission area in Brazil. *Malaria Journal*.10: 122. 2011.

BRASIL. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. Brasília: Ministério da Saúde: 112 p. 2005.

BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. Guia prático de tratamento da malaria no Brasil / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia. – Brasilia : Ministerio da Saude, 2010.

BRASIL. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. Brasília: Ministério da Saúde: 10 p. 2008.

BUATES, S.; BANTUCHAI, S.; SATTABONGKOT, J.; HAN, E. T.; TSUBOI, T.; UDOMSANGPETCH, R.; SIRICHAISINTHOP J.; TAN-ARIYA, P. Development of a reverse transcription-loopmediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Parasitol. Int.*,v. 59, p. 414-420 , 2010.

CARTER, R.G. PM Gametocytes. Edinburgh: Churchill Livingstone; p. 253-306. 1988.

CHANSAMUT, N.; BUATES, S.; TAKHAMPUNYA, R.; UDOMSANGPETCH, R.; BANTUCHAI, S.; SATTABONGKOT, J. Correlation of Pfg377 ortholog gene expression of *Plasmodium vivax* and mosquito infection. *Trop. Med. Int. Health.*,2012.

CLEMENTS, A.N. The biology of mosquitoes, Volume 1: development, nutrition and reproduction.: CABI Publishing, United Kingdom. 511 p. 2000.

COLEMAN, R.E.; KUMPITAK, C.; PONLAWAT, A.; MANEECHAI, N.; PHUNKITCHAR, V.; RACHAPAEW, N.; *et al.* Infectivity of asymptomatic *Plasmodium*-infected human populations to *Anopheles dirus* mosquitoes in western Thailand. *J Med Entomol.* Mar;41(2):201-8. 2004.

COSTA, M. R.; LOPES, S.C.P.; FERREIRA CDE, O.; LACERDA, M. V.; ALECRIM, W. D.; ALECRIM, M. G. Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v. 41, n. 4, p. 381-385, 2008.

COSTA, M. R.; VIEIRA, P. P.; ALBERCHT, L.; ATAÍDE, L.; SIQUEIRA, A.; SOUZA, R.M.; RUSSEL, B.; RENIA, L.; MARINHO, C.R.F.; LACERDA, M. V. On the pathogenesis of *Plasmodium vivax* malaria: Perspectives from the Brazilian field. *Int. J. Parasitol.*, v. 41, n. 4, p. 381-385, 2012.

COURA, J.R. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

COURA, JR.; SUÁREZ-MUTIS, M.C.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection- A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101 (3): 229-237. 2006.

CUCUNUBA, Z.M.; GUERRA, A.P.; RAHIRANT, S.J.; RIVERA, J.A.; CORTES, L.J.; NICHOLLS, R.S. Asymptomatic Plasmodium spp. infection in Tierralta, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Nov;103(7):668-73. 2008.

DANESHVAR, C.; DAVIS, T.M.; COX-SINGH, J.; RAFA'EE, M.Z.; ZAKARIA, S.K.; DIVIS, P.C.; *et al.* Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection. *ClinInfectDis.* Sep15;49(6):852-60. 2009.

DE SOUZA, J. B.; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect*, 4: 291–300. 2002.

DEANE, L. M. Malaria Vectors in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: Supl. 2, 5-14. 1986.

DEANE, L. M.; CAUSEY, O. R.; DEANE, M. P. Notas sobre a distribuição e a biologia dos anofelinos das regiões nordestina e amazônica do Brasil. *Revista Série Especial de Saúde Pública*, 4: 827–966. 1948.

DEANE, L.M.; VERNIN, C.S. & DAMASCENO, R.G. Avaliação das preferências alimentares das fêmeas de *Anopheles darlingi* e *Anopheles aquasalis* em Belém, Pará, por meio de provas de precipitina. *Rev. Serv. Esp. Saúde Públ.*, 2:793-808. 1949.

DRAKELEY, C.C.; SUTHERLAND, J.T.; BOUSEMA, R. W. SAUERWEIN, and TARGETT, G.A. The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. *Trends Parasitol.* 22:424–430. 2006.

EICHNER, M.; DIEBNER, H.H.; MOLINEAUX, L.; COLLINS, W.E.; JEFFERY, G.M.; DIETZ, K. Genesis, sequestration and survival of *Plasmodium falciparum* gametocytes: parameter estimates from fitting a model to malariatherapy data. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Sep-Oct;95(5):497-501, 2001.

FERREIRA, M.U. Controle de casos assintomáticos de malária no Brasil é fundamental, aponta estudo. Matéria28 de fevereiro de 2012 – Portal Administradores. Disponível em <http://www.administradores.com.br/informe-se/cotidiano/controle-de-casos-assintomaticos-de-malaria-no-brasil-e-fundamental-aponta-estudo/52741/> acesso em: 02/06/12.

FERREIRA, M.U.; NUNES, M.S.; WUNDERLICH, G. Antigenic diversity and immune evasion by malaria parasites. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.11, p.987-995, 2004.

FLORENS, L., *et al.* A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 419:520–526. 2002.

FRANKLIN, B.S.; VITORINO, B.L.; COELHO, H.C.; MENEZES-NETO, A.; SANTOS, M.L.; CAMPOS, F.M.; *et al.* Plasma circulating nucleic acids levels increase according to the morbidity of *Plasmodium vivax* malaria. *PLoSOne.*;6(5):e19842. 2011.

GAMAGE-MENDIS, A.C.; RAJAKARUNA, J.; CARTER, R.; MENDIS, K.N. Infectious reservoir of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria in an endemic region of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* Oct;45(4):479-87. 1991.

GOMES DE ALMEIRA, A.C. Prevalência e fatores associados ao carregamento das formas sexuais de *Plasmodium vivax*, em uma área endêmica na Amazônia Brasileira. Dissertação (Mestrado Acadêmico) – Universidade do Estado do Amazonas. Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. Programa de Pósgraduação em Medicina Tropical. XIV. 110f. 2014.

GRAVENOR, M.B.; KWIATKWSKI, D. An analysis of the temperature effects of fever on the intra-host population dynamics of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology.* Aug;117 (Pt 2):97-105. 1998.

GRAVES, P.M.; BURKOT, T.R.; CARTER, R.; CATTANI, J.A.; LAGOG, M.; PARKER, J.; *et al.* Measurement of malarial infectivity of human populations to mosquitoes in the Madang area, Papua, New Guinea. *Parasitology.* Apr;96 (Pt 2):251-63. 1988.

GUERRA, C. A.; HOWES, R. E.; PATIL, A. P.; GETHING, P. W.; VAN BOECKEL, T. P.; TEMPERLEY, W. H.; KABARIA, C. W.; TATEM, A. J.; MANH, B. H.; ELYAZAR, I. R.; BAIRD, J. K.; SNOW, R. W.; HAY, S I. The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 4, p. 774, 2009.

GUERRA, C. A. The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med.*, v. 5, p. 38-50, 2008.

HALLETT, R.L.; DUNYO, S.; ORD, R.; JAWARA, M.; PINDER, M.; RANDALL, A.; *et al.* Chloroquine/sulphadoxine-pyrimethamine for gambian children with malaria: transmission to mosquitoes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin Trials.*;1(3):e15. 2006.

HARRIS, I.; SHARROCK, W.W.; BAIN, L.M.; GRAY, K.A.; BOBAGARE, A.; BOAZ, L.; *et al.* A large proportion of asymptomatic *Plasmodium* infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malar J.*;9:254. 2010.

HAY, S. I.; GETHING, P. W.; ELYAZAR, I. R. F.; MOYES, C. L.; SMITH, D. L.; BATTLE, K. E.; GUERRA, C. A.; PATIL, A. P.; TATEM, A. J.; HOWES, R. E.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; HORBY, P.; WERTHEIM, H. F. L.; PRICE, R. N.; KEVIN-BAIRDI. M. A Long Neglected World Malaria Map: *Plasmodium vivax* Endemicity in 2010. *Plos Neg. Trop. Dis.*,v. 38, p. 231-241, 2012.

HASUGIAN, A.R., *et al.* Dihydroartemisinin-piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria. *Clin. Infect. Dis.* 44:1067–1074. 2007.

HAYWARD, R. E. *Plasmodium falciparum* phosphoenolpyruvate carboxykinase is developmentally regulated in gametocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.*107:227–240. 2000.

HAWKING, F., WILSON, M. E. and GAMMAGE, K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65:549–559. 1971.

HUH, A. J., *et al.* Parasitemia characteristics of *Plasmodium vivax* malaria patients in the Republic of Korea. *J. Korean Med. Sci.* 26:42–46. 2011.

HUH, A.J.; KWAK, Y.G.; KIM, E.S.; LEE, K.S.; YEOM, J.S.; CHO, Y.K.; *et al.* Parasitemia characteristics of *Plasmodium vivax* malaria patients in the Republic of Korea. *J Korean Med Sci.* Jan;26(1):42-6. 2011.

IBGE 2010. Cidades. Disponível em://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1Acesso em: 02/19/2012.

JANSE, C.J., VAN DER KLOOSTERr, P.F., VAN DER PLOEG, M., OVERDULVE, J.P. Rapid repeated DNA replication during microgametogenesis and DNA synthesis in young zygotes of *Plasmodium berghei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 801: 154-157. 1986.

JEFFERY, G. M.; EYLES, D. E. Infectivity to mosquitoes of *Plasmodium falciparum* as related to gametocyte density and duration of infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4:781–789. 1955.

KAPPE, S. H.; KAISER, K.; MATUSCHEWSKI, K. The *Plasmodium* sporozoite journey: a rite of passage. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 135-143, 2003.

Klein, T. A., B. A. Harrison, J. S. Grove, S. V. Dixon, and R. G. Andre. Correlation of survival rates of *Anopheles dirus* A (Diptera: Culicidae) with different infection densities of *Plasmodium cynomolgi*. *Bull. World Health Organ.* 64:901–907. 1986.

KUAMSAB, N.; PUTAPORNTIP, C.; PATTANAWONG, U.; JONGWUTIWES, S. Simultaneous detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* gametocytes in clinical isolates by multiplex-nested RT-PCR. *Malar J* 11: 190. 2012.

KUEHN, A.; PRADEL, G. The coming-out of malaria gametocytes. *J. Biomed. Biotechnol.*, v.97 p.68-74. 2010.

LACERDA, M.V., MOURAO, M.P., ALEXANDRE, M.A., SIQUEIRA, A.M., MAGALHAES, B.M., MARTINEZ-ESPINOSA, F.E., FILHO, F.S., BRASIL, P., VENTURA, A.M., TADA, M.S., COUTO, V.S., SILVA, A.R., SILVA, R.S., ALECRIM, M.G. Understanding the clinical spectrum of complicated *Plasmodium vivax* malaria: a systematic review on the contributions of the Brazilian literature. *Malar. J.* 11, 12. 2012.

LACERDA, M.V., FRAGOSO, S.C., ALECRIM, M.G., ALEXANDRE, M.A., MAGALHAES, B.M., SIQUEIRA, A.M., FERREIRA, L.C., ARAUJO, J.R., MOURAO, M.P., FERRER, M., CASTILLO, P., MARTIN-JAULAR, L., FERNANDEZ-BECERRA, C., DEL PORTILLO, H., ORDÍ, J., ALONSO, P.L., BASSAT, Q. Postmortem characterization of patients with clinical diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria: to what extent does this parasite kill? *Clin. Infect. Dis.* 55, e67–e74. 2012.

LADEIA-ANDRADE, S.; FERREIRA, M.U.; DE CARVALHO, M.E.; CURAD, I. and COURA, JR. Age dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*;80:452-9. 2009.

LAISHRAM, D.D.; SUTTON, P.L.; NANDA, N.; SHARMA, V.L.; SOBTI, R.C.; CARLTON, J.M.; *et al.* The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malar J*;11:29. 2012.

LASONDER, E.; ISHIHAMA, Y.; ANDERSEN, J.S.; VERMUNT, A.M.; PAIN, A.; SAUERWEIN, R.W.; *et al.* Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature.* Oct 3;419(6906):537-42. 2002.

LIMA, N.F.; BASTOS, M.S.; FERREIRA, M.U. *Plasmodium vivax*: Reverse transcriptase real-time PCR for gametocyte detection and quantitation in clinical samples. *Exp. Parasitology* 132:348–354. 2012.

LECCA, R.C.R. Infecção Assintomática Subpatente por *Plasmodium falciparum* no Município do Careiro, Área Endêmica da Amazônia Brasileira. 2009. 112f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical na Área de Clínica das Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

LENSEN, A.; BRIL, A.; VAN DE VEGTE, M.; VAN GEMERT, G.J.; ELING, W.; SAUERWEIN, R. *Plasmodium falciparum*: infectivity of cultured, synchronized gametocytes to mosquitoes. *Exp Parasitol.* Jan;91(1):101-3. 1999.

LE PORT, A.; COT, M.; ETARD, J. GAYE, O.; MIGOT-NABIAS, F.; & GARCIA, A. Relation between *Plasmodium falciparum* asymptomatic infection and malaria attacks in a cohort of Senegalese children. *Malaria Journal*, 7 (193). 2008.

LE ROCH, K. G., *et al.* Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science* 301:1503–1508. 2003.

LOBO, C.A.; KUMAR, N. Sexual differentiation and development in the malaria parasite. *Parasitol Today.* 14(4):146-150. 1998.

LOURENÇO DE OLIVEIRA, R; GUIMARÃES, E.G.G; ARIÉ, M.; SILVA, T.F.; CASTRO, M.G.; MOTTA, M.A.; DEANE, L.M. Anophele species, some of their habitats and relation to malaria in endemic areas of Rondonia state, Amazon region of Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 84:501-514. 1989.

MABUNDA, S.; CASIMIRO, S.L.; ALONSO, P.A country-wide malaria survey in Mozambique. I. *Plasmodium falciparum* infection in children in different epidemiological settings. *Malar. J.*7:216. 2008.

MACHADO, R.L.D.; COUTO, A.A.R.A.; CAVASINI, C.E.; CALVOSA, V.S.P. Malária em região extra-amazônica: situação no estado de Santa Catarina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36 (5): 581-586. 2003.

MALES, S.; GAYE, O.; & GARCIA, A. Long-Term Asymptomatic Carriage of *Plasmodium falciparum* Protects from Malaria Attacks: A Prospective Study among Senegalese Children. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 516-22. 2008.

MARQUES, P. X., *et al.* *Plasmodium* species mixed infections in two areas of Manhica District, Mozambique. *Int. J. Biol. Sci.* 1:96–102. 2005.

MARQUES, A.C.; GUTIERREZ, H.C. Combate à malária no Brasil, evolução, situação atual e perspectivas. *RevSocBrasMed Trop.* (suplemento III): 81-108. 1994.

MAIER, W. A., H. Becker-Feldman, and H. M. Seitz. Pathology of malaria-infected mosquitoes. *Parasitol. Today*3:216–218. 1987.

MAYXAY, M., *et al.* Randomized comparison of chloroquine plus sulfadoxine-pyrimethamine versus artesunate plus mefloquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in the Lao People's Democratic Republic. *Clin. Infect. Dis.* 39:1139–1147. 2004.

MCKENZIE, F. E.; Jeffery, G. M. and COLLINS, W. E. *Plasmodium malariae* infection boosts *Plasmodium falciparum* gametocyte production. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67:411–414. 2002.

MCCUTCHAN, T. F. Is a monkey malaria from Borneo an emerging human disease? *Future Microbiology*, 3(2): 115-118, 2008.

MCKENZIE, F. E., *et al.* Gametocytemia in *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections. *J. Parasitol.* 92:1281–1285. 2006.

MCCOLLUM, A.M.; SOBERON, V.; SALAS, C.J.; SANTALALLA, M.L.; UDHAYAKUMAR, V.; ESCALANTE, A.A.; GRAF, P.C.F.; DURAND, S.; CABEZAS, C.; BACON, D. Genetic variation and recurrent parasitemia in Peruvian *Plasmodium vivax* populations. *Malaria Journal* Feb 24; 13:67. 2014.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 64, p. 97-106, 2001.

MENDIS, K.; RIETVELD, A.; WARSAME, M.; BOSMAN, A.; GREENWOOD, B.; WERNSDORFER, W.H. From malaria control to eradication: the WHO perspective. *Trop. Med. Int. Health.*, v. 14, p. 802–809, 2009.

MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, v.415, p.673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Dados epidemiológicos de malária, por estado: Amazônia Legal, janeiro a dezembro de 2010 e 2011. Secretaria de vigilância em saúde: Sivep-Malária e Datasus, 2012.

MOTTA, E.G.F. Fatores determinantes da situação da malária na Amazônia. 3ª Reunião Nacional dos Pesquisadores em Malária. A pesquisa da malária no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25: 27-28, 1992.

MUTURI, E. J., *et al.* Concomitant infections of *Plasmodium falciparum* and *Wuchereria bancrofti* on the Kenyan coast. *Filaria J.* 5:8. 2006.

MWANGI, T. W.; ROSS, A.; SNOW, R. W. and MARSH, K. Case definitions of clinical malaria under different transmission conditions in Kilifi District, Kenya. *J. Infect. Dis.* 191:1932–1939. 2005.

NACHER, M.; SINGHASIVANON, P.; SILACHAMROON, U.; TREEPRASERTSUK, S.; TOSUKHOWONG, T.; VANNAPHAN, S.; *et al.* Decreased hemoglobin concentrations, hyperparasitemia, and severe malaria are associated with increased *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage. *J Parasitol.* Feb;88(1):97-101. 2002.

NACHER, M.; SILACHAMROON, U.; SINGHASIVANON, P.; WILAIRATANA, P.; PHUMRATANAPRAPIN, W.; FONTANET, A.; *et al.* Risk factors for *Plasmodium vivax* gametocyte carriage in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* Dec;71(6):693-5. 2004.

NGOUNGOU, E. B.; PREUX, P. M. Cerebral malaria and epilepsy. *Epilepsia*, 49: 19-24. 2008.

NJAMA-MEYA, D.; MOSES, R.; KAMYA, M.; & DORSEY, G. Asymptomatic parasitaemia as a risk factor for symptomatic malaria in a cohort of Ugandan children. *Tropical Medicine and International Health* , 9 (8), 862-68. 59. 2004.

OLIVEIRA-FERREIRA, J.; LACERDA, M.V.; BRASIL, P.; LADISLAU, J.L.; TAUIL, P.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J.*;9:115. 2010.

OMS. Organizacao Mundial da Saude. World Malaria Report 2010. Disponivel em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf>. Acesso em: 09 fev 2010.

OUEDRAOGO, A.L.; BOUSEMA, T.; SCHNEIDER, P.; DE VLAS, S.J.; ILBOUDO-SANOOGO, E.; CUZIN-OUATTARA, N.; *et al.* Substantial contribution of submicroscopical *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage to the infectious reservoir in an area of seasonal transmission. *PLoS One.*;4(12):e8410. 2009.

OUEDRAOGO, A.L.; SCHNEIDER, P.; DEKRUIJF, M.; NEBIE, I.; VERHAVE, J.P.; CUZIN-OUATTARA, N.; *et al.* Age-dependent distribution of *Plasmodium falciparum* gametocytes quantified by Pfs25 real-time QT-NASBA in a cross-sectional study in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg.* Apr;76(4):626-30. 2007.

PAGANOTTI, G. M., *et al.* Genetic complexity and gametocyte production of *Plasmodium falciparum* in Fulani and Mossi communities in Burkina Faso. *Parasitology* 132:607–614. 2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Report on the Situation of Malaria in the Americas, 2008. *Pan American Health Organization*, 2009.

PETHLEART, A., *et al.* Infectious reservoir of *Plasmodium* infection in Mae Hong Son Province, north-west Thailand. *Malar. J.* 3:34. 2004.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. Parasitologia médica. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

PIPER, K. P., HAYWARD, R. E.; COX, M. J. and DAY, K. P. Malaria transmission and naturally acquired immunity to PfEMP-1. *Infect. Immun.*67:6369–6374. 1999.

PRADEL, G. Proteins of the malaria parasite sexual stages: expression, function and potential for transmission blocking strategies. *Parasitol.*,v. 134, p. 1911–1929, 2007.

PRICE, R.; NOSTEN, F.; SIMPSON, J.A.; LUXEMBURGER, C.; PHAIPUN, L.; TER KUILE, F.; *et al.* Risk factors for gametocyte carriage in uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* Jun;60(6):1019-23. 1999.

PUKRITTAYAKAMEE, S.; IMWONG, M.; SINGHASIVANON, P.; STEPNIIEWSKA, K.; DAY, N.J.; WHITE, N.J. Effects of different antimalarial drugs

on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* Sep;79(3):378-84. 2008.

PORTES, M.G.; ROSSI, J.C.; NASCIMENTO, J.C.; ZECGER, S.; SILVA, L.A. [Anophelines of Santa Catarina (Diptera: culicidae), Brazil]. *RevSocBrasMed Trop.* Mar-Apr;43(2):156-60. 2010.

PUKRITTAYAKAMEE, S., *et al.* Effects of different antimalarial drugs on gametocyte carriage in *P. vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79:378– 384. 2008.

RAMIRO, R.S.; ALPEDRINHA, J.; CARTER, L.; GARDNER, A.; REECE, S.E. Sex and death: the effects of innate immune factors on the sexual reproduction of malaria parasites. *PLoS Pathog* 7:1001309. 2011.

ROBERT, V.; AWONO-AMBENE, H. P.; LE HESRAN, J. Y. and TRAPE, J. F. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62:210–216. 2000.

ROBERTS, C.H.; ARMSTRONG, M.; ZATYKA, E.; BOADI, S.; WARREN, S.; CHIODINI, P.L.; *et al.* Gametocyte carriage in *Plasmodium falciparum*-infected travellers. *Malar J.* Jan 24;12(1):31. 2013.

ROGIER, C.; TRAPE, J.F. Malaria attacks in children exposed to high transmission: who is protected? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* May-Jun;87(3):245-6. 1993.

ROPER, M.H.; TORRES, R.S.; GOICOCHEA, C.G.; ANDERSEN, E.M.; GUARD, J.S.; CALAMPA, C.; *et al.* The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* Feb;62(2):247-56. 2000.

ROSANAS-URGELL, A.; MUELLER, D.; BETUELA, I.; BARNADAS, C.; IGA, J.; ZIMMERMAN, P.A.; DEL PORTILLO, H.A.; SIBA, P.; MUELLER, I.; FELGER, I. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J.* 9:361. 2010

SAEED, M., *et al.* *Plasmodium falciparum* antigens on the surface of the gametocyte-infected erythrocyte. *PLoS One* 3:e2280. 2008.

SANTOS-CAMPOS, G.; CASTILHO-MARQUES, J.P.; MELO DE LIMA, S.P.; COSTA-JÚNIOR, W.R. Cidade, ambiente e saúde: a avaliação dos casos de malária no município de Coari/AM de 2003-2010. *Revista Geonorte*, Edição Especial, V.2, N.4, p.1384 – 1395. 2012.

SANTOS-CIMINERA, P.D.; ROBERTS. D.R.; ALECRIM, M.G.; COSTA, M.R.F.; QUINNAN, J.R.G.V. Malaria diagnosis and hospitalization trends, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1597-1599, 2007.

SARAIVA, M. G. G.; AMORIM, R. D. S.; MOURA, M. A. S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E.; BARBOSA, M. G. V. Expansão urbana e distribuição no município

de Manaus, estado do Amazonas. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42(5): 515-522. 2009.

SATTABONGKOT, J.; TSUBOI, T.; ZOLLNER, G.E.; SIRICHAISINTHOP, J.; CUI, L. *Plasmodium vivax* transmission: chances for control? *Trends Parasitol.*, v. 20, p. 192–198, 2004.

SATTABONGKOT, J.; MANEECHAI, N.; ROSENBERG, R. *Plasmodium vivax*: gametocyte infectivity of naturally infected Thai adults. *Parasitology*. Feb;102 Pt 1:27-31. 1991.

SCHNEIDER, P.; BOUSEMA, J.T.; GOUAGNA, L.C.; OTIENO, S.; VANDE VEGTE-BOLMER, M.; Omar, S.A.; *et al.* Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg.* Mar;76(3):470-4. 2007.

SCHNEIDER, P.; BOUSEMA, T.; OMAR, S.; GOUAGNA, L.; SAWA, P.; SCHALLIG, H.; *et al.* (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int J Parasitol.* Apr;36(4):403-8. 2006.

SCHNEIDER, P.; *et al.* Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137:35–41. 2004.

SCOPEL, K.K.G.; FONTES, C.J.F.; NUNES, A.C.; HORTA, M.F.; BRAGA, E.M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Tropica*, v.90, nº1, 61-64, mar.2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Brasília: Ministério da Saúde. 112 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) ISBN 85-334-0974-5. 2005.

SEMSA. Secretaria Municipal de Saúde de Manaus. Relatório Anual de Gestão da SEMSA - RAG-SEMSA, 2012.

SHEKALAGHE, S.A.; BOUSEMA, J.T.; KUNEI, K.K.; LUSHINO, P.; MASOKOTO, A.; WOLTERS, L.R.; *et al.* Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania. *Trop Med Int Health.* Apr;12(4):547-53. 2007.

SHOKOPLES, S.E.; NDAO, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; YANOW, S. K. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol*, v. 47, n. 4, p. 975-980, 2009.

SINDEN, R. E.; GILLES, H. M. The malaria parasites, p. 8–35. In D. A. Warrel and H. M. Gilles (ed.), *Essential malariology*, 4th ed. HodderArnold, London, United Kingdom. 2002.

SINDEN, R. E. The cell biology of sexual development in *Plasmodium*. *Parasitology* 86:7–28. 1983.

SIDEN, R. E.; BUTCHER, G. A.; BILLKER, O. and FLECK, S. L. Regulation of infectivity of *Plasmodium* to the mosquito vector. *Adv. Parasitol.* 38:53–117. 1996.

SIDEN, R. E.; and GILLES, H. M. The malaria parasites, p. 8–35. *In* D. A. Warrel and H. M. Gilles (ed.), *Essential malariology*, 4th ed. HodderArnold, London, United Kingdom. 2002.

SIQUEIRA, A.M.; ALEXANDRE, M.A.; MOURAO, M.P.; SANTOS, V.S.; AGAHASHI-MARIE, S.K.; ALECRIM, M.G.; *et al.* Severe rhabdomyolysis caused by *Plasmodium vivax* malaria in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* Aug; 83(2):271-3. 2010.

SIVEP – Serviço de Informação da Vigilância Epidemiológica. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_malaria_mes_notificacao_2008.pdf. Acessado em 14 de setembro de 2012.

SMALLEY, M.E.; SINDEN, R.E. *Plasmodium falciparum* gametocytes: their longevity and infectivity. *Parasitology.* Feb;74(1):1-8. 1977.

SCHNEIDER, P.; BOUSEMA, J. T.; GOUAGNA, L. C.; OTIENO, S.; VAN, D. V.; OMAR, S. A.; SAUERWEIN, R. W. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.76, p. 470-474, 2007.

SCHNEIDER, P.; BOUSEMA, T.; OMAR, S.; GOUAGNA, L.; SAWA, P.; SCHALLIG, H.; SAUERWEIN, R. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int.J.Parasitol.*, v. 36, p. 403-408, 2006.

SHEKALAGHE, S. A., *et al.* Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is common in an area of low and seasonal transmission in Tanzania. *Trop. Med. Int. Health* 12:547–553. 2007.

SUWANABUN, N., *et al.* Development of a method for the in vitro production of *Plasmodium vivax* ookinetes. *J. Parasitol.* 87:928–930. 2001.

SOUZA, JOSÉ MARIA; COUTO, ÁLVARO; AUGUSTO RIBEIRO D ALMEIDA ET AL. *MALÁRIA*. *IN: LEÃO, RAIMUNDO NONATO QUEIRÓZ. Doenças Infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico. Belém: CEJUP. Cap.41, p. 645-669. 1997.*

SOWUNMI, A., *et al.* Activities of amodiaquine, artesunate, and artesunate-amodiaquine against asexual- and sexual-stage parasites in *falciparum* malaria in children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1694–1699. 2007.

SOWUNMI, A., *et al.* Effects of antifolates—co-trimoxazole and pyrimethamine-sulfadoxine—on gametocytes in children with acute, symptomatic, uncomplicated, *Plasmodium falciparum* malaria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100:451–455. 2005.

STEPNIEWSKA, K., *et al.* *Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. *Malar. J.* **7**:249. 2008.

SUAREZ-MUTIS, M.C.; CUERVO, P.; LEORATTI, F.M.; MORAES-AVILA, S.L.; FERREIRA, A.W.; FERNANDES, O.; *et al.* Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* May-Jun; 49(3):159-64. 2007.

TADA, M.S.; MARQUES, R.P.; MESQUITA, E.; DALLA MARTHA, R.C.; R;DRIGUES, J.A.; COSTA, J.D.; *et al.* Urban malaria in the Brazilian Western Amazon Region I: high prevalence of asymptomatic carriers in an urban riverside district is associated with a high level of clinical malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jun;102(3):263-9. 2007.

TALMAN, A. M., *et al.* Influence of chemotherapy on the *Plasmodium* gametocyte sex ratio of mice and humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71:739–744. 2004.

TADEI, W.P; SACARPASSA, V.M; SOUZA, A.C. Estudo das adaptações de anofelinos e outros culicídeos na UHE DE Tucuruí. In: Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, São Paulo. *Ciências e Cultura*, 40:665-665. 1988.

TADEI, W.P.; THATCHER, B.D. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 42(2): 87-94. 2000.

TADEI, W. P. *et al.* Dinâmica de transmissão da malária e espécies de Anopheles da Província Petrolífera do Rio Urucu e áreas do Rio Solimões. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Brasil, v. 38, n. SUPL I, p. 428-428, 2003.

TADEI, W. P.; RODRIGUES, I. B.; SANTOS, J. M. M.; RAFAEL, M. S.; LIMA, C. P.; OLIVEIRA, A.E. M.; PINTO, R. Malária, meio ambiente e mudanças climáticas: A dinâmica ambiental e a transmissão na Amazônia. In: Anais da 61ª Reunião Anual da SBPC, Manaus – AM, 2009.

TALMAN, A. M., O.; DOMARLE, F. E.; MCKENZIE, F.; ARIEY, and ROBERT, V. Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* 3:24. 2004.

TARGETT, G., *et al.* Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J. Infect. Dis.* 183:1254–1259. 2001.

TAYLOR, L. H., and READ, A. F. Why so few transmission stages? Reproductive restraint by malaria parasites. *Parasitol. Today*13:135–140. 1997.

TCHUINKAM, T., *et al.* Experimental infections of *Anopheles gambiae* with *Plasmodium falciparum* of naturally infected gametocyte carriers in Cameroon: factors influencing the infectivity to mosquitoes. *Trop. Med. Parasitol.* 44:271–276. 1993.

VERMEULEN, A. N., *et al.* Characterization of *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens and their biosynthesis in synchronised gametocyte cultures. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**:155–163. 1986.

VINETZ, J.M.; LI, J.; McCUTCHN, T.F.; KASLOW, D.C. *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly.. *N Engl J Med.* Feb 5;338(6):367-71. 1998.

VON SEIDLEIN, L.; DRAKELEY, C.; GREENWOOD, B. WALRAVEN, G. and TARGETT, G. Risk factors for gametocyte carriage in Gambian children. *Am. J.Trop. Med. Hyg.* 65:523–527. 2001.

WESTENBERGER, S. J., *et al.* A systems-based analysis of *Plasmodium vivax* lifecycle transcription from human to mosquito. *PLoS Negl. Trop. Dis.*4:e653. 2010.

WHO – World Health Organization. Comité de Expertos de la OMS en paludismo. 20 años de la Organización Mundial de la Salud. *WHO, Serie de Informes Técnicos.*No. 892. 2000a.

WHO - World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Ten facts on malaria. 2011. Disponible en: <<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>>. Acceso en: 13 Mar 2012.

YOUNG, J.A.; FIVELMAN, Q.L.; BLAIR, P.L.; DE LA VEGA, P.; LE ROCH, K.G.; ZHOU, Y.; *et al.* The *Plasmodium falciparum* sexual development transcriptome: a microarray analysis using ontology-based pattern identification. *Mol Biochem Parasitol.* Sep;143(1):67-79. 2005.

ANEXOS

Anexo I – **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Anexo II – **Termo de Assentimento**

Anexo III - **POP_MAL_LB_001_v02_PT**(Preparo e leitura de lâminas para detecção de *Plasmodium* spp.).

Anexo IV – **POP_MAL_LB_021_v01D_PT** (Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR)).

Anexo V - **POP_MAL_TC_004_v01D_PT** (Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM).

Anexo VI - **POP_MAL_TC_005_v01D_PT** (Procedimento para Coleta de amostras de sangue para Detecção de DNA e RNA de *Plasmodium*, em estudos de campo).

Anexo VII - **POP_MAL_LB_018_v01D_PT** (Procedimento para Extração de DNA em placa, utilizando Favor prep 96-well genomic DNA kit (FAVORGEN)).

Anexo VIII -**POP_MAL_LB_019_v01D_PT** (Procedimento para Extração de RNA em placa utilizando kit RNeasy Plus 96, da Qiagen®).

Anexo IX - **POP_MAL_LB_020_v01D_PT** (Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de RNA de *pfs25* e *pvs25* de plasmódio (qRT-PCR)).

Anexo X - **POP_MAL_TC_004_A01_v02_PT** (Questionário de Corte transversal).



Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) está estudando a malária em algumas pessoas que moram nas Comunidade do Brasileirinho e Ipiranga, em Manaus. Os pesquisadores querem entender melhor como o parasita da malária é transmitido das pessoas para os mosquitos. Quando um mosquito pica uma pessoa com malária os parasitas que estão no sangue desta pessoa passam para o mosquito, e dessa forma o mosquito se torna capaz de passar a malária para outras pessoas, espalhando a doença. Para nos ajudar a entender melhor esse processo, precisamos estudar mais ou menos 2000 pessoas, de todas as idades. Por isso, pedimos que você participe deste estudo.

Este é um estudo sobre transmissão da malária em toda a população das Comunidade do Brasileirinho e Ipiranga, que deve durar por volta de 2 (dois) anos. Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto. Você vai fazer os exames e vai receber o tratamento gratuito de malária se tiver a doença.

Um grupo de pessoas treinadas pela equipe de pesquisadores permanecerá na área do estudo a fim de realizar o diagnóstico de malária de maneira mais rápida. Se você aceitar participar do estudo, será colhida uma amostra de sangue do dedo para realizar uma lâmina para o diagnóstico de malária, para a realização de testes mais específicos e para saber a quantidade de parasitas no sangue, tanto de pessoas com sintomas quanto de pessoas sem sintomas da malária. Portanto, nós queremos sua permissão para testar seu sangue para malária.

Para coletar a amostra de sangue do dedo, você poderá sentir um pouco de dor, mas que deve parar dentro de alguns minutos. Se a limpeza do dedo não for correta, pode haver uma infecção, mas isto é muito raro e se acontecer será acompanhada por nossa equipe de trabalho. Não há outro risco em participar desse estudo. Se ocorrer qualquer dano ou prejuízo à sua saúde em decorrência deste projeto, você terá direito à indenização.

O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a transmissão da malária, para melhorar o seu diagnóstico e tratamento, além de buscar novas formas para o controle dessa doença. Com o diagnóstico e melhor entendimento de como a doença é transmitida, é possível que haja uma diminuição do número de casos de malária na sua comunidade. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que ele possa lhe ajudar. Se você concordar em participar, todas as informações coletadas serão confidenciais. Todo o material será guardado com um número-código, sem colocar seu nome. Seu nome nunca será usado em público. Se em qualquer momento você quiser se retirar do estudo, você poderá

fazer isso, e mesmo assim terá direito ao diagnóstico e ao tratamento da malária, por nossa equipe.

Contatos

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores no Careiro para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com o Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, responsável pelo projeto, na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, em Manaus (Av. Pedro Teixeira, 25) ou pelo telefone (92) 2127 3498. O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado também poderá prestar esclarecimentos ou receber qualquer reclamação a respeito desta pesquisa, em Manaus (Av. Pedro Teixeira, 25) ou pelo telefone (92) 2127 3572. Você ficará com este termo de consentimento assinado e outra cópia será arquivada pelos pesquisadores.

Eu,,
entendi tudo sobre o estudo de “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné” e autorizo a minha participação no estudo.

Nome do menor (se o consentimento for para um menor)

.....

Assinatura do voluntário (ou responsável)

..... Data: / /

Endereço:

Telefone: (...)-.....

Polegar direito

Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário

.....

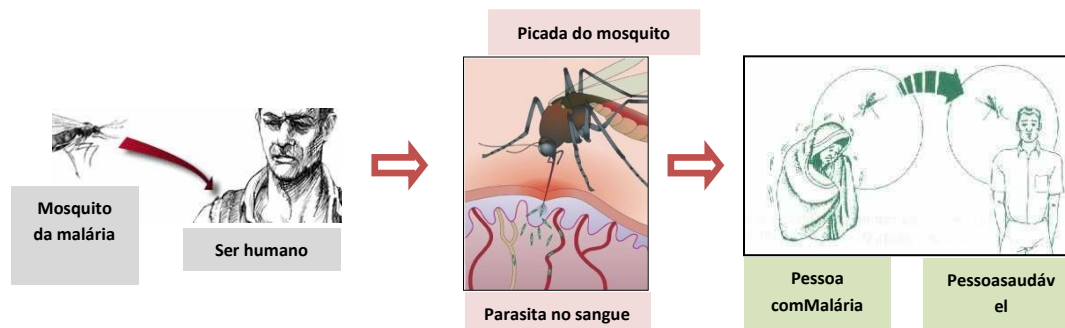
Data: / /



Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné

TERMO DE ASSENTIMENTO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”. Neste estudo queremos entender melhor como o parasita da malária é transmitido das pessoas para os mosquitos. Quando um mosquito pica uma pessoa com malária os parasitas que estão no sangue desta pessoa passam para o mosquito, e dessa forma o mosquito se torna capaz de passar a malária para outras pessoas, espalhando a doença. Para nos ajudar a entender melhor esse processo, precisamos estudar cerca de 2000 pessoas com malária de todas as idades. Por isso pedimos que você participe deste estudo.

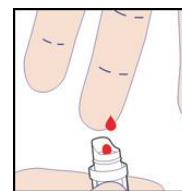


Se você aceitar participar do estudo, será colhida uma amostra de sangue do dedo tanto de pessoas com sintomas quanto de pessoas sem sintomas da malária. Você não vai precisar fazer nada de especial para participar do projeto. Você vai fazer os exames e vai receber o tratamento gratuito de malária se tiver a doença seguindo o protocolo do Ministério da Saúde, aqui na própria comunidade onde você vive. Dessa forma, se você

Coleta de sangue



apresentar sintomas será encaminhado ao Posto de Malária da comunidade. No Posto, será realizado o exame e você receberá o medicamento, como já é feito na rotina. Para coletar a amostra de sangue do dedo você poderá sentir um pouco de dor, mas que deve parar dentro de alguns minutos. Se a limpeza do dedo não for correta, pode haver uma infecção, mas isto é muito raro e se acontecer será acompanhada por nossa equipe de trabalho. O volume de sangue coletado é pequeno e não representa risco para a saúde, mesmo das crianças.



Após a agulha ser retirada, o sangramento será contido com algodão e band-aid. Se a agulha atravessar o vaso, há um risco de sangramento local que pode resultar numa pequena mancha roxa. Entre em contato com os responsáveis do estudo em caso de infecção no dedo onde foi feita a coleta de sangue. Nestes casos, se necessário, você receberá tratamento. A coleta de sangue será feita por pessoa com treinamento e experiência, inclusive com crianças, para diminuir qualquer desconforto. A participação neste estudo não levará a riscos futuros para a saúde. Apesar disso, você tem o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos produzidos pela pesquisa.

Se você concordar, o restante desse material que não foi utilizado nos exames será armazenado na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, na Gerência de Malária, num freezer a -80°C , para estudos futuros sobre a malária. As amostras permanecerão armazenadas por 5 anos. Depois desse período, as amostras não poderão mais ser utilizadas e serão descartadas. Lembramos que estas amostras armazenadas só serão utilizadas no futuro se você concordar e caso o projeto seja aprovado pelo Comitê de Ética.



Portanto, nós queremos sua permissão para testar seu sangue para malária e guardar o sangue que sobrar para poder fazer algum outro estudo no futuro, relacionado à malária. O material deverá ficar guardado sem nenhuma identificação pessoal na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (Hospital Tropical), em Manaus, sob a responsabilidade do Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda. Todo o material será guardado com um código, sem colocar seu nome. Seu nome nunca será usado em público. Se em qualquer momento você quiser sua amostra seja retirada do nosso repositório, seu pedido será atendido.

O principal benefício em participar desse estudo é o recebimento de mais informações sobre a transmissão da malária, para melhorar o seu diagnóstico e tratamento, além de buscar novas formas para o controle dessa doença. Com o diagnóstico e melhor

entendimento de como a doença é transmitida, é possível que haja uma diminuição do número de casos de malária em nossa região. Entretanto, você não receberá nenhum incentivo financeiro. Se tiver algum prejuízo em participar desta pesquisa, converse com um de nossos pesquisadores para que ele possa lhe ajudar. Se em qualquer momento você quiser se retirar do estudo, você poderá fazer isso, e mesmo assim terá direito ao diagnóstico e ao tratamento da malária. Participando do estudo você e seus pais ou responsáveis não precisarão gastar nada com transporte e alimentação, pois todos os procedimentos do estudo, como a aplicação dos questionários e coleta das amostras biológicas, serão feitas na sua casa, em visitas realizadas pela equipe de pesquisa.

Atividades a serem realizadas na visita:



Aplicação de Termo de Consentimento e Questionário



Coleta de Sangue



Contribuição para o estudo

Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador que irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Você não será identificado em nenhuma publicação. Os resultados estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do responsável por você. Este termo de assentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o

consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome do menor (se o consentimento for para um menor)

.....

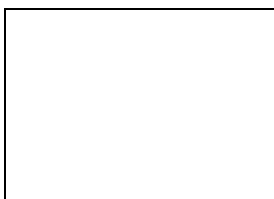
Assinatura do voluntário (ou responsável)

..... Data: / /

Endereço:

Telefone: (....)-.....

Polegar direito



Assinatura do pesquisador que conversou com o voluntário

.....

Data: / /

Contatos

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre esse estudo, procure um de nossos pesquisadores na Comunidade para que eles possam tirar sua dúvida. Você poderá também fazer contato com:

CEP- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (HOSPITAL TROPICAL)

ENDEREÇO: AV. PEDRO TEIXEIRA, 25, BAIRRO DOM PEDRO, MANAUS (AM)

FONE: (92) 2127 3572

ATENDIMENTO PRESENCIAL OU POR TELEFONE DE SEGUNDA À SEXTA FEIRA, DAS 9 ÀS 14 HORAS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

ENDEREÇO: GERÊNCIA DE MALÁRIA DA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO (HOSPITAL TROPICAL), AV. PEDRO TEIXEIRA, 25, BAIRRO DOM PEDRO, MANAUS (AM)

ATENDIMENTO PRESENCIAL DE SEGUNDA À SEXTA FEIRA, DAS 8 ÀS 12 HORAS E DAS 14 ÀS 18 HORAS

FONE: (92) 9114 7633 (QUALQUER DIA E HORÁRIO)

Código POP	POP_MAL_LB_001_v02_PT		
Título	Preparo e leitura de lâminas para detecção de <i>Plasmodium</i> spp.		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: André M. Siqueira; Camila Menezes Anne Cristine Gomes de Almeida	Revisado por: Gisely Cardoso de melo	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

POP_MAL_LB_001_v02_PT



Procedimento Operacional Padrão

Gerência de Malária

BILL & MELINDA
GATES foundation

Emenda	Razão da emenda
V02	Inserção do Logotipo da FMT-HVD e da Fundação Bill e Melinda Gates; Inserção do projeto "Epidemiologia comparativa da transmissão de <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>P. vivax</i> no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné" na aplicabilidade do POP e em POPs relacionados.

1. OBJETIVOS

Descrever os procedimentos para preparo, coloração, leitura e registro de resultado de lâminas para detecção de *Plasmodium* spp. utilizando gota espessa.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

Todas as lâminas coletadas para detecção de *Plasmodium* spp. durante o estudos PregVAX, “Epidemiologia da Malária no Município do Careiro, Amazonas”, “Caracterização Clínica da Malária Complicada por *Plasmodium vivax*” e “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”.

4. RESPONSABILIDADES

Pessoal encarregado da coleta das amostras, técnicos e microscopistas, chefia do laboratório.

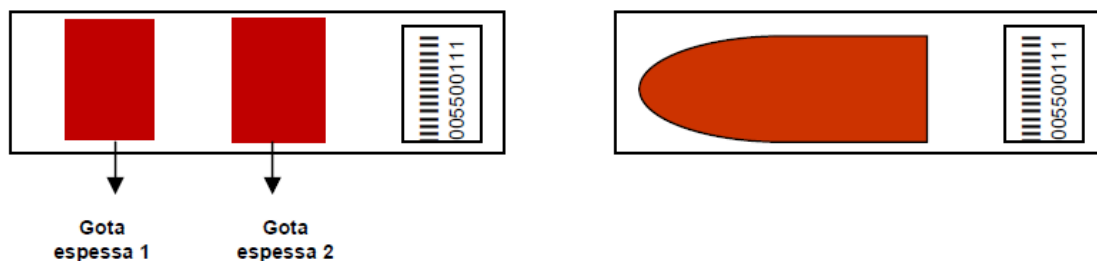
5. POP'S RELACIONADOS

- Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia da Malária no Município do Careiro, Amazonas” (versão atual do POP_MAL_TC_002);
- Triagem e seguimento dos pacientes no estudo de malária grave por *Plasmodium vivax* (versão atual do POP_MAL_HO_001);
- Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Coleta e identificação das amostras

- A depender do protocolo do estudo, em cada local (campo, unidade básica de saúde ou hospital) serão coletadas:
 - duas gotas espessas por indivíduo; ou
 - quatro lâminas por pessoa - duas com duas gotas espessas na mesma lâmina e duas com esfregaço.
- Após limpar a polpa do dedo anelar com algodão embebido em álcool a 70%. Fazer a punção digital com lanceta estéril. Comprimir o dedo suavemente;
- Duas gotas espessas serão preparadas na mesma lâmina, alternativamente a uma gota espessa e um esfregaço. Confeccionar uma gota espessa homogênea de 1,5 x 1,0 cm na lâmina de vidro;
- Uma etiqueta de identificação, contendo código de barras e números únicos, será colada na margem da lâmina, como segue:



- Os três formulários seguintes serão preenchidos no momento da coleta da lâmina no hospital, na unidade básica de saúde ou no campo:

- Uma Ficha de amostras de laboratório;
 - ✓ Cada estudo tem uma diferente Ficha de amostras de laboratório, onde os tipos de amostras coletadas de cada estudo são especificados;
 - ✓ Uma etiqueta de identificação de amostra será pregada e o nome o número de identificação no estudo de cada paciente será preenchido.
- Um formulário de Resultado da primeira leitura de lâmina (versão atual do POP_MAL_LB_001_A01 ou POP_MAL_LB_001_A03) e de Resultado da segunda leitura de lâmina (versão atual do POP_MAL_LB_001_A02)
 - ✓ Uma etiqueta de identificação será colada em cada formulário, que também será preenchido com nome e número de identificação permanente (NIP) do paciente no estudo, além da data de coleta da lâmina.

6.2 Recepção de amostras no laboratório

- As lâminas serão levadas inicialmente para o laboratório mais próximo ao local da coleta (campo, unidade básica de saúde ou hospital) onde serão devidamente coradas (seção 6.3) e será realizada a leitura rápida.
- Para leitura de densidade parasitária, as lâminas serão enviadas ao laboratório da Gerência de Malária acompanhadas de:
 - Uma Ficha de amostras de laboratório para cada paciente, acompanhada de:
 - Um formulário de Resultado da primeira leitura de lâmina (versão atual do POP_MAL_LB_001_A01 ou POP_MAL_LB_001_A03) e um de Resultado da segunda leitura de lâmina (versão atual do POP_MAL_LB_001_A02) para cada paciente
- Quando as amostras chegarem ao laboratório, a pessoa encarregada da recepção checará se todas as amostras registradas na Ficha de amostras de laboratório foram entregues.
- A Ficha de amostras de laboratório será preenchida no local da coleta em ordem de data.
- Após a recepção, caso não sejam realizada a leitura da densidade parasitária no mesmo momento da chegada, estas serão armazenadas conforme procedimento descrito na seção 8.

6.3 Coloração

6.3.1 Reagentes

Azul de metileno fosfatado
 Solução alcoólica de Giemsa estoque
 Solução alcoólica de Giemsa diluída 1:10
 Água tamponada

6.3.1.1 Preparação

Azul de metileno fosfatado		
Azul de metileno medicinal em pó	${}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$	200mg
Fosfato de sódio monobásico	NaH_2PO_4	600mg
Fosfato de potássio bibásico	K_2HPO_4	200mg

Água destilada	H ₂ O	250mL
Filtrar para retirar as impurezas		

Solução alcoólica de Giemsa estoque		
Corante Giemsa em pó	C ₁₄ H ₁₄ ClN ₃ S	750mg
Álcool metílico PA	CH ₃ OH	65mL
Glicerina PA	CH ₂ (OH)CH(OH)CH ₂ OH	35mL
Agitar bem (várias vezes por dia) em garrafa contendo pérolas de vidro.		
Manter o recipiente tampado em forma de estoque.		
Filtrar quando necessário		

Solução alcoólica de Giemsa diluída 1:10	
Solução alcoólica de Giemsa estoque	1 gota
Água tamponada	1mL

Água tamponada		
Fosfato bibásico de sódio	Na ₂ HPO ₄	6g
Fosfato monobásico de potássio	KH ₂ PO ₄	4g
Misturar em gral de porcelana.		
Diluir 1 g da mistura em 1000 mL de água destilada.		

6.3.1.2 Armazenamento dos reagentes

Os reagentes utilizados nesse procedimento devem ser armazenados em temperatura ambiente.

6.3.2 Procedimento

1ª fase: Desemoglobinização pela solução hipotônica de azul de metileno.

- Aplicar a solução de azul de metileno fosfatado sobre a gota espessa de sangue, por dois segundos.
- Enxaguar a lâmina com água tamponada (sem jato forte).

2ª fase: Coloração pela solução de Giemsa para coloração da gota espessa.

- As lâminas devem ser coradas dentro de 72 horas com uma solução de Giemsa a 10% com água tamponada.
- Colocar a lâmina com o lado da gota voltada para a superfície da placa de coloração.
- Preparar uma solução de Giemsa na proporção de uma gota de corante para 1ml (1 gota) de água tamponada. Homogeneizar
- Aplicar esta solução na placa côncava de coloração, sob a lâmina invertida.
- Deixar corar por 10 minutos.
- Enxaguar com água tamponada (sem jato forte).
- Secar ao calor suave ou sob ventilação.

3ª fase: Coloração do esfregaço método de Giemsa

- Fixar o esfregaço com álcool metílico por um minuto.
- Deixar secar.
- Colocar a lâmina invertida sobre a placa de coloração.
- Despejar a diluição do corante de Giemsa na proporção de uma gota do corante para 1ml de água tamponada.
- Deixar corar por 20 a 30 minutos.
- Enxaguar com jato forte de água tamponada.
- Secar ao calor suave ou sob ventilação.

4ª fase: Montagem das lâminas (no caso de a leitura da densidade parasitária não for realizada no mesmo dia da coloração, realizar a montagem, como segue):

- Pingar duas a três gotas de Entelan[®] em cada lâmina.
- Colocar uma lamínula sobre as gotas.
- Deixar secar sob temperatura ambiente.

6.4 Controle de qualidade da coloração de lâminas

- A solução de Giemsa deve ser controlada antes do uso. Isto é realizado preparando a solução de Giemsa 1:10 que será usada e corando uma lâmina sabidamente positiva. Não deve haver coloração das hemácias.
- Cada nova preparação de Giemsa deve ser submetida a controle de qualidade.
- O tampão de pH deve ser checado utilizando pHmetro ou fita, estando o pH a 7,2. O pH deve ser ajustado se necessário. O tampão deve ser analisado ao menos duas vezes por semana se for preparado em grandes quantidades.

6.5 Leitura

- Antes do início da contagem, o equivalente a 0.25 Ml de sangue (aproximadamente 100 campos utilizando uma ocular de 10X e uma objetiva de 100X) deverá ser examinado para determinar a espécie do parasito e estágios que possam estar presentes.
- Coloque uma gota de óleo de imersão sobre a lamínula.
- Ligue o microscópio. Cheque a presença de ocular de 10X.
- Com o condensador elevado, a lâmina corada é colocada no suporte e a fonte de luz é ajustada visibilizando pela ocular e pela objetiva de 100X.
- Ao mover lentamente a objetiva de imersão, uma camada de óleo será formada entre a lâmina e a lente. O ajuste fino é usado para focar o campo; a lente não deve tocar a lâmina.
- O exame microscópico deve ser sistemático e padronizado. Ele deve iniciar pela extremidade esquerda da lâmina. A leitura é iniciada da periferia do campo e termina no centro. Quando o campo está lido, move-se a lâmina longitudinalmente para examinar os campos adjacentes. Move-se a lâmina verticalmente para que outra fileira/largura seja lida. Há cerca de 100 campos em um eixo de 2 cm da lâmina;

- No início será realizada a leitura rápida das lâminas para guiar o tratamento e, após, será feita a quantificação da densidade parasitária para determinar o resultado final.

6.5.1 Leitura rápida

- As lâminas serão lidas imediatamente após a coleta para guiar o tratamento. Tal leitura será realizada tanto no posto de saúde / hospital, quanto para as lâminas que sejam levadas diretamente para o laboratório.
- A leitura rápida será realizada conforme a prática padrão em cada centro.
- Os resultados da leitura rápida serão transcritos no formulário apropriado de cada estudo (versões atuais de POP_MAL_TC_002_A01, POP_MAL_TC_002_A02, POP_MAL_HO_002_A01, POP_MAL_HO_002_A02).

6.5.2 Leitura da densidade parasitária: parasitos por μL .

- Uma vez coradas, as lâminas serão colocadas em caixas e distribuídas com o formulário de primeira leitura de lâmina (versão atual de POP_MAL_LB_001_A01 ou POP_MAL_LB_001_A03) ao microscopista que realizará a primeira leitura.
- Para contagem de parasitos e leucócitos separadamente, dois contadores devem ser usados, um para as formas assexuadas do parasito e outro para os leucócitos. Caso detecte-se infecção mista, outro contador deverá ser utilizado para a contagem de formas da outra espécie.
- Determinando uma lâmina como negativa:
 - O microscopista irá ler a lâmina até que 200 campos tenham sido contados.
 - A lâmina apenas será determinada negativa quando nenhum parasito for encontrado em 200 campos.
- Caso sejam vistas formas assexuadas de *Plasmodium* spp:
 - O microscopista contará parasitos até que o número de 500 leucócitos ou 500 parasitos seja alcançado.
 - Caso o microscopista já tenha contado 500 leucócitos ou mais quando o primeiro parasito for visto, a leitura será interrompida.
 - A contagem de parasitos ou leucócitos não será interrompida até que o campo inteiro seja lido.
 - Este método será usado tanto para infecções únicas ou mistas por *Plasmodium*. No segundo caso, os parasitos de cada espécie deverão ser contados separadamente.
 - A contagem parasitária em relação à contagem de leucócitos pode ser convertida a parasitos por μL usando a seguinte fórmula matemática:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de parasitos} \times 8000 / \text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos} = \text{parasitos por } \mu\text{L}$$

- Está fórmula será calculada para cada espécie de parasito encontrada.
 - Caso o número de leucócitos para cada participante seja conhecido (ex: estudo de malária vivax grave), a densidade pode ser calculada mais precisamente com a seguinte fórmula:
- $$\text{N}^{\circ} \text{ de parasitos} \times \text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos} / \text{N}^{\circ} \text{ de leucócitos} = \text{parasitos por } \mu\text{L}$$
- **Contagem de formas sexuais**
 - As lâminas de Gota espessa serão revisadas para quantificação dos gametócitos em 100 leucócitos. A conversão para gametócitos/ μL é realizada por cálculo

simples, utilizando como valor de referência 8000 leucócitos/mm³ ou o número total de leucocitos do paciente (obtido pelo Hemograma).

N° de gametócitos X N° de leucócitos (totais ou 8000) / 100 = gametócitos por μ L

- Este procedimento é semelhante aos métodos diagnósticos preconizados pelas diretrizes do CLSI do CDC (contagem superior a 500 parasitos ou 1000 leucócitos) e também similar às diretrizes da OMS (que para densidades < 10 parasitos por 200 leucócitos propõe contar acima de 500 leucócitos, mas que para densidades superiores a 10 parasitos por 200 leucócitos propõe parar a contagem ao atingir 200 leucócitos).
- Após a primeira leitura, as lâminas serão mantidas na mesma ordem na bandeja ou caixa para serem lidas posteriormente por outro microscopista. As lâminas serão entregues conjuntamente com o formulário de segunda leitura de lâmina (versão atual de POP_MAL_LB_001_A02) ao microscopista que realizará a segunda leitura, assegurando-se que não seja a mesma pessoa que realizou a primeira leitura e que esta pessoa não tenha acesso aos resultados no formulário de primeira leitura de lâmina.

6.6 Registro dos resultados

- O microscopista registrará os resultados da leitura em μ L nos formulários de primeira e segunda leitura de lâmina. A primeira seção do formulário, incluindo a etiqueta de identificação da amostra, já haverá sido preenchida no momento da coleta da amostra. A seção de Resultados será preenchida pelo microscopista com a seguinte informação:
 - Caso a lâmina for negativa, o número de campos examinados será registrado (deve ser 200) e o número de parasitos deverá ser 0 para todas as espécies.
 - Caso a lâmina for positiva, o número de leucócitos contados e o número de formas assexuadas de parasitos contados para cada espécie deverão ser registrados.
 - O número de gametócitos para cada espécie também deverá ser registrado.
 - Caso a lâmina não possa ser lida, o motivo deverá ser registrado (não encontrada, quebrada, má qualidade).
 - O microscopista assinará e datará o formulário com a data da leitura e registrará seu código do estudo.
 - O microscopista que realizar a primeira leitura registrará os resultados no formulário de primeira leitura de lâmina (versão atual de POP_MAL_LB_001_A01 ou POP_MAL_LB_001_A03) e o que realizar a segunda leitura registrará os resultados no formulário de segunda leitura de lâmina (versão atual de POP_MAL_LB_001_A02).
 - Os formulários Resultado de primeira leitura e Resultado de segunda leitura serão enviados diariamente ao centro de registro de dados para serem inseridos.

7. CÁLCULO DA DENSIDADE PARASITÁRIA E CONTROLE DE QUALIDADE INTERNA

- Todas as lâminas serão lidas duas vezes independentemente e os resultados registrados em diferentes formulários de resultados de leitura de lâmina (primeira e segunda leituras), que serão inseridos nas bases de dados.
- As lâminas que NÃO caírem nos seguintes critérios deverão ser lidas uma terceira vez:
 - Ambas as lâminas positivas, tendo ambas as leituras > 400 parasitos por μ L e a proporção de densidades de ambas as leituras (maior contagem / menor contagem) < 2.
 - Ambas as lâminas positivas e uma ou ambas tem contagem < 400 parasitos por μ L e a maior contagem é menos que um log 10 superior à menor contagem.
 - Ambas as lâminas negativas.
- Um programa de computador gerará uma lista com as lâminas que devem ser lidas uma terceira vez, baseado na proporção das densidades das duas primeiras leituras.

No centro de dados o programa produzirá impresso que será a ficha de Resultado de terceira leitura de lâmina e incluirá o número de identificação de amostra, o número de identificação permanente, a posição na caixa e os códigos dos microscopistas que realizaram a primeira e segunda leituras.

- No laboratório a lâmina será retirada da posição na caixa correspondente e será lida a terceira vez por um microscopista.
- O microscopista que realiza a terceira leitura registrará os resultados no impresso, que será então devolvido ao centro de dados e inserido nas bases de dados.
- O resultado definitivo (após a segunda leitura no caso de concordância ou após a terceira leitura caso não haja concordância entre as duas primeiras) será calculado por um programa de computador e levará em conta os seguintes critérios:
 - Caso ambas as leituras sejam negativas, o resultado final será negativo.
 - Caso as duas lâminas sejam positivas e haja concordância, o resultado final será a média geométrica das duas leituras.
 - Caso uma leitura seja positiva e a outra negativa e a terceira leitura seja positiva, o resultado final será a média geométrica das duas densidades positivas. Caso a terceira leitura seja negativa, o resultado final será negativo.
 - Caso as três leituras sejam positivas, o resultado final será a média geométrica das duas leituras com densidades mais próximas.
- Todos os resultados de leituras de lâminas serão armazenados pelos investigadores.

8. ARMAZENAMENTO DAS LÂMINAS

- As lâminas serão levadas a um(a) técnico(a) de laboratório designado(a). Este deverá conferir conjuntamente com o investigador que as trouxe a presença das lâminas e o correto preenchimento dos formulários correspondentes.
- No caso de a lâmina não haver sido montada com o Entelan[®] após a coloração, tal procedimento deverá ser realizado, após a leitura do segundo microscopista para que a lâmina seja armazenada.
- Em seguida as lâminas deverão ser armazenadas nas caixas apropriadas, sendo o local de cada lâmina registrado nos formulários de Resultado de primeira leitura de lâmina e Resultado de segunda leitura de lâmina (versão atual de POP_MAL_LB_001_A01 ou POP_MAL_LB_001_A03 e POP_MAL_LB_001_A02).
- As caixas serão numeradas à medida que forem preenchidas. As datas das lâminas que ocuparem a primeira e a última posição em cada caixa deverão estar escritas no exterior da caixa.
- A partir do registro da posição das lâminas nas caixas, o microscopista retirará as lâminas à medida que realizar as leituras de densidade parasitária.
- O segundo microscopista deverá atentar para o número da caixa e a posição da lâmina detalhados na ficha de Resultado de segunda leitura de lâmina (versão atual de POP_MAL_LB_001_A02) para recolocar a lâmina na posição correta após a leitura.
- Caso uma terceira leitura seja necessária, a lâmina será retirada da caixa e colocada novamente na mesma posição quando a terceira leitura for encerrada.
- As duplicatas das lâminas serão mantidas em uma caixa de lâminas distinta e armazenadas no laboratório, sendo usadas apenas no caso de perda ou quebra da primeira lâmina. As datas das lâminas que ocuparem a primeira e a última posição em cada caixa deverão estar escritas no exterior da caixa.
- As caixas de armazenamento devem ser mantidas num local trancado no laboratório, sob condições apropriadas de temperatura e umidade e protegidas de luz direta.

9. REFERÊNCIAS

- WHO manual for malaria diagnostic in developing countries.
- Diagnoses and management of severe falciparum malaria. WHO/CDS/CPE/SMT/2000.4
- Diagnostic procedures for blood specimens. Diagnostic for Parasitic Diseases, CDC, Atlanta.

- Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde; 2005.

10. REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
Título do Anexo 1: Resultado de primeira leitura de lâmina		POP_MAL_LB_001_A01_v02_PT	
Título do Anexo 2: Resultado de segunda leitura de lâmina		POP_MAL_LB_001_A02_v02_PT	
Título do Anexo 3: Resultado de leitura de lâmina		POP_MAL_LB_001_A03_v02_PT	
NOME DO ANEXO: Resultado de primeira leitura de lâmina		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma) POP_MAL_LB_001_A01_v02_PT	
Novo	Justificativa Acrescida opção "9 (não se aplica)" ao item 9; ajuste do formato de data.	Criado por:	Aprovado por:
Revisão		Data e assinatura	Data e assinatura
Tradução			
NOME DO ANEXO: Resultado de segunda leitura de lâmina		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma) POP_MAL_LB_001_A02_v02_PT	
Novo	Justificativa Acrescida opção "9 (não se aplica)" ao item 9; ajuste do formato de data.	Criado por:	Aprovado por:
Revisão		Data e assinatura	Data e assinatura
Tradução			

POP_MAL_LB_021_v01D_PT



Procedimento Operacional Padrão

Gerência de Malária

BILL & MELINDA
GATES foundation

Emenda	Razão da emenda		
Código POP	POP_MAL_LB_021_v01D_PT		
Título	Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR).		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: Anne Cristine Gomes de Almeida; Andrea Kühn	Revisado por: Gisely Cardoso de Melo.	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento de realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR).

2. DEFINIÇÕES

PCR: a reação em cadeia da polimerase é definida como uma técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde do DNA, usando uma reação enzimática simples, sem um organismo vivo. O limiar de detecção da técnica é muito superior ao da gota espessa (técnica padrão utilizada no diagnóstico rotineiro da malária): cerca de 0,004 parasitos/mL.

PCR Tempo Real (qPCR): Variação da técnica de PCR para detecção de sinal fluorescente permitindo a quantificação de ácidos nucleicos em tempo real, assim como a detecção qualitativa de seqüências de ácidos nucleicos utilizando análises de curvas de dissociação ou por meio de sondas marcadas. Não requer tratamento pós-PCR para visualização do resultado.

Iniciador (primer): uma pequena seqüência de DNA ou RNA a partir da qual pode começar a replicação do DNA.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa clínica;
- Todos os laboratórios e ou grupos de pesquisa que constituem REDIMA (Rede Amazônica da Dinâmica de Infecção Experimental com Malária)

4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização da PCR em tempo real.

5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir da cabeça e/ou tórax dos mosquitos. (versão atual de POP_MAL_LB_004);
- Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004);
- Procedimento para Extração de DNA em placa utilizando Favor prep 96-well genomic DNA kit (FAVORGEN) (versão atual do POP_MAL_LB_018);
- Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen®) (versão atual do POP_MAL_LB_003).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Recursos necessários

6.1.1 Amostra obtida por extração de DNA:

- A partir da cabeça de mosquitos anofelinos, para detecção de esporozoítos;
- A partir de sangue total (formas sexuadas e assexuadas).

6.1.2 Materiais

1. Pipetas automáticas de 10 µL, 100 µL e 1000 µL
2. Ponteiras com filtro para pipetas automáticas
3. Pipeta multicanal 0,5 – 10 µl
4. Multipipetador
5. Ponteiras para multipipetador (1,5 ml)
6. Tubos de 1,5 e 2,0 mL
7. Microplacas de 0,1mL, com 96 poços, para sistema de PCR em Tempo Real
8. Filme óptico para vedar as microplacas

6.1.3 Equipamentos

1. Vortex
2. Centrifuga
3. Sistema de PCR em Tempo Real 7500 Fast Applied Biosystems

6.1.4 Reagentes

Reagente	Armazenamento
TaqMan GeneExpression MasterMix	2-8°C
Sondas (Taqman® Probe)	alíquota usada: 2-8°C; estoque: -20°C
Iniciadores (primers) da reação	alíquota usada: 2-8°C; estoques (100 µM): -20°C
Água MiliQ	Temperatura ambiente

Iniciadores (5' – 3'):

Plasmodium spec. (“QMAL”)

QMAL-for: TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG*

QMAL-rev: TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA

* Oligonucleotídeo contendo oscilação (R=A/G)

Plasmodium vivax

VIVAX-for: GCT TTG TAA TTG GAA TGA TGG GAA T

VIVAX-rev: ATG CGC ACA AAG TCG ATA CGA AG

Plasmodium falciparum

FALC-for: TAT TGC TTT TGA GAG GTT TTG TTA CTT TG

FALC-rev: ACC TCT GAC ATC TGA ATA CGA ATG C

Sondas (5' – 3'):QMAL-probe: **6FAM** – TCA ATT CTT TTA ACT TTC TCG CTT GCG CGA – **BHQ1**VIVAX-probeMGB: **VIC** – AGC AAC GCT TCT AGC TTA – **MGB – NFQ**FALC-probeMGB: **6FAM** – ACG GGT AGT CAT GAT TGA GTT – **MGB – NFQ**Plasmídeos:

Os plasmídeos contêm o fragmento do gene que está amplificado. Três diluições são usadas: 10^2 , 10^4 e 10^6 cópias/ μ l.

As diluições de iniciadores e plasmídeos são preparados com TE *buffer* (comprado).

6.2 PCR em Tempo Real

Para a detecção dos principais parasitos que infectam humanos, foi padronizada uma reação de PCR em Tempo Real baseada no gene que codifica a 18S rRNA (1,3). Os plasmídeos servem como controle positivo e como padrão para quantificação de DNA das amostras. Usando os plasmídeos é possível comparar a quantidade de DNA das amostras de várias placas.

6.2.1 Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

<u>Mastermix QMAL (para 96 poços)</u>			<u>Mastermix <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> (para 96 poços)</u>		
Concentração	1x	110x	Concentração	1x	110x
GeneEx Buffer	2x	6 μ l	GeneEx Buffer	2x	6 μ l
Primer for + rev	10 μ M	1 μ l	Primer for + rev	10 μ M	1 μ l
Probe	10 μ M	0,5 μ l	Probe	10 μ M	0,5 μ l
Aqua MiliQ	-	0,5 μ l	Aqua MiliQ	-	2,5 μ l
Subtotal		8 μ l	subtotal		10 μ l
					1100 μ l
DNA /plasmidos		4 μ l	DNA /plasmidos		2 μ l
TOTAL		12 μ l	TOTAL		12 μ l

Condições de amplificação

Etapa	Temp.	Tempo (min)	Ciclos
1	50°C	2:00	1
2	95°C	10:00	1
3	95°C	0:15	45

	58°C	1:00	
--	------	------	--

Modo de corrida: Standard 7500

- O mastermix é preparado em área apropriada (livre de contaminantes, DNA/RNA); Antes de abrir algum tubo com reagente, vortexar e centrifugar. A distribuição do mastermix e adição de DNA genômico e DNA do plasmídeo deve ser realizada na sala de PCR em Tempo Real. Depois de acrescentar todos os reagentes, centrifugar a placa, limpar a placa e filme óptico.
- Em cada placa é realizado três controles negativos (mastermix sem DNA) e três vezes cada diluição de controle plasmidial.
- As amostras são testadas uma vez em cada experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	10 ²	10 ²	10 ²	N	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	N	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	N

Amostras
 Controle plasmidial
 N Controle negativo

- As análises são realizadas pelo software distribuído pelo fabricante – Applied Biosystems “7500 Fast System SDS Software”, e utiliza-se como ponto de corte o CT determinado na validação de sensibilidade de detecção de *Plasmodium spec.*, *P. falciparum*, *P. vivax* em plasmídeo padrão.
- Os valores do CT dos plasmídeos padrão são usados para construir uma Curva Padrão, com a qual podem ser determinados os números de cópias dos genes para cada amostra.
- Para validar a sensibilidade de detecção de *Plasmodium spec.*, *P. falciparum*, *P. vivax* no plasmídeo padrão, um qPCR é realizado para cada par de iniciadores. As diluições dos plasmídeos são: 10⁻², 10⁻¹, 0,5x10⁻¹, 10⁰, 0,5x10¹, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ cópias/μl são usadas como template. As diluições 10³ – 10⁷ copias/μl são testadas em triplicatas, e diluições de 10⁻² – 10² copias/μl são testadas em quintuplicatas. O CT da última diluição positiva é usada como ponto de corte.

6.3 Restrições e limitações do procedimento

Como se faz a amplificação de DNA, a técnica não permite distinguir as diferentes formas biológicas do parasito (trofozoíto, esquizonte, merozoíto ou gametócito). Existe a possibilidade de contaminação da reação no momento da extração do DNA e no momento do preparo da reação do PCR, devido à sensibilidade de amplificação da técnica.

6.4 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (2).

6.5 Registro dos resultados

O resultado da PCR será preenchido pelo responsável do procedimento em uma planilha específica, indicando resultado por espécie, o motivo em caso de não ter realizado o exame, e a data do resultado.

7 REFERÊNCIAS

1. De Monbrison F, Angei C, Staal A, Kaiser K, Picot S. Simultaneous identification of the four human Plasmodium species and quantification of Plasmodium DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* (2003) 97:387–390.
2. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
3. Rosanas-Urgell A, Mueller D, Betuela I, Barnadas C, Iga J, Zimmerman PA, del Portillo HA, Siba P, Mueller I, Felger I. Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric Plasmodium species in field samples from Papua New Guinea. *Malar J.* (2010) 9:361.

8. REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
NOME DO ANEXO:		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma)	
Novo	Justificativa	Criado por:	Aprovado por:
Revisão			
Tradução		Data e assinatura	Data e assinatura



Procedimento Operacional Padrão

BILL & MELINDA
GATES foundation

Gerência de Malária

Código POP	POP_MAL_TC_004_v01D_PT		
Título	Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de <i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i> no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM.		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: Anne Cristine Gomes de Almeida	Revisado por: Wuelton Marcelo Monteiro	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

Emenda	Razão da emenda

1. OBJETIVOS

Descrever os procedimentos para conduzir o seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, a ser realizado nas Comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/Amazonas.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

Atividades do seguimento.

4. RESPONSABILIDADES

Todo pessoal envolvido na condução do seguimento dos participantes.

5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para Coleta de amostras de sangue para Detecção de DNA e RNA de *Plasmodium*, em estudos de campo (versão atual do POP_MAL_TC_005).

6. PROCEDIMENTOS

O estudo epidemiológico da malária será conduzido nas Comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara (Manaus, Estado do Amazonas). Os participantes do estudo serão seguidos através das seguintes atividades:

- 2 visitas de corte transversal, com espaço de 12 meses entre cada visita;
- Visitas do Estudo de Coorte, mensalmente, durante 48 semanas;
- Detecção passiva de casos.

6.1 Visitas de corte transversal

- Todos os participantes que assinaram o termo de consentimento para entrar no estudo participarão do Corte transversal;
- O corte transversal terá uma duração aproximada de entre 4 e 8 semanas;
- No dia da visita os participantes serão visitados em casa e será preenchido o Questionário de Corte transversal (versão atual do POP_MAL_TC_004_A01), constituído de perguntas sobre identificação do indivíduo participante, além de perguntas sobre a utilização de medidas preventivas para malária e sobre histórico da doença nos participantes.
- Uma amostra de sangue será coletada (segundo versão atual do POP_MAL_TC_005) do participante, para a realização dos seguintes itens:
 - 1 lâmina para gota espessa;
 - 1mL em tubo contendo EDTA, para extração de DNA e RNA;
- Para identificar as lâminas e as amostras, será usada etiqueta com código de barras e numeração correspondente ao participante.
- Os criotubos serão mantidos entre 4-8°C durante o dia;
- As lâminas e o criotubos serão enviados a FMT-HVD, diariamente;
 - As lâminas serão lidas para determinar parasitemia (segundo a versão atual do POP_MAL_LB_001).
 - Os criotubos serão transportados a FMT-HVD em caixa de isopor com gelo, para posterior processamento e armazenamento.
- Caso o paciente apresente algum sintoma de malária no momento da visita de corte transversal, será coletada uma lâmina extra e feita a leitura da mesma no posto de saúde das Comunidades. Se o diagnóstico de Malária for confirmado pela Gota Espessa, o participante será tratado de acordo com as guias nacionais de tratamento antimalárico.

6.2 Visitas do Estudo de Coorte (Cortes transversais mensais)

- O estudo de coorte será feito a partir da data da assinatura do termo de consentimento, com indivíduos selecionados a partir do Corte Transversal;
- A coorte incluirá todos os participantes que receberem a visita domiciliar do agente de busca ativa;
- Os participantes serão seguidos por um total de 48 semanas para que sejam monitoradas as taxas de incidência de malária;
- Os participantes serão investigados quanto à presença de infecção por *Plasmodium* pela detecção ativa de malária a cada 4 semanas;
- Em cada visita, deverá ser preenchido o Questionário de Coorte (Questionário da Coorte 1º visita - versão atual do POP_MAL_TC_004_A02 ou Questionário da Coorte 2º a 12º visita - versão atual do POP_MAL_TC_004_A03) para cada participante;
- Será coletado do participante 1mL de sangue total em tubo contendo EDTA, para extração de DNA e RNA (segundo versão atual do POP_MAL_TC_005)
- Os criotubos serão mantidos entre 4-8°C durante o dia.
- Para identificar as amostras, será usada etiqueta com código de barras e numeração correspondente ao participante;

- As amostras de sangue serão transportadas a FMT-HVD, em caixa de isopor com gelo, para posterior processamento e armazenamento.
- Caso o paciente apresente algum sintoma de malária no momento das visitas de coorte, será coletada uma lâmina e feita a leitura da mesma no posto de saúde das Comunidades. Se o diagnóstico de Malária for confirmado pela Gota Espessa, o participante será tratado de acordo com as guias nacionais de tratamento antimalárico.

6.3 Detecção Passiva de Casos

- A detecção passiva de casos será realizada quando o paciente apresentar algum episódio febril e procurar o posto de saúde das comunidades, entre o período dos cortes mensais (Coorte).
- Ao procurar o posto de saúde, o participante deverá apresentar o seu Cartão de Identificação do estudo (versão atual do POP_MAL_TC_004_A05);
- Deverá ser preenchido o Questionário de Detecção Passiva de Casos (versão atual do POP_MAL_TC_004_A04) para este participante;
- Deverá ser coletado (segundo versão atual do POP_MAL_TC_005):
 - Amostra de sangue para confecção de lâmina de Gota Espessa (leitura feita no Posto de Saúde local);
 - 1mL de sangue total em tubo contendo EDTA, para extração de DNA e RNA;
- Para identificar as amostras, será usada etiqueta com código de barras e numeração correspondente ao participante.
- Os criotubos serão mantidos entre 4-8°C durante o dia;
- Os criotubos serão enviados a FMT-HVD, diariamente, transportados em caixa de isopor com gelo.
- Se o diagnóstico de Malária for confirmado pela Gota Espessa, o participante será tratado de acordo com as guias nacionais de tratamento antimalárico.

7. REFERÊNCIAS

Não se aplica.

8. REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
Anexo 1: Questionário de Corte transversal		POP_MAL_TC_004_A01_v02_PT	
Anexo 2: Questionário da Coorte 1º visita		POP_MAL_TC_004_A02_v01_PT	
Anexo 3: Questionário da Coorte 2º a 12º visita		POP_MAL_TC_004_A03_v01_PT	
Anexo 4: Questionário de Detecção Passiva de Casos		POP_MAL_TC_004_A04_v01_PT	
Anexo 5: Cartão de Identificação do Participante		POP_MAL_TC_004_A05_v01_PT	
NOME DO ANEXO:		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma)	
Novo	<input type="checkbox"/>	Criado por:	Aprovado por:
Revisão	<input type="checkbox"/>		
Tradução	<input type="checkbox"/>		
		Data e assinatura	Data e assinatura

Código POP	POP_MAL_TC_005_v01D_PT		
Título	Procedimento para Coleta de amostras de sangue para Detecção de DNA e RNA de <i>Plasmodium</i> , em estudos de campo.		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: Anne Cristine Gomes de Almeida; Andrea Kühn	Revisado por: Wuelton Marcelo Monteiro	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

POP_MAL_TC_005_v01D_PT

Procedimento Operacional Padrão

BILL & MELINDA
GATES foundation

Gerência de Malária

Emenda	Razão da emenda

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento para coleta de amostras de sangue para Detecção Molecular de DNA e RNA de *Plasmodium*.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

- Pessoal encarregado da coleta das amostras de pesquisa;
- Equipe do laboratório de biologia molecular.

5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de plasmódio (versão atual do POP_MAL_LB_002);
- Procedimento para extração de DNA de *Plasmodium* spp. a partir de sangue total, utilizando o QIAmp DNA kit (Qiagen[®])(versão atual do POP_MAL_LB_003);
- Procedimento para Extração de DNA em placa utilizando Favor prep 96-well genomic DNA kit (FAVORGEN) (versão atual do POP_MAL_LB_018);
- Procedimento para Extração de RNA em placa utilizando kit RNeasy Plus 96, da Qiagen[®] (versão atual do POP_MAL_LB_019);
- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de RNA de *pfs25* e *pvs25* de plasmódio (qRT-PCR) (versão atual do POP_MAL_LB_020).
- Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Recursos necessários

6.1.1 Materiais

1. Tubos microtainer contendo anticoagulante (EDTA/Fluoreto)
2. Lanceta microtainer
3. Papel de filtro
4. Álcool a 70%
5. Algodão
6. Gaze estéril
7. Luvas de látex/ sem pó
8. Sacola para lixo *biohazard*
9. Recipiente perfurocortantes
10. Caixa térmica com gelox
11. Criobox
12. Lâminas
13. Crioetiquetas autocolantes
14. Lápis
15. Esferográfica
16. Marcador de texto permanente
17. Questionário de Corte transversal
18. Pipetas 10-100µl e 20-200µl
19. Ponteiras 20-200µ

6.2 Assepsia do Local da Coleta

- Para coleta de sangue o indivíduo deve estar sentado ou deitado;

- Calçar luvas de látex descartáveis;
- Identificar o tubo ou papel de filtro com o código do indivíduo.
- Deve-se limpar vigorosamente a pele do local de punção (parte lateral do dedo médio ou anelar, ou em lactentes, o dedo grande do pé ou calcanhar) com algodão embebido em álcool a 70%;
 - Nota: não realizar a coleta no dedo mínimo, evitando assim a injúria óssea.
- Deixar secar o local de punção (desinfecção eficiente e prevenção de hemólise).

6.3 Coleta de sangue para extração de DNA/RNA em criotubo

1. Após assepsia, remover a tampa protetora da lanceta microtainer;
2. Posicionar a lanceta contra o local de punção e pressionar. Não retirar a lanceta até que o clique característico seja ouvido;
3. Remover a lanceta e descartar adequadamente;
4. Aplicar pressão intermitente próximo ao local da punção. Manter o braço estendido para baixo até adquirir a quantidade de sangue necessária;
5. Não fazer movimentos semelhantes a “ordenha”, evitando assim a hemólise ou contaminação da amostra por fluido tecidual.
6. Descartar a primeira gota de sangue com gaze estéril;
7. Virar a palma da mão do indivíduo para baixo;
8. Posicionar a boca do tubo microtainer diretamente no local de punção. Aplicar pressão intermitente ao longo do dedo até o sítio puncionado, para melhorar o fluxo de sangue e encher o tubo;
9. Encher o tubo com aproximadamente 250-300 μ l de sangue e fechá-lo firmemente. Homogeneizar bem o conteúdo do tubo (inverter ~20X);
10. Preparar *uma* lâminacom duas gotas espessas. Limpar adequadamente a lâmina extensora com água.
11. Limpar o local puncionado com algodão estéril e, se necessário, pressioná-lo;
12. Guardar o tubo microtainer em Box apropriado, mantido entre 4-8°C;
13. Preencher o diário de campo (código da amostra, data, volume das amostras, observações).

6.4 Coleta de sangue para extração de DNA/RNA em papel de filtro

1. Dever ser utilizado o mesmo procedimento para coleta descrito acima, até o passo 6;
2. Deve-se posicionar o papel de filtro diretamente no local de punção. Aplicar pressão intermitente ao longo do dedo até o sítio puncionado, para melhorar o fluxo de sangue e até obter a quantidade desejada (2 círculos de ~50 μ l) de sangue embebido no papel de filtro;
3. Limpar o local puncionado com algodão estéril e, se necessário, pressioná-lo;
4. Guardar o papel de filtro embrulhado em papel alumínio.

6.5 Armazenamento e Transporte das amostras

- As amostras de sangue coletadas em criotubo devem ser transportadas diariamente, em caixa de isopor com gelo (4-8 °C), ao laboratório de Biologia Molecular da Gerência de Malária, da FMT-HVD para processamento (Extração de DNA/ RNA) ou para armazenamento em longo prazo.
 - O sangue coletado em tubo microtainer para extração de DNA e RNA deverá ser processado conforme o item 6.6.
- As amostras de sangue coletadas em papel de filtro devem ser transportadas diariamente, em temperatura ambiente, ao laboratório de Biologia Molecular, da Gerência de Malária, da FMT-HVD para processamento (Extração de DNA/ RNA) ou para armazenamento em longo prazo.
 - O papel de filtro deve secar até o dia seguinte (ou por várias horas); uma parte do papel de filtro ficará dentro de envelope plástico com esferas de Sílica, a -80°C, e a outra ficará em Trizol a -80°C.
 - Para detecção de RNA, o sangue em papel de filtro deve ser processado o mais brevemente possível.

6.6 Processamento das amostras de sangue utilizando *RNAprotect*

1. O criobox levado para o campo deve conter, para cada amostra coletada em tubo microtainer, os seguintes tubos eppendorfs, previamente identificados com etiqueta de código de barras:

- Tubo 1 - Um tubo contendo alíquota de 250 µL de RNAprotect;
- Tubo 2 - Um tubo para armazenamento do Pellet;
- Tubo 3 - Um tubo eppendorf que ficará vazio, para posterior armazenamento do Plasma.

2. Logo após a coleta da amostra de sangue, adicionar 50µL da mesma ao Tubo 1. Homogeneizar o conteúdo do tubo com a pipeta;

3. Transferir 200µl do sangue coletado ao Tubo 2;

4. Fechar o criobox e mantê-lo a 4°C, até a próxima coleta de sangue;

5. No laboratório deve-se armazenar o Tubo 1 em criobox identificado, em freezer;

6. No laboratório deve-se centrifugar o Tubo 2, para separação de plasma e pellet, a 5000rpm, por 10min, em temperatura ambiente;

7. Após centrifugação, aliquotar o plasma ao tubo 3. Armazenar imediatamente o tubo criobox identificado, em freezer;

8. Em seguida, armazenar imediatamente o pellet em criobox identificado, em freezer;

9. Preencher diário de laboratório, registrando observações de coagulação ou hemólise do sangue;

10. Tratamento do papel de filtro:

- Deixar secar até o próximo dia;
- Cortar um dos 2 círculos em círculos menores;
- Guardar em 300µl de Trizol, em tubo Eppendorf a -20°C ou -80°C;
- O resto do papel de filtro será embrulhado em papel alumínio e guardado em envelope plástico com esferas de Sílica a -20°C ou -80°C.

11. Limpar as pipetas utilizadas, a bancada e a centrífuga com álcool a 70%.

6.7 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1)

7. REFERÊNCIAS

1. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.
2. BRASIL: Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2005.
3. Waltmann A. STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP). Obtaining Fingerprick Blood Samples. Version 1, Jan 2012.
4. Waltmann A. STANDARD OPERATING PROCEDURE (SOP). Processing of Fingerprick Blood specimens. Version 1, Jan 2012.

8 REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
NOME DO ANEXO:		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma)	
Novo		Criado por:	Aprovado por:
Revisão			
Tradução		Data e assinatura	Data e assinatura



Procedimento Operacional Padrão

Gerência de Malária

BILL & MELINDA
GATES foundation

Código POP	POP_MAL_LB_018_v01D_PT		
Título	Procedimento para Extração de DNA em placa, utilizando Favor prep 96-well genomic DNA kit (FAVORGEN).		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: Anne Cristine Gomes de Almeida.	Revisado por: Gisely Carsodo de Melo	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

Emenda	Razão da emenda

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento extração de DNA em placa, utilizando kit Favor prep 96-well genomic DNA.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização de procedimento de Extração de DNA.

5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004).
- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de plasmódio (versão atual do POP_MAL_LB_002).
- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de DNA de plasmódio (qPCR) (versão atual do POP_MAL_LB_021).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Recursos necessários

6.1.1 Materiais

- Tampão FATG2
- Tampão W1 (adicionado etanol)
- Tampão de Lavagem (adicionado etanol)
- Tampão de eluição
- Proteinase K
- Placa de ligação de DNA 96-Well
- Placa 96-Well PCR
- Filme adesivo
- Placa 96-well 2.0 ml
- Etanol absoluto (96-100%)

6.1.2 Equipamentos

- Centrífuga com capacidade mínima de 5000 x g
- Banho-maria 60°C

6.1.3 Soluções para preparo

- **Tampão W1** – Adicionar 12-35mL de etanol 96-100%, no primeiro uso;
- **Tampão de Lavagem** - Adicionar 100-200mL de etanol 96-100%, no primeiro uso;
- **Proteinase K** - Adicionar ddH₂O, dependendo da quantidade da enzima, para uma concentração de 10mg/mL: 23mg – 2,3mL; 90mg – 9mL; 225mg – 22,5mL. Após preparada, armazenar a 4°C.

6.1.4 Extração do DNA

Passo 1 – Lise Celular

1. Adicionar 200µL de tampão FATG2 e 20µL de Proteinase k a cada poço da placa 96 poços 2mL (não fornecida);
2. Adicionar 200µL de sangue aos poços da placa, misturando por pipetagem. Selar a placa com filme adesivo;
3. Incubar a 60°C por 20min.
4. Pré-aquecer o Tampão de Eluição (50 a 100µL por poço) a 60°C (para o Passo 4 - Eluição do DNA).

Passo 2 - Ligação do DNA

1. Adicionar 200µL de etanol 96-100% a cada poço da placa com amostra lisada. Misturar imediatamente por pipetagem, de 5 a 10X;
2. Colocar uma placa de Ligação de DNA em cima de uma nova placa de 96 poços 2mL (não fornecida);
3. Transferir as amostras que foram misturadas ao álcool para a placa de Ligação DNA;

4. Colocar as placas montadas (placa de Ligação do DNA + placa 96 poços 2mL) no rotor e centrifugar a 4500 – 6000 x g, por 5min;
5. Descartar o líquido dos poços e retonar a placa de Ligação de DNA para cima da placa de 96 poços 2 mL.

Passo 3 – Lavagem

1. Adicionar 300µL de tampão W1 a cada poço da placa de Ligação de DNA ;
2. Colocar as placas montadas (placa de Ligação do DNA + placa 96 poços 2mL) no rotor e centrifugar a 4500 – 6000 x g, por 5min;
3. Descartar o líquido dos poços e retornar a placa de Ligação de DNA para cima da placa de 96 poços 2 mL.
6. Adicionar 600µL de tampão de Lavagem (contendo etanol) a cada poço da placa de Ligação de DNA;
7. Colocar as placas montadas (placa de Ligação do DNA + placa 96 poços 2mL) no rotor e centrifugar a 4500 – 6000 x g, por 5min;
8. Descartar o líquido dos poços e retornar a placa de Ligação de DNA para cima da placa de 96 poços 2 mL.
9. Colocar as placas montadas (placa de Ligação do DNA + placa 96 poços 2mL) no rotor e centrifugar a 4500 – 6000 x g, por 15min adicionais, para remover o etanol residual.

Passo 4 – Eluição do DNA

1. Colocar uma placa de PCR (fornecida) em cima da placa 96 poços 2mL. Em seguida, colocar a placa de Ligação do DNA em cima da placa de PCR;
 - Nota: em cima: placa de Ligação do DNA; no meio: placa de PCR; em baixo: placa 96 poços 2mL.
2. Adicionar 50-100µL de tampão de Eluição ou ddH₂O (pH 8,0 - 8,5) na parte central da membrana da placa de Ligação do DNA. Aguardar por 3min para que o tampão de eluição ou a ddH₂O seja completamente absorvida pela membrana;
3. Colocar as placas montadas (placa de Ligação do DNA + placa de PCR + placa 96 poços 2mL) no rotor e centrifugar a 4500 – 6000 x g, por 5min para eluir o DNA purificado.

6.2 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1).

7 REFERÊNCIAS

1. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

8 REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO	CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):
NOME DO ANEXO:	CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma)

Novo			Criado por:	Aprovado por:
Revisão				
Tradução			Data e assinatura	Data e assinatura

Código POP	POP_MAL_LB_019_v01D_PT		
Título	Procedimento para Extração de RNA em placa utilizando kit RNeasy Plus 96, da Qiagen®.		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: Anne Cristine Gomes de Almeida.	Revisado por: Gisely Carsodo de Melo	Aprovado por:	Data de aplicação:

--	--	--	--

POP_MAL_LB_019_v01D_PT



Procedimento Operacional Padrão

Gerência de Malária

BILL & MELINDA
GATES foundation

Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:
-------------------	-------------------	-------------------	--------------------------

Emenda	Razão da emenda

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento extração de RNA em placa, utilizando kit RNeasy Plus 96.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

3. APLICÁVEL A

Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização de procedimento de Extração de RNA.

5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileiro, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004).
- Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de RNA de *pfs25* e *pvs25* de plasmódio (qRT-PCR) (versão atual do POP_MAL_LB_020).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Recursos necessários

6.1.1 Materiais

- Multipipetador
- Pipeta 8 canais
- Bandeja com microtubos
- Tampão RLT Plus
- Etanol 70%
- Tampão RW1
- Tampão RPE
- Mix de incubação RNase-Free DNase
- Microtubos de eluição
- Fita AirPore
- placa *gDNA eliminator*

- placa RNeasy
- *Master plate*
- S-blocks
- Água livre de RNase
- Seringa/agulha
- Frasco de DNase
- Tubo falcon de 15ml
- Tampão RDD

6.1.2 Equipamentos

- Centrífuga com capacidade mínima de 5000 x g
- Shaker

6.1.3 Extração do RNA

Passo 1

- Transferir 300µL de sangue contendo RNAprotect para a bandeja de microtubos, usando pipeta 8 canais;
- Fechar os tubos com as tampas para microtubos;
- Obter o pellet de células por centrifugação a 6000 rpm (~5600 x g), por 10 min;
- Remover completamente todo sobrenadante por pipetagem (ou 250 µL, se o pellet não for visível);
- Adicionar 300µL de tampão RLT Plus a cada tubo usando multipipetador;
- Fechar os tubos com as tampas para microtubos;
- Homogeneizar o lisado em shaker, a 1000 rpm, por 1 min.

Passo 2

- Colocar uma placa *gDNA eliminator* sobre um novo S-block;
- Identificar o S-block: “Filtrado”;
- Transferir o lisado do passo 1 para os poços da placa *gDNA eliminator*, usando pipeta 8 canais e ponteiras com filtro;
- Selar a placa *gDNA eliminator* com fita AirPore;
- Centrifugar o S-block e a placa *gDNA eliminator*, a 6000 rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C;
- Descartar a placa *gDNA eliminator* e preservar o filtrado.

Passo 3

- Colocar a placa RNeasy sobre um S-block (novo ou reutilizado);
- Identificar o S-block: “Filtrado”.

Passo 4

- Adicionar 1 volume = 300µL de etanol 70% a cada poço do S-block contendo o filtrado do passo 2, usando pipeta 8 canais e ponteiras com filtro;
- Misturar o líquido de cada poço por pipetagem, 3X.
- Transferir 600µL das amostras para os poços da placa RNeasy;
- Selar a placa RNeasy com fita AirPore;
- Centrifugar o S-block e a placa RNeasy a 6000rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C.

Passo 5

- Esvaziar o S-block e remover a fita AirPore;

- Adicionar 350µL de tampão RW1 a cada poço da placa RNeasy e selar a placa com uma nova fita AirPore;
- Prerapar o mix de incubação RNase-Free DNase (ver item 6.1.4);
- Centrifugar a 6000 rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C;
- Remover a fita AirPore, esvaziar o S-block e reutilizar o S-block;
- Pipetar 80µL de mix de incubação RNase-Free DNase diretamente sobre a membrana de cada poço da placa RNeasy com o multipipetador;
- Selar a placa com uma nova fita AirPore;
- Incubar a temperatura ambiente por 15 min;
- Remover a fita AirPore;
- Adicionar 350µL de tampão RW1 a cada poço;
- Selar a placa com uma nova fita AirPore;
- Incubar a temperatura ambiente por 5 min;
- Centrifugar a 6000 rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C.

Passo 6

- Esvaziar o S-block e remover a fita AirPore;
- Adicionar 800µL de tampão RPE a cada poço da placa RNeasy com multipipetador e selar a placa com uma nova fita AirPore;
- Centrifugar a 6000 rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C.

Passo 7

- Esvaziar o S-block e remover a fita AirPore;
- Adicionar 800µL de tampão RPE a cada poço da placa RNeasy com multipipetador e selar a placa com uma nova fita AirPore;
- Centrifugar a 6000 rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C;
- Esvaziar o S-block e remover a fita AirPore;
- Centrifugar a 6000 rpm (~5600 x g) por 3 min, a 20-25°C, para secar a membrana.

Passo 8

- Colocar a placa RNeasy sobre a bandeja de Microtubos de eluição e identificar a placa: “extrato RNA”;
- Adicionar 50µL de água RNase-free a cada poço;
- Selar a placa com uma nova fita AirPore;
- Incubar por 1 min, a temperatura ambiente;
- Centrifugar a 6000 rpm (~5600 x g) por 4 min, a 20-25°C, para eluir o RNA.

Passo 9

- Identificar a *master plate*: “Master plate / data”;
- Transferir 20µL de RNA purificado na master plate correspondente; selar com fita adesiva e armazenar a -20°C;
- Tampar os microtubos de eluição na bandeja e armazenar a -80°C, como reserva.

6.1.4 Mix de incubação RNase-Free DNase

1. Preparar imediatamente antes do uso:

- Adicionar 833 µl de água livre de RNase (fornecido pelo kit) ao frasco de DNase, utilizando agulha e seringa; inverter o frasco para dissolver a DNase;
- Manter em gelo até o uso;
- ou alíquotar e congelar, não for usar no mesmo dia.

*(catálogo Qiagen. no 72254)

2. Mix de incubação DNase:

- Pipetar 1ml de DNase e transferir para um Falcon de 15ml, contendo 7 mL de tampão RDD;
- Manter em gelo até o uso.
- Adicionar 80µl do Mix DNase RDD a cada poço, durante o passo 5 da extração de RNA.

6.1.5 Limpeza de S-blocks

Cada kit contém 12 S-Blocks. Se forem realizadas várias extrações por dia, pode ser conveniente ter S-Blocks adicionais disponíveis (cat. n 19585). S-Blocks frescos deve ser utilizados para recolher o fluxo através da placa *gDNA eliminator* (o filtrado contém RNA). Após o uso, os S-Blocks podem ser limpos e reutilizados para a coleta do filtrado das placas RNeasy. Não se deve reutilizar S-Blocks frescos para coletar o filtrado da placa *gDNA eliminator*.

- Lavar os S-blocks com água corrente da torneira;
- Incubar, durante 2 horas ou durante a noite em NaOH 0,1 M, EDTA 1 mM
- Lavar com água destilada;
- Secar a 50°C.

Nota: S-Blocks usados contém quantidades residuais de tampão RLT Plus ou tampão e RW1 e não devem ser limpos com água sanitária.

6.2 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (1).

7 REFERÊNCIAS

1. Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

8 REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO			CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
NOME DO ANEXO:			CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma)	
Novo	<input type="checkbox"/>		Criado por:	Aprovado por:
Revisão	<input type="checkbox"/>		Data e assinatura	Data e assinatura
Tradução	<input type="checkbox"/>			



Procedimento Operacional Padrão

BILL & MELINDA
GATES foundation

Gerência de Malária

Código POP	POP_MAL_LB_020_v01D_PT		
Título	Procedimento para realização de PCR em tempo real para detecção de RNA de <i>pfs25</i> e <i>pvs25</i> de plasmódio (qRT-PCR).		
Idioma da versão original	PORTUGUÊS		
Elaborado por: Anne Cristine Gomes de Almeida; Andrea Kühn	Revisado por: Gisely Cardoso de Melo	Aprovado por:	Data de aplicação:
Data & assinatura	Data & assinatura	Data & assinatura	Data da próxima revisão:

Emenda	Razão da emenda

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento de realização de PCR em tempo real para detecção de RNA de plasmódio (qRT-PCR, PCR quantitativo com transcrição reversa).

2. DEFINIÇÕES

PCR: a reação em cadeia da polimerase é definida como uma técnica molecular que permite a amplificação de pequenas quantidades de um DNA específico a partir de um molde do DNA, usando uma reação enzimática simples, sem um organismo vivo. O limiar de detecção da técnica é muito superior ao da gota espessa (técnica padrão utilizada no diagnóstico rotineiro da malária): cerca de 0.05 parasitos/ μ l.

PCR Tempo Real (qPCR): Variação da técnica de PCR para detecção de sinal fluorescente permitindo a quantificação de ácidos nucleicos em tempo real, assim como a detecção qualitativa de seqüências de ácidos nucleicos utilizando análises de curvas de dissociação ou por meio de sondas marcadas. Não requer tratamento pós-PCR para visualização do resultado.

Iniciador (primer): uma pequena seqüência de DNA ou RNA a partir da qual pode começar a replicação do DNA.

PCR quantitativo com transcrição reversa (qRT-PCR): é a reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase. Não utiliza o DNA de cadeia dupla como molde e sim RNA de cadeia simples. A partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA). Ao cDNA aplica-se a técnica de PCR.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de biologia molecular de amostras relacionadas à pesquisa clínica;
- Todos os laboratórios e ou grupos de pesquisa que constituem a REDIMA (Rede Amazônica da Dinâmica de Infecção Experimental com Malária).

4. RESPONSABILIDADES

Equipe do laboratório de biologia molecular envolvida na realização da PCR em tempo real.

5. POP'S RELACIONADOS

- Procedimento para o Seguimento dos participantes no estudo “Epidemiologia comparativa da transmissão de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax* no Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné”, nas comunidades do Brasileirinho, Ipiranga e Puraquequara, Manaus/AM (versão atual do POP_MAL_TC_004).
- Procedimento para Extração de RNA em placa utilizando kit RNeasy Plus 96, da Qiagen® (versão atual do POP_MAL_LB_019)
- Procedimento para extração de RNA utilizando Trizol® (versão atual do POP_MAL_LB_009).

6. PROCEDIMENTOS

6.1 Recursos necessários

6.1.1 Amostra obtida por extração de RNA:

- A partir de sangue total ou sangue em papel de filtro.

6.1.2 Materiais

9. Pipetas automáticas de 10 µL, 100 µL e 1000 µL
10. Ponteiras com filtro para pipetas automáticas
11. Pipeta multicanal 0,5 – 10 µl
12. Multipipetador
13. Ponteiras para multipipetador (1,5 ml)
14. Tubos de 1,5 e 2,0 mL
15. Microplacas de 0,1mL, com 96 poços, para sistema de PCR em Tempo Real
16. Filme óptico para vedar as microplacas

6.1.3 Equipamentos

4. Vortex
5. Centrifuga
6. Sistema de PCR em Tempo Real 7500 Fast Applied Biosystems

6.1.4 Reagentes

Reagente	Armazenamento
TaqMan RNA-to-CT 1-Step Kit: TaqMan RT-PCR Mix (2x) TaqMan RT Enzyme Mix (40x)	<i>Pacotes fechados:</i> -20°C 2-8°C -20°C
Sondas (Taqman® Probe)	alíquota usada: 2-8°C, estoque : -20°C
Iniciadores (primers) da reação	alíquota usada: 2-8°C, estoques (100 µM): -20°C
Água MiliQ	Temperatura ambiente

Iniciadores (5' – 3'):

Pfs25-for: GAA ATC CCG TTT CAT ACG CTT G

Pfs25-rev: AGT TTT AAC AGG ATT GCT TGT ATC TAA

Pvs25-for: ACA CTT GTG TGC TTG ATG TAT GTC
 Pvs25-rev: ACT TTG CCA ATA GCA CAT GAG CAA

Sondas (5' – 3'):

Pfs25-probe: **HEX** – TGT AAG AAT GTA ACT TGT GGT AAC GGT- **BHQ1**

Pvs25-probe: **6FAM** –TGC ATT GTT GAG TAC CTC TCG GAA- **BHQ1**

Plasmídeos:

Os plasmídeos contêm o fragmento do gene que está amplificado. Três diluições são usadas: 10^2 , 10^4 e 10^6 copias/ μ l.

As diluições de iniciadores e plasmídeos são preparadas com TE *buffer* (comprado).

6.2 Reação de transcriptase reversa e PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Para a detecção dos gametócitos de *P. falciparum* e *P. vivax*, foi padronizada uma reação de PCR em Tempo Real amplificando o transcrito dos genes *pfs25* ou *pvs25* (1, 2). Os dois passos necessários para a qRT-PCR são realizados em paralelo em 1 tubo/poço: Síntese de cDNA e amplificação em tempo real. Plasmídeos servem como controle positivo e como padrão para quantificação de DNA das amostras. Usando os plasmídeos é possível comparar a quantidade de DNA das amostras de varias placas.

6.2.1 Reação de PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Mastermix (para 96 poços)

	Concentr.	1x	110x	Condições de amplificação			
TaqMan RT-PCR Mix	2x	6 μ l	660 μ l				
Primer for + rev	10 μ M	1 μ l	110 μ l	Etapa	Temp.	Tempo (min)	Ciclos
Probe	10 μ M	0,5 μ l	55 μ l	1	48°C	15:00	1
RT Enzyme Mix	40x	0,3 l	33 μ l	2	95°C	10:00	1
Aqua MiliQ	-	2,2 μ l	242 μ l	3	95°C	0:15	45
					58°C	1:00	
Subtotal		10 μ l	1100 μ l	Modo de corrida: Standard 7500			
RNA /plasmídeo		2 μl*					
TOTAL		12 μl					

- Todas as etapas devem ser executadas em gelo. O mastermix é preparado em área apropriada (livre de contaminantes, DNA/RNA). Antes de abrir algum tubo com reagente, vortexar (exceto enzima) e centrifugar. A distribuição do mastermix e adição do RNA e DNA plasmidial deve ser realizada na sala de PCR em Tempo Real. Depois de acrescentar todos os reagentes, centrifugar a placa, limpar a placa e filme óptico.
- Em cada placa, é realizado três controles negativos (mastermix sem DNA) e três vezes cada diluição de controle plasmidial.
- As amostras são testadas uma vez em cada experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H	10 ²	10 ²	10 ²	N	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	N	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	N

- Amostras
- Controle plasmidial
- N Controle negativo

- As análises são realizadas pelo software distribuído pelo fabricante – Applied Biosystems “7500 Fast System SDS Software”, e utiliza-se como ponto de corte o CT determinado na validação de sensibilidade de detecção de *pfs25* e *pvs25* em plasmídeo padrão.
- Os valores do CT dos plasmídeos padrão são usados para construir uma curva padrão com a qual podem ser determinados os números de cópias dos genes para cada amostra.
- Para validar a sensibilidade de detecção de *Pfs25* e *Pvs25* com plasmídeo padrão, um qRT-PCR é realizado para cada par de iniciadores. As diluições dos plasmídeos são: 10⁻², 10⁻¹, 0,5x10⁻¹, 10⁰, 0,5x10¹, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ e 10⁷ cópias/μl são usadas como template. As diluições 10³ – 10⁷ copias/μl são testadas em triplicatas, e diluições de 10⁻² – 10² copias/μl são testadas em quintuplicatas. O CT da última diluição positiva é usada como ponto de corte.
- Todas amostras de RNA são examinadas com qPCR usando iniciadores específicos para o gene de *Plasmodium* sp. (QMAL), conforme versão atual do POP_MAL_LB_021. Amostras que contêm DNA genômico serão tratadas com DNase uma segunda vez.

6.4 Biossegurança

Todo o procedimento deve se realizar sob condições de biossegurança (3).

6.5 Registro dos resultados

O resultado da PCR será preenchido pelo responsável do procedimento em uma planilha específica, indicando resultado por espécie, o motivo em caso de não ter realizado o exame, e a data do resultado.

7 REFERÊNCIAS

- Amstutz, RC, Master thesis
- Protocolo de Detecção de Pfs25 e Pvs25 (Laboratório Ingrid Felger, Basel)
- Richmond JY, Mckinney RW. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 2001.

8. REGISTRO DOS ANEXOS

TÍTULO DO ANEXO		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma):	
Título do anexo:			
NOME DO ANEXO:		CÓDIGO DO ANEXO (Incluindo versão/idioma)	
Novo	Justificativa	Criado por:	Aprovado por:
Revisão			
Tradução		Data e assinatura	Data e assinatura



Epidemiologia comparativa da transmissão de
Plasmodium falciparum e *Plasmodium vivax* no
Brasil, Tailândia e Papua Nova Guiné

Questionário de Corte Transversal

POP_MAL_TC_004_A01_V02_PT

**BILL & MELINDA
GATES foundation**

Etiqueta:

Participante

1. O participante/responsável assinou o TCLE para participar do estudo? Sim Não

2. Nome:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

3. Data de nascimento:

--

 /

--

 /

--

4. Gênero: Homem Mulher

5. Se for mulher, está grávida? Sim Não Não sabe Não se aplica

6. Ocupação:

Agric./Pisc. Aposent.

Funcion. Desemp.

D. de casa Outra

Estud.

7. Mora na comunidade há mais de 2 meses? Sim Não

8. Está atualmente tomando algum medicamento?
 Sim Não

9. Se sim, qual medicamento?

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Medidas preventivas para malária

10. Há quanto tempo utiliza mosquiteiro?

Não usa mosquiteiro < 6 meses 6 meses - 1 ano 1 ano - 2 anos > 2 anos

11. A casa foi borrifada nos últimos 6 meses? Sim Não

12. A casa possui todas as janelas teladas? Sim Não

Histórico da doença

13. A pessoa dormiu fora da comunidade por uma ou mais noites no último mês?

Sim Não

14. Já teve algum episódio de malária? Sim Não

15. Se sim, quantos episódios?

--

16. Algum episódio ocorreu nas últimas 2 semanas? Sim Não Não se aplica

17. Tomou antimalárico nos últimos 2 meses? Sim Não

18. Se sim, qual antimalárico?

CQ CQ+PQ MQ+AS LU+AS Outro Não sabe Não se aplica

19. Teve febre nas últimas 48hs? Sim Não

20. A pessoa se sente doente hoje? Sim Não

Se sim, preencher quais sintomas:

21. Calafrios: Sim Não

23. Cefaléia: Sim Não

25. Dor abdominal: Sim Não

22. Sudorese: Sim Não

24. Vômito: Sim Não

26. Outro sintoma:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Exames de laboratório

27. Foi coletada 1 lâmina? Sim Não

28. Temperatura corporal:

--

,

--

 °C

29. Foi coletado 1 criotubo? Sim Não

30. Foi coletado 1 papel de filtro? Sim Não

Código do entrevistador:

--

Assinatura:



