

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLÁUDIA GRAZIANI SILVA

DEMONSTRAÇÃO DA PROVA DE CONCEITO DE UM TESTE PORTÁTIL PARA  
DETECÇÃO DE *Plasmodium* spp. POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL

CURITIBA

2014

ANA CLÁUDIA GRAZIANI SILVA

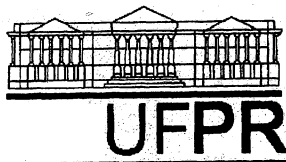
DEMONSTRAÇÃO DA PROVA DE CONCEITO DE UM TESTE PORTÁTIL PARA  
DETECÇÃO DE *Plasmodium* spp. ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Marco A. Krieger  
Coorientador: Alexandre Dias T. Costa

CURITIBA

2014



## RELATÓRIO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

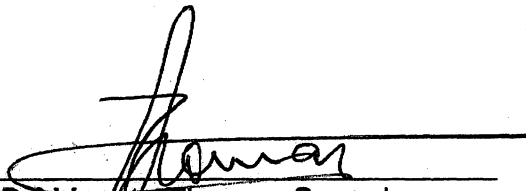
Aos quatro dias do mês de julho de 2014, na Sala 1 do TECPAR- CAMPUS CIC, Cidade Industrial de Curitiba, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Nonagésima Defesa de Dissertação de Mestrado, área de concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

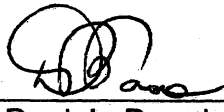
A Banca Examinadora, atendendo determinação do Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia ficou constituída pelos membros: Profª Drª Vanete Thomaz Soccol (UFPR), Drª Daniela Parada Pavoni (FIOCRUZ) e Prof Dr Marco Aurélio Krieger (UFPR – orientador da dissertação).

Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Ana Cláudia Graziani Silva**, a fazer a apresentação da dissertação intitulada: “DEMONSTRAÇÃO DA PROVA DE CONCEITO DE UM TESTE PORTÁTIL PARA DETECÇÃO DE *Plasmodium sp.* ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca composta pelos membros Profª Drª Vanete Thomaz Soccol, Drª Daniela Parada Pavoni, e Prof Dr Marco Aurélio Krieger declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30.10.09).

Curitiba, 04 de Julho de 2014.

  
Profª Drª Vanete Thomaz Soccol

  
Drª Daniela Parada Pavoni

  
Prof Dr Marco Aurélio Krieger

## DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo Marcus Mathei, pelo apoio incondicional, paciência, e total dedicação em todos os momentos a quem dedico essa conquista e todo meu amor, e a toda minha família pelo carinho a mim dedicado.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar ao meu lado, ouvindo minhas preces e me conduzindo à conquistar meus objetivos.

Agradeço por cada uma das dificuldades enfrentadas durante minha trajetória desde a graduação, agradeço pelas pessoas que pude encontrar durante todo esse diversificado percurso, onde muitos amigos eu adquiri.

À minha família linda, que sempre acreditou em meu potencial e me incentivou a lutar com integridade.

À minha mãe que se doou incondicionalmente para que eu tivesse o melhor, por todo carinho, toda compreensão e amor presente em minha educação. À minha irmã pelos vários momentos de alegrias e tristezas compartilhados durante esse período de minha vida, sempre fortalecendo meu coração.

Agradeço especialmente ao meu esposo, por todo apoio absoluto, compreensão e dedicação ilimitada desde o primeiro instante em que nossas vidas se uniram. Esse apoio foi essencial para que eu, muitas vezes, renovasse as minhas forças para concluir ao que me propus.

Ao meu orientador Dr. Marco A. Krieger por me receber tão bem e que mesmo sem me conhecer acreditou em meu trabalho e me concedeu essa oportunidade tão rica de aprendizado e conhecimento científico adquirido, pelo amadurecimento e crescimento que aperfeiçoaram profissionalmente e pessoalmente minha formação acadêmica. Admiro sua pessoa e sua exemplar contribuição na Pesquisa e Desenvolvimento.

Ao meu coorientador Dr. Alexandre T. Costa pela orientação e compartilhamento de seu conhecimento desde os primeiros passos desse aprendizado científico, pela confiança em mim depositada, acreditando em meu potencial e me incentivando a finalizar esta conquista. Agradeço pela disponibilidade e oportunidade que me proporcionou amadurecimento pessoal e profissional durante a realização deste trabalho.

Agradeço de coração à Dr<sup>a</sup> Rita Rampazzo, por todo apoio desde o início deste trabalho, por toda compreensão e atenção a mim dedicadas. Por sempre estar ao meu lado, me aconselhar e me fortalecer nos momentos difíceis. Obrigada por ser mais do que uma companheira de trabalho.

Agradeço de coração a cada um dos amigos do Laboratório de Desenvolvimento do IBMP, que foram fundamentais no quesito companheirismo, principalmente durante a realização deste trabalho sempre dando suporte físico, emocional e pessoal. Em ordem alfabética para não desmerecer ninguém: Amanda Leitolis, pela força e prestatividade; Érika Izumi, pela importante contribuição estatística deste trabalho, me recebendo em sua casa em um domingo à noite; Kelly Santos, pelo apoio, carinho e preocupação; Lílian Carneiro, pela disposição e paciência em sempre me auxiliar, pelas horas exaustivas que te proporcionei, pelo incentivo pessoal, moral e profissional; Márcia Pincerati, por ser uma ótima ouvinte, sempre disponível em tudo que precisei e pela prestativa colaboração neste trabalho; Miriam Ribas, pelo carinho e encorajamento; Najua, a mais nova companheira de trabalho, pela sua atenção; e Soledad Marton, pelo carinho, compreensão e colaboração em buscar artigos. Não tenho palavras para mensurar o quanto sou agradecida pelo agradável convívio, companheirismo, empenho e dedicação de todos em me ajudar. A todos vocês, minha mais sincera gratidão.

Às doutoras Fabiana Poerner, Adriana Umakai por toda ajuda e amizade, pelo apoio e incentivo pessoal e profissional.

À Coordenação e aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Bioprocessos da Universidade Federal do Paraná (PPGEBB) por prover o acesso ao conhecimento acadêmico. E a secretária Celina Jarletti, por todos os momentos de esclarecimento e atenção carinhosamente disponibilizados.

A todos do Instituto de Biologia Molecular do Paraná que sempre me acolheram em tudo que precisei. Em especial à Carolina Bandeira por toda amizade e ajuda, pelo apoio e incentivo pessoal e profissional.

Ao Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ por me disponibilizarem o ambiente para realização de parte deste projeto.

Agradeço igualmente ao CNPq, bem como ao IBMP pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas não mencionadas que contribuíram de modo direto ou indireto, para essa conquista, todo meu apreço.

*“De tudo ficaram três coisas...  
A certeza de que estamos começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
E a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...  
Façamos da interrupção um caminho novo...  
Da queda, um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro!”*  
*Fernando Sabino*

*“Não vai demorar que passemos adiante uma grande e bela ciência, que faz arte em defesa da vida”.*

*Carlos Chagas*

## RESUMO

A malária é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo. O parasito *Plasmodium* spp., agente etiológico da malária, pode ser transmitidos através de picadas de mosquitos, transfusão de sangue, compartilhamento de seringas ou no nascimento. Atualmente, o diagnóstico da malária baseia-se na identificação de parasitos em esfregaços de sangue por meio de microscopia óptica (método de gota espessa) ou detecção de resposta imunológica do hospedeiro humano. O diagnóstico de gota espessa pode não distinguir entre as espécies de *Plasmodium* spp. morfológicamente semelhantes, sendo, portanto, limitado para os estudos epidemiológicos. Os testes moleculares começaram a ser utilizados para a detecção simultânea de duas ou mais espécies de *Plasmodium* spp. em uma única reação. Neste trabalho, foi desenvolvido uma reação de PCR em Tempo Real quantitativa (qPCR) em um chip de silício, usando um microrreator que funciona como termociclador portátil com detectores de fluorescência chamado Q3. Os resultados do qPCR no chip são comparáveis com os resultados obtidos com equipamentos qPCR padrão (ABI7500). Tanto a PCR em Tempo Real no ABI7500 quanto a PCR em Tempo Real no chip (Q3) foram capazes de amplificar todas as amostras testadas, com o limite de detecção em 1,5 parasitas/microlitro de sangue com Ct de 33,5 na plataforma Q3 e Ct 35,4 na plataforma ABI7500. Utilizando como comparação a detecção de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae* em equipamentos padrão, os resultados obtidos na plataforma Q3 demonstram a funcionalidade de um teste qPCR portátil para detecção e diferenciação destas espécies. Considerando as conhecidas dificuldades de transporte e estocagem dos testes moleculares com relação à manutenção da temperatura, aplicou-se a tecnologia da gelificação no teste em estudo, tornando-o possível de ser estocado a 4 °C por 24 horas sem perda de sensibilidade. Os resultados aqui apresentados são o primeiro passo para o desenvolvimento de um teste portátil, rápido, sensível e específico de diagnóstico para a malária, trazendo soluções de alta tecnologia a um passo de estar disponível para as populações negligenciadas.

Palavras-chave: malária; *Plasmodium*; diagnóstico; ponto de atendimento; qPCR; *lab-on-chip*.

## ABSTRACT

Malaria is a disease that affects millions of people worldwide. The parasite *Plasmodium* spp., the etiologic agent of malaria, can be transmitted through mosquito bites, blood transfusion, sharing needles or at birth. Currently, the diagnosis of malaria is based on the identification of parasites in blood smears, by detection of host immune response or by optical microscopy (thick film method). The thick blood diagnosis method might not be able to distinguish between the species of *Plasmodium* spp. which are morphologically similar, and therefore it has limited application to epidemiological studies. Molecular tests began to be used for the simultaneous detection of two or more species of *Plasmodium* spp. in a single reaction. In this work, we developed a reaction of quantitative Real-Time PCR (qPCR) on a silicon chip, using a microreactor as a portable thermocycler with fluorescence detectors called Q3. The qPCR results on the chip are comparable to those obtained with a standard qPCR equipment (ABI7500). Both real-time PCR in ABI7500 as the Real-Time PCR chip (Q3) were able of amplifying all samples tested, with a lower detection limit of 1.5 parasites/microliter of blood at a Ct of 33.5 in the Q3 platform and 35.4 in the ABI7500 platform. Comparing the detection *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium malariae* on a standard equipment, the results obtained with the Q3 platform demonstrate the functionality of a portable qPCR assay to detect and differentiate these species. The reaction developed in this work also detected a human gene as an internal reaction control. Considering the known difficulties for transport and storage of molecular tests with respect to the maintenance of temperature, we applied a gelification technology to our qPCR, making it possible to be stored at 4 °C for 24 hours without loss of sensitivity. Results presented here are the first step towards the development of a portable, rapid, sensitive and specific molecular diagnostic test for malaria, bringing high technology solutions one step closer to being available for neglected populations.

Keywords: malaria, *Plasmodium*; diagnostics; point of care; qPCR; lab-on-chip.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - <i>Plasmodium</i> spp NA FORMA DE MEROZOÍTO, DESTACANDO ORGANELAS E ESTRUTURAS CELULARES. ....	20
FIGURA 02 - CICLO DE VIDA DO <i>Plasmodium</i> spp. NO HOSPEDEIRO E NO VETOR.....	22
FIGURA 03 - INCIDÊNCIA PARASITÁRIA ANUAL (IPA), POR UNIDADE FEDERADA (UF), NA REGIÃO AMAZÔNICA, ENTRE 2010 E 2011. ....	28
FIGURA 04 - INCIDÊNCIA PARASITÁRIA ANUAL (IPA) NA REGIÃO AMAZÔNICA, ENTRE 2000 E 2011.....	29
FIGURA 05 - ÓBITOS OCORRIDOS POR MALÁRIA, ENTRE 2000 E 2011. ....	29
FIGURA 06 - ÓBITOS OCORRIDOS POR MALÁRIA NA REGIÃO AMAZÔNICA E EXTRA-AMAZÔNICA, ENTRE 2000 E 2011.....	30
FIGURA 07 - PLATAFORMA Q3 CONECTADA VIA USB EM UM COMPUTADOR PARA VISUALIZAÇÃO DO RESULTADO DA PCR EM TEMPO REAL (A); CHIP PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA Q3 (B).....	36
FIGURA 08 - ESQUEMA DO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO, E POSTERIOR USO PARA AS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA Q3. ....	43
FIGURA 09 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL - REAÇÃO LÍQUIDA (A); CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL- REAÇÃO GELIFICADA (B). ....	45
FIGURA 10 - FIGURA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>P. falciparum</i> DA REAÇÃO PADRÃO DE MENOR CONCENTRAÇÃO DE INICIADORES E SONDA. ....	46
FIGURA 11 - FIGURA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>P. falciparum</i> CONTENDO 3X INICIADORES E SONDA (A); AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>P. falciparum</i> CONTENDO 1X INICIADORES E SONDA (B). ....	47
FIGURA 12 - AMPLIFICAÇÃO DAS TRIPLICATAS TÉCNICAS DE DNA <i>P. falciparum</i> COM AS CONCENTRAÇÕES DE TRÊS VEZES (3X) E CINCO VEZES (5X) OLIGONUCLEOTÍDEO PARA <i>P. falciparum</i> E RNASE P RESPECTIVAMENTE. ....	49
FIGURA 13 - CURVA PARA DETECÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL SIMPLEX DAS CURVAS DE DNA GENÔMICO PARA <i>P. falciparum</i> NO APARELHO ABI7500. ....	50

FIGURA 14 - AMPLIFICAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL DUPLEX DA CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA DE <i>P. falciparum</i> DAS AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS. ....	51
FIGURA 15 - MÉDIA DOS Ct DE DETECÇÃO DA REAÇÃO LÍQUIDA DA CURVA PADRÃO DO DNA <i>P. falciparum</i> DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA ABI7500 E Q3 VERSUS A QUANTIDADE LOGARÍTMICA DE PARASITOS. ....	53
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DA DETECÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL DUPLEX GELIFICADO PARA A CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA DE <i>P. falciparum</i> DAS AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS. ....	55
FIGURA 17 - MÉDIA DOS VALORES DE Ct DA DETECÇÃO DA CURVA DE DILUIÇÃO DO DNA DE <i>P. falciparum</i> DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA Q3 VERSUS A QUANTIDADE LOGARÍTMICA DE PARASITOS. ....	56
FIGURA 18 - DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO RNase P UTILIZANDO O DNA DE <i>P. falciparum</i> NO DIAGNÓSTICO DE PCR EM TEMPO REAL PARA MALARIA NA PLATAFORMA Q3. ....	57
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE <i>P. falciparum</i> (A); AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE <i>P. malariae</i> (B); AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE <i>P. vivax</i> (C). ....	59
FIGURA 20 - FIGURA REPRESENTATIVA DA AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE <i>P. falciparum</i> , <i>P. malariae</i> E <i>P. vivax</i> . ....	61
FIGURA 21 - FIGURA REPRESENTATIVA DA AMPLIFICAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NO CHIP COM DNA DE <i>P. falciparum</i> , <i>P. malarie</i> E <i>P. vivax</i> . ....	61
FIGURA 22 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL LÍQUIDAS E GELIFICADAS NAS PALATAFORMAS ABI7500 E Q3. - <i>P. Falciparum</i> (A); <i>P.vivax</i> (B) E <i>P. malariae</i> (C). ....	64
FIGURA 23 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL LÍQUIDA E GELIFICADA ENTRE AS ESPÉCIES <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> E <i>P. malariae</i> NAS PALATAFORMAS ABI7500 E Q3. ....	65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01- SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E SONDAS GÊNERO ESPECÍFICAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>Plasmodium</i> spp UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL...	40
TABELA 02 - DIFERENTES CONDIÇÕES DE VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS DURANTE A OTIMIZAÇÃO DO TESTE DIAGNÓSTICO .....	42
TABELA 03 - DIFERENTES CONDIÇÕES DE CICLAGENS UTILIZADAS DURANTE A OTIMIZAÇÃO TESTE DIAGNÓSTICO .....	42
TABELA 04 - MÉDIA DOS Ct PARA <i>P. falciparum</i> E RNase P PARA AS REAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO 1X E 3X DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	48
TABELA 05 - MÉDIAS E VARIAÇÃO DOS VALORES DE Ct PARA <i>P. falciparum</i> E RNase P.....	50
TABELA 06 - ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS MÉDIAS E VARIAÇÃO DOS VALORES DE Ct CONSIDERANDO OS DIFERENTES PONTOS DA CURVA DE DILUIÇÃO DO DNA <i>P. falciparum</i> .....	52
TABELA 07 - COMPARAÇÃO DE CICLOS DE DETECÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PARASITAS - LÍQUIDA E GELIFICADA NA PLATAFORMA Q3. ....	55
TABELA 08 - MÉDIA DOS Ct DAS DILUIÇÕES DE DNA <i>P. falciparum</i> PARA DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO RNase P.....	58
TABELA 09 - MÉDIA DE Ct OBTIDOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE <i>P. falciparum</i> , <i>P. malariae</i> E <i>P. vivax</i> . ....	60
TABELA 10 - VALORES DAS MÉDIAS DOS Ct DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NO CHIP.....	62
TABELA 11 - VALORES DE MÉDIA E VARIAÇÃO DOS Ct DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL LÍQUIDAS E GELIFICADAS NAS PLATAFORMAS ABI7500 E Q3. ....	63
TABELA 12 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ÓTIMAS PARA PCR EM TEMPO REAL NO Q3.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

Ct - *Cycle threshold*

FAM - (6-carboxyfluorescein)

HEX - (6-carboxy-2, 4, 4, 5, 7, 7 - hexaclorofluoresceína succinimidyl éster)

IBMP – Instituto de Biologia Molecular do Paraná

IPA - índice parasitário anual

IPEPATRO - Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais

LOC - *Lab-on-a-chip*

LOD - Limite de Detecção

MEMS - Sistemas microeletromecânicos

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

POC - *Point of care*

q.s.p - quantidade suficiente para

qPCR – PCR em Tempo Real quantitativo

RDT - Rapid Diagnostic Tests

RPM – rotação por minuto

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
2.1 HISTÓRICO .....	18
2.2 EVOLUÇÃO DOS <i>Plasmodium</i> NO HOMEM .....	18
2.3 HISTÓRICO DA MALÁRIA NO BRASIL.....	19
2.4 OS VETORES .....	20
2.5 CICLO BIOLÓGICO .....	21
2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA.....	24
<b>2.7 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA</b> .....	26
2.7.1 SITUAÇÃO MUNDIAL .....	26
2.7.2 SITUAÇÃO NO BRASIL .....	27
2.8 DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA.....	30
2.8.1 Microscopia ótica - padrão-ouro .....	31
2.8.2 Testes imunocromatográficos rápidos.....	31
2.8.3 Métodos moleculares .....	32
2.8.4 Testes <i>point of care</i> baseados em microfluídica .....	34
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	37
5.1 OBJETIVO GERAL .....	37
5.1.2 Objetivos específicos.....	37
<b>6 METODOLOGIAS</b> .....	38
6.1 AMOSTRAS UTILIZADAS.....	38
6.1.1 Amostras utilizadas para o desenvolvimento e validação dos testes .....	38
6.1.2 Preparo das amostras para obtenção das curvas padrão.....	38
6.2 PCR EM TEMPO REAL .....	39
6.2.1 Controle negativo e controle interno.....	41

6.2.2 PCR em Tempo Real para a plataforma ABI7500 Real Time PCR System (Life Technologies)	41
6.2.3 PCR em Tempo Real para reação líquida no chip na plataforma Q3.....	41
6.2.4 PCR em Tempo Real no Q3 para reação gelificada no chip .....	42
6.2.5 Sensibilidade e reprodutibilidade analítica do controle positivo do teste diagnóstico Q3 e Determinação do Limite de Detecção Ótico (LOD).....	43
6.2.6 Análises Estatísticas .....	44
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
7.1 TESTES INICIAIS PARA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE qPCR NO CHIP .....	45
7.1.1 Testes iniciais para padronização dos ensaios com DNA <i>P. falciparum</i> .....	45
7.1.2 Ensaio de padronização para detecção da curva padrão e definição do limiar de detecção.....	50
7.2 DESEMPENHO COMPARATIVO DA PCR EM TEMPO REAL PARA AS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NA PLATAFORMA Q3 EM FUNÇÃO DO LOD.....	54
7.3 PADRONIZAÇÃO DO CONTROLE INTERNO DA REAÇÃO (DETECÇÃO DO GENE HUMANO RNase P) .....	57
7.4 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS PARA DETECÇÃO DE DNA DE <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> E <i>P. malariae</i> NA PLATAFORMA Q3 .....	58
7.5 DESEMPENHO DA PCR EM TEMPO REAL PARA REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NA PLATAFORMA Q3 E NA PLATAFORMA ABI7500 .....	62
7.6 ASPECTOS COMPARATIVOS ENTRE OS ENSAIOS MOLECULARES DAS PLATAFORMAS TESTADAS.....	64
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>9 PERSPECTIVAS DO TRABALHO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A malária, uma das principais doenças parasitárias no mundo, é considerada uma das patologias mais antigas do planeta. O seu agente etiológico é transmitido pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas. Cinco espécies podem parasitar o homem: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale*.

O *Plasmodium* spp. possui um ciclo evolutivo complexo necessitando, obrigatoriamente, de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado. A fase assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado enquanto a reprodução sexuada ocorre no hospedeiro invertebrado. A malária caracteriza-se por surtos esporádicos e transmissão persistente. A resistência aos antimaláricos é um dos maiores desafios para controle da doença, levando a tratamentos ineficazes que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade.

A malária humana é considerada a doença parasitária mais importante devido às elevadas taxas de mortalidade e morbidade. Estima-se que houve 207 milhões de casos de malária em todo o mundo no ano de 2012. No Brasil, a região da Amazônia Legal é considerada endêmica com 99,7% da transmissão, ocorrendo a transmissão de três espécies de parasitos da malária: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*. A ocupação desregrada dos espaços periurbanos tem sido relatada como um importante fator para ocorrência de casos de malária em áreas urbanas.

O programa de controle da malária no país tem como base o diagnóstico precoce através da gota espessa, pela coloração de Giemsa. Este método é considerado o padrão ouro em diagnósticos, porém apresenta desvantagens na diferenciação das espécies bem como na identificação em baixa parasitemia. Um bom diagnóstico deveria permitir a caracterização da espécie infectante sendo essencial para a definição do esquema terapêutico e acompanhamento do paciente. Devido à importância no diagnóstico de malária, vários métodos têm sido estudados e desenvolvidos e novas tecnologias estão disponíveis. A partir da década de 80, surgiram às técnicas moleculares que desencadearam novas perspectivas para o diagnóstico de várias doenças infecto parasitárias.

A técnica molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para diagnóstico da malária baseia-se em sequências específicas dentro do RNA ribossomal dos plasmódios, o gene 18S. Tendo visto que o gene 18S é um bom alvo para a diferenciação de *Plasmodium* spp. por apresentar regiões polimórficas circundadas por regiões conservadas que facilitam a diferenciação. Outra variação da técnica molecular foi a PCR em Tempo Real (qPCR) que oferece vantagens em relação a PCR convencional. Enquanto que na PCR convencional a visualização do produto é realizada na fase platô após o término da reação, na PCR em Tempo Real o produto pode ser detectado na fase exponencial da reação, desse modo a qPCR pode ser utilizada para a quantificação exata do parasito no sangue dos indivíduos infectados.

Recentemente, uma nova técnica molecular de qPCR em chip (*Lab-on-a-Chip*), baseada em microfluídica tem sido validada para vários testes diagnósticos. Esta técnica tem o potencial de combinar a alta sensibilidade de um teste molecular, com a possibilidade de realização do diagnóstico próximo ao paciente (*point of care*) em condições precárias de campo, onde poucos recursos técnicos são disponíveis. Um exemplo é a plataforma Q3 (STMicroelectronics), composta de estrutura compacta de custo acessível que integra tecnologia de PCR, controle da temperatura elétrica, iluminação e detecção ótica utilizando o sistema de resolução em escala de submicrômetro denominada super-resolução *multi-frame pixel*, para análise molecular baseada em PCR em Tempo Real no chip.

O chip é composto de uma pastilha de silício, fabricado usando a tecnologia dos semicondutores selado com uma estrutura transparente formando seis câmaras de reação. Este equipamento permite a realização de reações com baixos volumes, com capacidade de detecção para alvo *multiplex*, em até dois canais de fluorescência.

Para resolver a questão da estabilidade dos reagentes em temperatura ambiente, existem alternativas como a liofilização ou gelificação (retirada parcial da água da amostra). A técnica da gelificação consiste na adição de agentes estabilizantes e moléculas antioxidantes antes de submeter à amostra ao vácuo (BIOTOOLS B&M LABS, 2002). Desta forma, aproximadamente 15-20% das moléculas de água permanecem na amostra, diminuindo o efeito inibitório do ressecamento na atividade enzimática necessária para a PCR.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

A malária humana é provavelmente uma doença tão antiga quanto a humanidade. Existem relatos e evidências arqueológicas que desde a pré-história o homem do Velho Mundo já estava exposto à malária (FERRARI, 1994; GARRET, 1995). O nome “malária” tem origem italiana (“*mal aria*”, mau ar), pois se acreditava que a doença provinha das exposições aos eflúvios venenosos das águas dos pântanos (FAERSTEIN, 1984). Febres intermitentes caracterizadas como provável infecção por malária foram relatadas em textos médicos na China, Mesopotâmia, Índia e Egito (DEANE, 1992; FERRARI, 1994). No século IV a.c, os médicos gregos caracterizavam a malária relatando os tipos febris: cotidiano, terça e quarta. Hipócrates descreveu clinicamente os quadros típicos febris, claramente enfatizando a esplenomegalia e hepatomegalia, além de relacionar a cura da doença à redução do baço e do fígado (KROGSTAD, 1995; DEANE, 1992).

Em 1874, o médico alemão Johann Meckel observou pigmentos escuros no sangue e em órgãos de indivíduos que haviam morrido de doença febril permitindo com isso, que estudos para encontrar o agente causador da malária se intensificassem. Em 1880, na Argélia, Charles Louis Alphonse Laveran, um médico do exército francês, observando esfregaço de sangue periférico de soldados que morreram com febre quarta, visualizou eritrócitos infectados em processo de exoflagelação, mostrando o protozoário causador da doença (OPAS/OMS, 1975; ÁVILA, 1994; SOUZA, 1997).

### 2.2 EVOLUÇÃO DOS *Plasmodium* NO HOMEM

Inicialmente o parasito denominado de *Oscillaria malariae* por Laveran incluía todas as espécies (FERRARI, 1994). Em 1885, Marchiafava e Celli redescobriram o parasito e criaram o gênero *Plasmodium*. Em 1886, Golgi descreveu as sucessivas fases da evolução do parasito no sangue correlacionando a fase final do desenvolvimento do parasito com a periodicidade entre os acessos febris e revelou a diferença dos ciclos evolutivos dos agentes da terça benigna (febre a cada 48 horas) e quarta (febre a cada 72 horas) com seus respectivos

agentes etiológicos (FERRARI, 1994). Em 1890, Grassi e Feletti, nomearam as espécies da terçã e da quartã respectivamente, de *Haemamoeba vivax* e *Haemamoeba malariae*. Em 1897, Welch encontrou os gametócitos do parasito e denominou de *Haematozoon falciparum*, sendo o agente da febre do tipo terçã maligna com períodos febris a cada 36 ou 48 horas, modificando posteriormente para o gênero *Plasmodium* spp. (SOUZA, 1997).

Patrick Manson (1894) sugeriu que a transmissão da malária dava-se por meio de insetos hematófagos e que as temperaturas das regiões tropicais influenciam o desenvolvimento do mosquito. Ronald Ross (1894) confirmou a teoria de Manson, estudando malária em aves (PESSOA, 1978). Porém, foi em 1898 quando Ronald Ross destacou a evolução de oocistos na luz do estômago dos mosquitos que a transmissão do *Plasmodium* foi reconhecida. Em 1900, Grassi realizou completamente a descrição do ciclo evolutivo do agente etiológico da malária humana nos mosquitos do gênero *Anopheles* (CASTRO, 1993).

Laveran identificou o protozoário *Plasmodium* spp. e possibilitou a definição da espécie *P. malariae*, por Bray (1959). Entretanto, demorou cerca de 80 anos de pesquisa para o descobrimento do ciclo evolutivo das quatro espécies de *Plasmodium* no protozoário e nos hospedeiros.

### 2.3 HISTÓRICO DA MALÁRIA NO BRASIL

A malária apresenta endemia no Brasil desde a colonização. No século XVII, Yves d'Evreux relatou que na expedição ao Maranhão os franceses contraíram terçãs, quartãs e outras febres de tipo incerto, ocorrendo o mesmo com os holandeses quando ocuparam a região Nordeste, onde o Conde Maurício de Nassau foi acometido de acessos febris por três meses seguidos. Os bandeirantes também pereceram de “febres intermitentes” ou “febre dos pântanos”, essa expressão é devida à acreditarem que as manifestações eram ocasionadas pelas emanações nocivas provenientes dos charcos, lagoas e rios da mata virgem nos sertões que exploravam. No século XVIII, no ano de 1772, foi notificado alto índice de mortalidade por malária, dentre os soldados que combateram contra os castelhanos, na colônia de Iguatemi, na capitania de Goiás (SANTOS FILHO, 1991).

A malária se propagou no início do século XIX, recebeu várias denominações como: “mal dos trópicos”, “terçã”, “terçã contínua”, “quartã” e “quartã

contínua", e também "sezões" e "maleitas"; disseminou pelo Brasil e ficou conhecida como doença intermitente" (SANTOS FILHO, 1991).

## 2.4 OS VETORES

Os mosquitos anofelinos transmissores da malária pertencem ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Ordem Coccidiida, Subordem Haemosporidiae, Família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium* spp.; definido como um grupo monofilético que possui três tipos de organelas de invasão na extremidade apical - rópria, micronema e grânulos densos (FIGURA 01) (VIVIER & DESPORTES, 1989). O protozoário manifesta-se clinicamente no hospedeiro por meio de febre periódica, anemia e outras sintomatologias resultantes do envolvimento fisiopatológico da doença (MAEGRAITH & ADAMS, 1960; FERRARI, 1994).

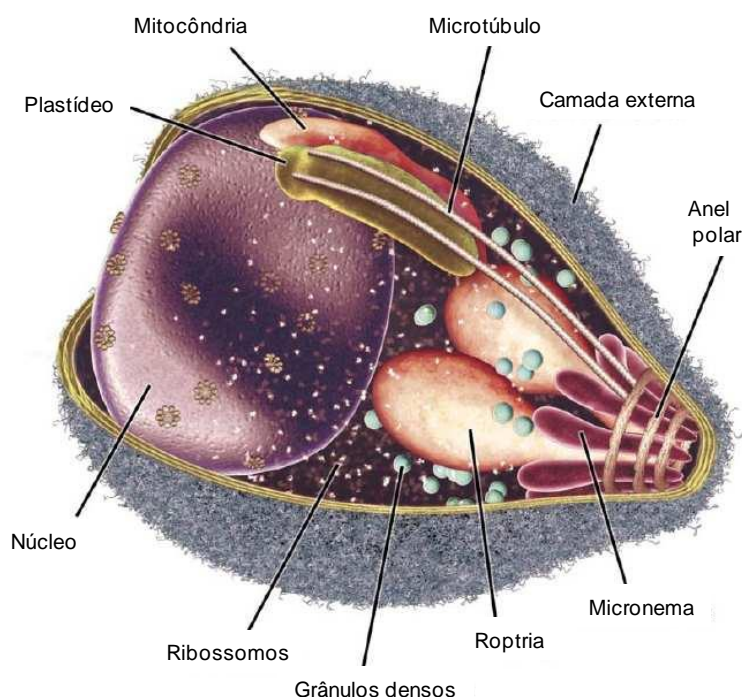


FIGURA 01 - *Plasmodium* spp NA FORMA DE MEROZOÍTO, DESTACANDO ORGANELAS E ESTRUTURAS CELULARES.

FONTE: COWMAN E CRABB. CELL, 2006; 124: 755–6.

Cerca de 150 espécies de mosquitos são conhecidas como transmissoras de malária em diversos hospedeiros vertebrados, dentre estas, quatro espécies parasitam frequentemente o homem: *Plasmodium falciparum* (WELCH, 1897),

*Plasmodium vivax* (GRASSI & FELETTI, 1890), *Plasmodium malariae* (LAVERAN, 1881) e *Plasmodium ovale* (STEPHENS, 1922), considerando que *P. ovale* está restrita ao continente africano, regiões da Ásia e ilhas do Pacífico (COLLINS & JEFFERY, 2005; GREENWOOD et al., 2005). Estudos descritos na Ásia apontam a descoberta da quinta espécie de *Plasmodium* humano, o *Plasmodium knowlesi*, que infecta naturalmente primatas não-humanos do continente asiático, visto que essa espécie tem causado óbitos na população humana (WHITE, 2008; GALINSKI & BARNWELL, 2009; CDC, 2009). O *P. knowlesi* foi identificado como agente causador de malária em vários países: Tailândia (JONGWUTIWES et al., 2008), Vietnã (EEDE et al., 2009), Malásia (VYTHILINGAM, et al., 2008; BRONNER et al., 2009), Singapura (NG et al., 2008), Mianmar (ZHU & ZHENG, 2006) e Filipinas (LUCHAVEZ et al., 2008).

## 2.5 CICLO BIOLÓGICO

Entender profundamente em todos os seus aspectos o ciclo do *Plasmodium* é extremamente importante para conduzir estudos que visam controlar o parasito através de alvos quimioterápicos e diagnósticos de forma precoce. Os *Plasmodium* possuem ciclo evolutivo complexo e necessitam, obrigatoriamente, de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado (FIGURA 02). A reprodução assexuada ocorre no hospedeiro vertebrado enquanto que a sexuada ocorre no invertebrado (HALL et al., 2005).

O esporozoítio é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado, inoculado durante o repasto sanguíneo por meio da probóscide do anofelino que penetra na pele do hospedeiro. Durante o repasto sanguíneo são depositados entre 15 a 200 parasitos sob a pele do hospedeiro. Os esporozoítios não alcançam a circulação sanguínea logo que são injetados, podendo permanecer por horas na pele (MOTA & RODRIGUEZ, 2004; AMINO et al., 2006; SINNIS & ZAVALA, 2008). As formas que escapam do sistema imunológico atravessam as células de Kupffer por meio de vacúolo parasitóforo, atingem a circulação sanguínea, migram para o fígado e penetram nos hepatócitos (AMINO et al., 2006; YAMAUCHI et al., 2007). O fígado e o baço eliminam na corrente circulatória, por meio dos fagócitos, grande parte dos esporozoítios. As principais proteínas da superfície dos esporozoítios; *circumsporozoite protein* (CSP) e *thrombospondin-related adhesive protein* (TRAP);

ligam-se a proteoglicanas de heparan sulfato da superfície dos hepatócitos durante a invasão dos mesmos (MILLER et al., 2002).

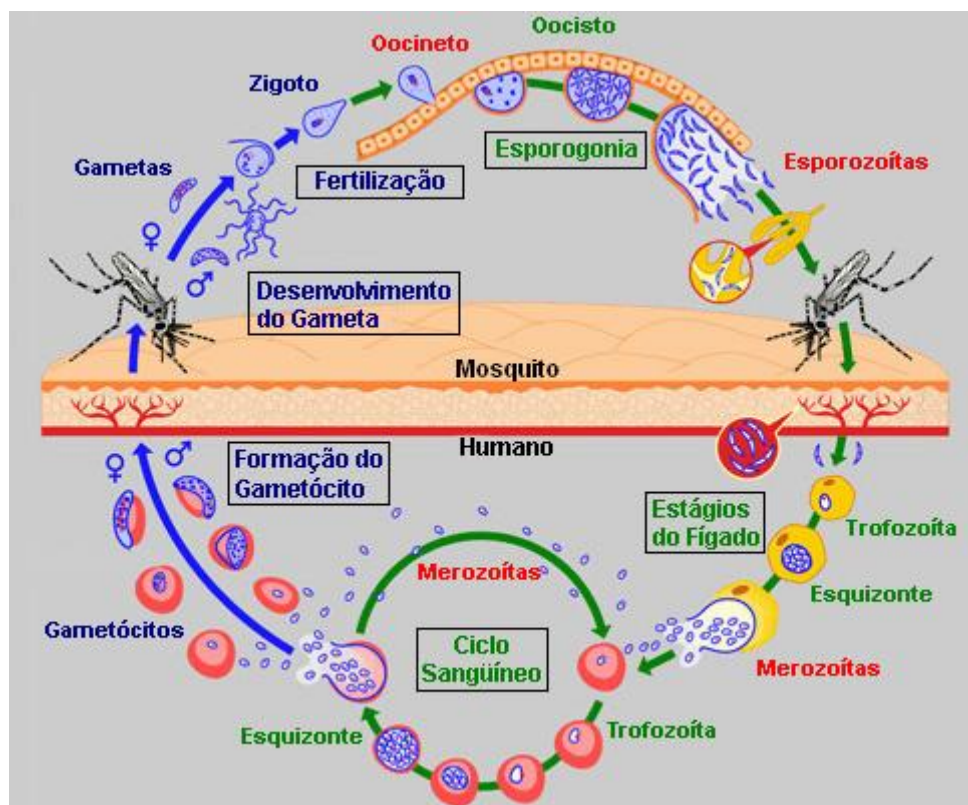


FIGURA 02 - CICLO DE VIDA DO *Plasmodium* spp. NO HOSPEDEIRO E NO VETOR  
 FONTE: UNIFESP (2013)

No interior dos hepatócitos, os esporozoítas sofrem processo de multiplicação por divisão assexuada, conhecida como esquizogonia pré-eritrocitária por preceder o ciclo no sangue, originando os esquizontes, que se diferenciam e se multiplicam formando milhares de merozoítas (10.000 a 15.000 para o *P. vivax*, 40.000 para o *P. falciparum*, 2.000 para o *P. malariae* e 15.000 para o *P. ovale*) (PESSOA, 1982; REY, 1992). No caso do *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítas podem não se multiplicar por divisão esquizogônica, permanecendo latentes no interior do fígado, chamados de hipnozoítas. Essas formas podem ser responsáveis meses ou anos após a infecção, pelas recaídas da doença (KROTOSKI, 1985).

Os merozoítas são liberados gradativamente na forma de vesículas denominadas merossomas, que atingem a circulação sanguínea e dão sequência ao ciclo (STURM et al., 2006). Na circulação sanguínea, muitos merozoítas penetram novamente os hepatócitos e são fagocitados e destruídos pelas células de Kupffer

enquanto outros sobrevivem e invadem os eritrócitos por meio de interações específicas entre a membrana do parasita e receptores específicos da superfície dos eritrócitos encontrados nos micronemas e nas róptrias, responsáveis pela mobilidade dos parasitos no deslizamento, na migração e invasão (DVORAK & MILLER, 1975).

O *Plasmodium vivax* invade reticulócitos e liga-se a um receptor eritrocitário tanto para quimiocinas quanto para merozoítos; a glicoproteína *Duffy*, e o *P. falciparum* liga-se a diversos receptores eritrocitários (glicoforinas A, B e C) dando continuidade ao ciclo eritrocítico (GAUR et al., 2004). Essa travessia, também ocorre com os esporozoítos na pele do hospedeiro vertebrado, nas células que revestem os hepatócitos e na glândula salivar do mosquito (KAPPE et al., 1999). Então, inicia-se o ciclo assexuado dos parasitos nas hemácias, responsável pela sintomatologia clínica da malária caracterizada por calafrio, febre e sudorese (VAUGHAN et al., 2008; ALY et al., 2009).

Dentro dos eritrócitos, após o processo de invasão, ocorre perda de micronemas, róptrias e membrana. Os merozoítos diferenciam-se na forma em anel do protozoário, denominada trofozoíto jovem, que se desenvolve, divide seu núcleo por esquizogonia e finalmente transforma-se no esquizonte. Dependendo da espécie, cada esquizonte, origina um número variável entre 8 e 32 merozoítos, que reiniciam o ciclo eritrocítico ao penetrarem em outras células sanguíneas. Após um período de três a 10 dias, que varia conforme a espécie, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos, as formas infectantes para o mosquito, onde ocorre o ciclo sexuado (DVORAK & MILLER, 1975; HADLEY et al., 1986).

As fêmeas dos anofelinos, ao se alimentarem do sangue de um indivíduo infectado, ingerem os gametócitos iniciando nessa fase, o ciclo sexuado no estômago do inseto. Esses gametócitos se diferenciam em gametas masculinos e femininos, que são fecundados produzindo zigotos. O zigoto na luz do estômago do mosquito modifica sua forma, torna-se alongado e móvel sendo denominado oocineto. Os oocinetos completam sua maturação no intestino do hospedeiro invertebrado, especificamente no bolo alimentar. Após a maturação, os oocinetos estão aptos a realizarem o processo de invasão na cavidade geral do mosquito (BILLKER et al., 1997).

Pouco se conhece sobre os detalhes deste processo de invasão e já foram propostos alguns modelos na tentativa de entender esse evento. Há uma proposta de invasão dos oocinetos, que ocorre nos pontos onde as membranas celulares apicais de células adjacentes se encontram, chamada de *time bomb* (bomba-relógio) (Kumar & Barillas-Mury, 2005). Essa proposta sugere que após a invasão, as células entram em processo de apoptose, fragmentando o DNA genômico e perdendo microvilosidades (BARILLAS-MURY & HAN, 2000). Esse modelo de invasão também foi observado atravessando o epitélio de *Anopheles stephensi*, em oocinetos de *P. falciparum* (BATON & RANFORD-CARTWRIGHT, 2004) e invadindo *Aedes aegypti* com *P. gallinaceum* (GUPTA et al., 2005).

Após a invasão, o oocineto sai das células epiteliais e entra em contato com a lâmina basal, induzindo a sua transformação em oocisto. As maquinarias de replicação do DNA e de síntese de proteínas são ativadas em cada oocisto, para gerar a formação de milhares de esporozoítos, por um processo de amplificação assexuada do número de parasitos. Conseqüentemente, afina a cápsula do oocisto, surgindo perfurações, por onde os esporozoítos escapam (MEIS et al., 1992). Liberados na hemolinfa, os esporozoítos invadem as glândulas salivares dos mosquitos durante o repasto sanguíneo e desse modo, são inoculadas as formas infectantes no vertebrado.

## 2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA MALÁRIA

Após o período de incubação, as manifestações clínicas da malária, que normalmente ocorrem em padrões cíclicos dependendo da espécie de *Plasmodium* spp., se iniciam. Sintomas como inquietação, mal estar, falta de apetite, sonolência, cefaleia e náuseas podem anteceder ao paroxismo febril característico da doença (calafrio, febre e sudorese) (DE SOUZA et al., 2000). Depois da fase inicial, a febre assume uma característica intermitente na qual depende do tempo de duração dos ciclos eritrocíticos de cada espécie de *Plasmodium*: 24 horas para *P. knowlesi* (COX-SINGH et al., 2008), 48 horas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e 72 horas para *P. malariae* (KWIATKOWSKI, 2005).

Os sintomas clínicos mais severos são causados por *P. falciparum*, pois esta espécie invade hemácias indefinidamente que possibilita atingir altas parasitemias em pouco tempo e conduz a evolução do quadro clínico para a forma de malária

complicada, evidenciando forte cefaléia, hipertermia, hipoglicemia, vômitos, insuficiência renal aguda, convulsões, edema pulmonar agudo, disfunção hepática, hemoglobinúria e choque, podendo ocasionar óbito (SVS, 2005). Porém, são relatados também casos graves e até letais de infecção por *P. vivax* (PRICE et al., 2007; LOMAR et al., 2005), *P. knowlesi* (COX-SINGH et al., 2010) e *P. malariae* (KIRCHGATTER et al., 2005).

O uso de antimaláricos associada à ação do sistema imune pode alterar os sintomas estabelecidos para o quadro clássico de malária ou até mesmo ocasionar ausência desses sintomas. Infecções por *P. falciparum* podem acarretar complicações que levam à morte, porém, o sistema imune associado ao tratamento pode controlar a parasitemia sanguínea. Anticorpos específicos podem controlar a parasitemia da malária, controlando a multiplicação do protozoário e diminuindo a quantidade dos gametócitos na circulação, evitando a infecção dos mosquitos (BARROSO, 2003). Entretanto, esses anticorpos sem auxílio medicamentoso podem induzir parasitemias submicroscópicas persistentes por meses ou anos (STEVENSON & RILEY, 2004).

A ausência de antígeno *Duffy* nos eritrócitos leva o indivíduo a apresentar resistência contra as espécies de *P. vivax* e *P. knowlesi*, pela ausência da interação dos protozoários com os receptores da proteína de ligação ao *Duffy* (PvDBP) (SNEWIN et al., 1995), visto que os parasitos dependem da interação com esses receptores que estão presentes nos eritrócitos (GRIMBERG et al., 2007). As espécies de *P. vivax* e *P. ovale* invadem exclusivamente reticulócitos, diminuindo a parasitemia sanguínea, *P. malariae*, por sua vez, invade apenas hemácias maduras, ocasionando baixas parasitemias em pessoas imunocompetentes, contribuindo para malária assintomática em decorrência da produção de macrófagos nos órgãos linfóides (DVORAK & MILLER et al., 1975).

As respostas imunes inespecíficas atuam de imediato no início da infecção, enquanto a resposta específica demora um período maior de adaptação para agir. Indivíduos que apresentam anemia falciforme são exemplos de resposta inata, pois evita o desenvolvimento severo do *P. falciparum* (ALLISON, 2009). Outro exemplo é a deficiência da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PD), responsável por ocasionar o estresse oxidativo em hemácias que pode proteger o indivíduo da manifestação clínica inicial da malária, dificultando a instalação do processo infeccioso (STEVENSON & RILEY, 2004).

## 2.7 EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

### 2.7.1 Situação mundial

A malária humana é considerada a doença parasitária mais importante devido às elevadas taxas de mortalidade e morbidade. A doença atinge atualmente mais de 100 países das regiões tropicais e subtropicais e cerca de 40% da população mundial vive em territórios de risco de transmissão da malária. Muitos casos clínicos ocorrem anualmente e resultam em mais de um milhão de mortes principalmente em áreas de alto risco como a *África Subsaariana*, conhecida como o território de maior foco de transmissão da doença onde ocorrem 90% dos casos no mundo. No continente africano a espécie predominante é o *Plasmodium falciparum* (90%) e o restante das infecções por *P. falciparum* distribuem-se entre América do Sul, América Central, Ásia e Oceania (WHO, 2013).

A malária apresenta grande impacto no desenvolvimento social e econômico da população. Países que possuem alta transmissão têm seu crescimento econômico diminuído em média de 1% a 3% por ano, visto que a contínua manutenção da doença se deve pela resistência dos mosquitos aos inseticidas, resistência dos parasitos às drogas antimaláricas, à interrupção das ações de controle bem como pela ausência de uma vacina disponível comercialmente (WHO, 2013).

A Organização Mundial de Saúde estima que, em 2012, 207 milhões de casos de malária ocorreram em todo o mundo e cerca de 627.000 pessoas morreram da doença, sendo cerca de 482.000 crianças menores de cinco anos de idade, na *África Subsaariana*. Esta taxa é de, em média, 1.300 crianças por dia, ou quase uma criança a cada minuto (WHO, 2013).

Em 2013, 97 países relataram transmissão contínua da malária, principalmente na África, na Ásia e nas Américas. A preocupação com a doença não está restrita somente aos países endêmicos e se estende a todas as regiões do globo, incluindo também as regiões livres de transmissão (WHO, 2013). Isso se deve à globalização que propicia um intenso trânsito de pessoas, o que resulta na dispersão de agente etiológico de doenças (BUSS et al., 2007; ERDMAN & KAIN, 2008).

A Organização Mundial de Saúde criou a rede de controle trisetorial a “Roll Back Malária” (Retroceder a Malária, em tradução livre). Para o controle da malária humana, a OMS preconiza a tríade: combate ao vetor, diagnóstico precoce e tratamento adequado dos doentes. Entre 2000 e 2012, o aumento de escala de intervenções da OMS ajudou a reduzir as taxas de incidência de malária em 25% globalmente e em 31% na região africana. A taxa de mortalidade da malária mundial foi reduzida em 42% durante o mesmo período, enquanto a diminuição na região africana foi de 49%. Esse aumento de escala de intervenções da OMS contra a malária salvou cerca de 3,3 milhões de vidas sendo que 90%, ou três milhões, estão no grupo de menores de cinco anos na África Subsaariana (WHO, 2013).

#### 2.7.2 Situação no Brasil

No Brasil, ocorre a transmissão de três espécies de parasitos da malária: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium malariae*, sendo *P. vivax* responsável por 78,7% dos casos de malária notificados na Região Amazônica. A Região da Amazônia Legal é considerada endêmica com 99,7% da transmissão concentrada nessa região. Dada à característica do *P. vivax*, a doença em nosso país apresenta baixa mortalidade com considerável morbidade (CASTRO & SINGER, 2007; SUARÉZ-MUTIS & COURA, 2007). A Amazônia Legal é uma divisão geopolítica composta pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (SVS, 2013).

Em 1960 foi implantada a campanha de erradicação da malária no Brasil, que reduziu a incidência da endemia da malária (MENISTÉRIO DA SAÚDE, 1996). O programa de controle da malária divide o território brasileiro em duas regiões, a endêmica compreendendo a Amazônia Legal onde concentra maior parte dos casos do país, e a não endêmica, região extra-amazônica, constituída pelo restante dos estados da federação (SVS, 2007). Porém, a partir da década de 70, o desenvolvimento e a implementação de projetos de colonização e expansão da fronteira agrícola, acelerou os processos migratórios levando a um crescimento demográfico enfático e desordenado. Na Região da Amazônia Legal, as condições socioeconômicas e ambientais da população migrante deliberaram a rápida e dissipação da doença (FUNASA, 2001).

De 2000 a 2011 foi notificada na Região Amazônica 422.858 casos por ano. Esse número deveu-se principalmente à ocupação desordenada das periferias nas cidades da região e também ao aumento da atividade de piscicultura desenfreada que serviu de criadouros do mosquito, devido às construções de tanques artificiais em quintais domiciliares ou nas periferias (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2010). A ocupação desregrada dos espaços periurbanos tem sido relatada como um importante fator para ocorrência de casos de malária em áreas urbanas (OPS, 2010).

Devido à instabilidade do risco de contrair a doença, a probabilidade é medida por índice parasitário anual (IPA) que classifica as áreas de transmissão em alto risco (IPA > 50 casos de malária/1000 habitantes); médio risco (IPA entre 10 e 49,9 casos/1000 habitantes) e baixo risco (IPA < 10 casos/1000 habitantes) (SVS, 2013). Em 2011 no Brasil, 45 municípios foram classificados como de alto risco, 82 de médio risco e 370 de baixo risco (FIGURA 03).

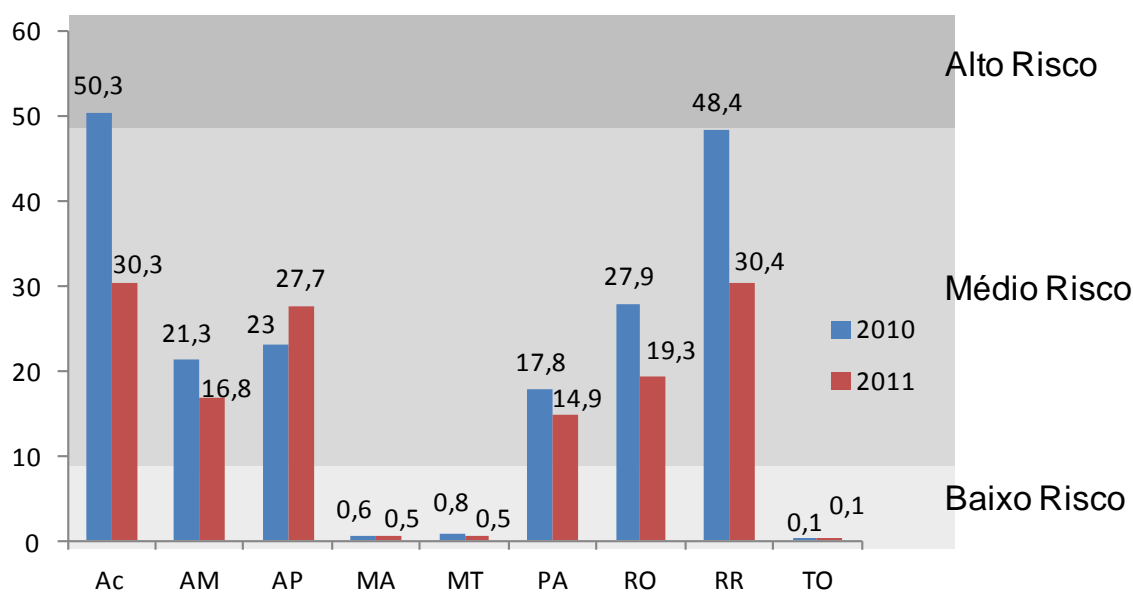


FIGURA 03 - INCIDÊNCIA PARASITÁRIA ANUAL (IPA), POR UNIDADE FEDERADA (UF), NA REGIÃO AMAZÔNICA, ENTRE 2010 E 2011.  
 FONTE: Sivep-Malaria/SVS/MS (2011).

A probabilidade por índice parasitário anual (IPA) apresentou-se de médio risco na Região Amazônica entre os anos 2000 e 2011. Os resultados estão apresentados na FIGURA 04.



FIGURA 04 - INCIDÊNCIA PARASITÁRIA ANUAL (IPA) NA REGIÃO AMAZÔNICA, ENTRE 2000 E 2011.

FONTE: Sinan/SVS/MS (2011).

O programa de controle da malária no país tem como base o diagnóstico precoce e o tratamento adequado e rápido dos doentes. Para o Ministério da Saúde, essa medida é o principal embasamento disponível para o controle da doença (SVS, 2006). De acordo com os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), em 2011, foi registrada no Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM) uma redução de 71,8% de óbitos no país em relação ao ano de 2000. Os dados estão demonstrados na FIGURA 05.

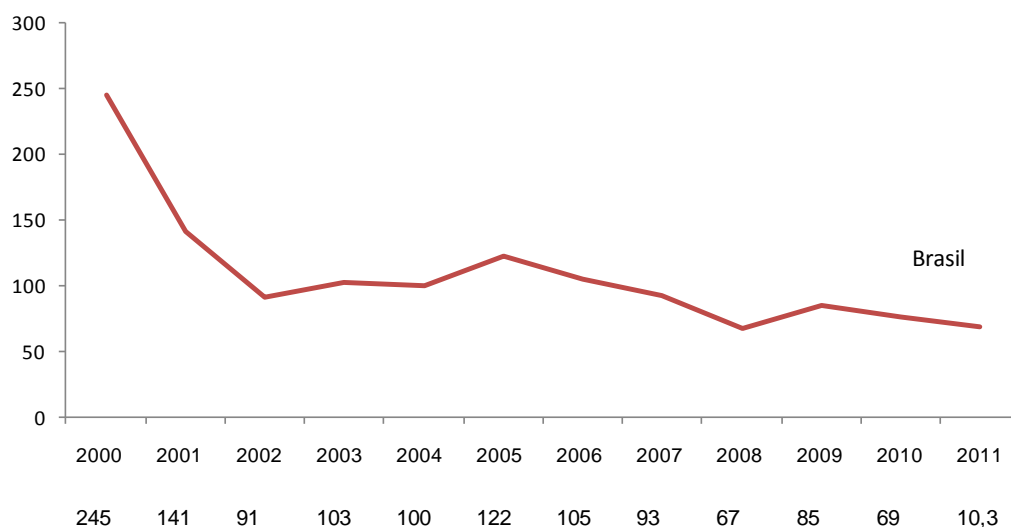


FIGURA 05 - ÓBITOS OCORRIDOS POR MALÁRIA, ENTRE 2000 E 2011.

FONTE: SIM/SVS/MS (2011).

Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), em 2011 também indicaram uma redução de números de óbitos na Região Amazônica de 78,3%, porém, na Região Extra-Amazônica, foi observado um aumento na proporção de óbitos de 35,7% entre 2000 e 2011 (FIGURA 06).

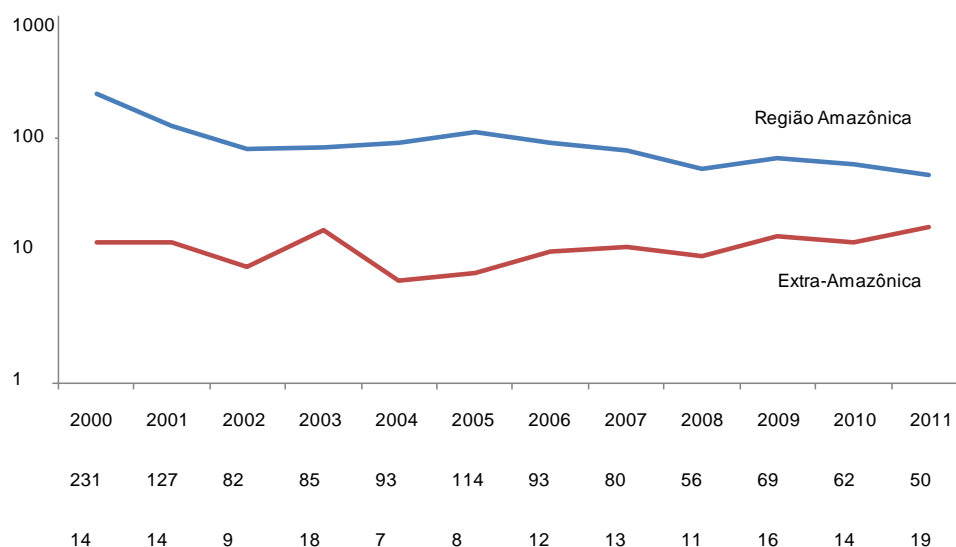


FIGURA 06 - ÓBITOS OCORRIDOS POR MALÁRIA NA REGIÃO AMAZÔNICA E EXTRA-AMAZÔNICA, ENTRE 2000 E 2011.  
FONTE: SIM/MS (2011).

Nos últimos anos, com as medidas de controle intensificadas pelo Ministério da Saúde através da distribuição de cortinados impregnados com inseticida com o intuito de se obter impacto positivo no controle da malária no país, tem-se observado uma redução importante no número de casos da doença em todo país (PNCM, 2004; TADA et al., 2007).

## 2.8 DIAGNÓSTICO DA MALÁRIA

O diagnóstico da malária é tradicionalmente estabelecido pela identificação dos parasitos no sangue periférico por meio da microscopia ótica. Um bom diagnóstico permite a caracterização da espécie, sendo esta caracterização essencial para a definição do esquema terapêutico e acompanhamento do paciente (WHO, 2013). Devido à importância no diagnóstico de malária, vários métodos têm sido estudados e desenvolvidos. Outras tecnologias estão disponíveis em alternativas à microscopia, como, por exemplo, a detecção de antígenos do parasito

empregando anticorpos monoclonais, detecção de anticorpos por sorologia, coloração com laranja de acridina e amplificação molecular (FUNASA, 2001). Porém, alguns desses métodos possuem limitações como: obtenção de resultados quantitativos (parasitemia) para o monitoramento do tratamento por drogas, a necessidade de mão de obra e equipamentos especializados, suporte contínuo, disponibilidades de reagentes e custo elevado (MURRAY et al., 2008).

### 2.8.1 Microscopia ótica - padrão-ouro

O exame microscópico da gota espessa corada com Giemsa é simples, de baixo custo, e possibilita a quantificação da parasitemia (ERDMAN & KAIN, 2008), sendo o método de referência para o diagnóstico de malária. A microscopia tem sido o diagnóstico da malária em laboratórios por mais de um século. Este método é relativamente simples e de baixo custo; porém, seu desempenho é altamente afetado pelas técnicas de preparação de lâminas utilizadas e necessidade de uma excelente formação do microscopista, com uma média sensibilidade em cerca de 50-100 parasitos por microlitro, o que o torna um padrão ouro imperfeito (WONGSRICHANALAI et al., 2007).

A microscopia possui desvantagens ainda na difícil detecção de baixas parasitemias (menos de 5 parasitos/ $\mu$ L de sangue), de infecções mistas, das similaridades morfológicas de plasmódios humanos e símios e entre os estágios dos parasitos de diferentes espécies (NOEDL et al., 2006; CDC, 2008). A qualidade do diagnóstico baseado em microscopia é frequentemente insuficiente para garantir a boa sensibilidade e especificidade do diagnóstico da malária, afetando desfavoravelmente os resultados de saúde e melhor utilização dos recursos (WHO, 2013). Para superar esses obstáculos, testes de diagnóstico rápido (RDT) baseado em imunocromatografia e métodos moleculares tais como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram introduzidos nos últimos anos (WILSON 2012).

### 2.8.2 Testes imunocromatográficos rápidos

Desenvolvidos para o diagnóstico de malária humana, os testes diagnósticos rápidos (RTD, *Rapid Diagnostic Tests*) são disponíveis comercialmente em kits sendo de fácil utilização e leitura. Em 2012, foi relatado pela OMS que 41 dos 44

países com malária endêmica da região africana e 49 de 55 países de outras regiões, adotaram uma política de fornecer diagnóstico parasitológico para todas as faixas etárias. A porcentagem de casos suspeitos de malária no setor público que receberam o teste diagnóstico rápido aumentou de 37% para 61% na região africana e de 44% para 64% globalmente (WHO, 2013).

O diagnóstico rápido é baseado na detecção de antígenos circulantes do parasita por meio de anticorpos monoclonais através de uma imunocromatografia em membrana de nitrocelulose, onde a amostra migra por capilaridade (BELL et al., 2006). A presença do antígeno indica uma mudança de coloração da fita, produzindo uma linha visível se o alvo estiver presente na amostra (MURRAY et al., 2008). Os anticorpos monoclonais específicos para *P. falciparum* detectam a HRP-2 (*histidine-rich protein-2*) localizada na superfície da membrana do eritrócito infectado ou a lactato desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH) que é uma enzima final da via glicolítica do parasito. Porém, limita o uso dos testes o fato de a proteína pLDH ser uma enzima final na via glicolítica do parasito, portanto, sendo encontrada apenas em parasitos viáveis (MARX et al., 2005) e a proteína HRP-2 ser um metabólito residual que ocasiona a persistência dos antígenos HRP-2 em circulação após o tratamento, assim como, deleções de porções dos genes resultando em proteínas sem os epítomos alvo (KUMAR et al., 2013).

### 2.8.3 Métodos moleculares

A partir da década de 80, surgiram às técnicas moleculares que desencadearam novas perspectivas para o diagnóstico de várias doenças infecto-parasitárias. A PCR é uma técnica molecular que oferece uma alternativa à microscopia, e tem mostrado, em muitos casos, ter sensibilidade e especificidade superior aos testes descritos anteriormente (MENS et al., 2007). A PCR é capaz de detectar o DNA ou RNA do parasito, tendo como princípio o uso de dois pares de iniciadores que cercam uma sequência alvo do patógeno que em companhia da enzima Taq polimerase, são usados em consecutivos ciclos de desnaturação e extensão do DNA gerando bilhões de cópias da sequência alvo.

A PCR para o diagnóstico de malária foi descrita pela primeira vez por Walters & McCutchan (1989) baseando-se em sequências espécies-específicas dentro da região RNA ribossomal 18S dos plasmódios. Considerando que o gene é

um bom alvo para a diferenciação de *Plasmodium* por apresentar regiões polimórficas circundadas por regiões conservadas que facilita o desenho de iniciadores gênero e espécies-específicas (LAL et al., 1989; SNOUNOU et al., 1993; DAS, 1995), vários protocolos têm sido descritos baseados nesta mesma região (SNOUNOU et al., 1996; RUBIO et al., 1999; PARAJUI et al., 2009). Com o acesso ao mapeamento dos genomas dos plasmódios e seus vetores específicos, essas informações podem colaborar para o aumento no controle e diminuição da incidência da doença (GREENWOOD, 2002).

Outra variação da técnica molecular para diagnóstico baseado na Reação em Cadeia da Polimerase foi o desenvolvimento da PCR em Tempo Real que teve sua aplicação para detecção de malária descrita pela primeira vez em 2001 e 2002 (HERMSEN et al., 2001; LEE et al., 2002). A PCR em Tempo Real oferece algumas vantagens em relação a PCR convencional, enquanto que na PCR convencional a visualização do produto é realizada na fase platô após o término da reação, na PCR em Tempo Real o produto pode ser detectado na fase exponencial da reação. Desse modo, a PCR em Tempo Real também pode ser utilizada para a quantificação exata do parasito no sangue dos indivíduos infectados (KAMAU et al., 2011), sendo então denominada PCR quantitativa ou qPCR. Além disso, alguns protocolos foram desenvolvidos para utilizar apenas um par de iniciadores e através de curvas de dissociação é possível o diagnóstico específico das espécies que infectam o homem (PERANDIN et al., 2004; MANGOLD et al., 2005).

Atualmente, existem vários testes publicados para detecção de *Plasmodium* spp. por meio de qPCR (HERMSEN et al., 2001; LEE et al., 2002; WILSON, 2012), sendo que alguns estão sendo desenvolvidos para utilização em ambientes de baixa densidade tecnológica (ZHANG & OZDEMIR, 2009; WU et al., 2011). O IBMP, em conjunto com o CDC (EUA), o IPEPATRO (Rondônia) e o Instituto Nacional de Saúde (Moçambique), está trabalhando para estabelecer um teste qPCR baseado na plataforma ABI7500 para ser utilizado no serviço nacional de saúde em Moçambique.

Os métodos moleculares possuem algumas desvantagens em relação aos testes rápidos ou de microscopia: os reagentes da qPCR são termossensíveis, os equipamentos são caros e em sua maioria, de grande porte e complexos de operar.

Para resolver a questão da estabilidade dos reagentes em temperatura ambiente, existem alternativas como a liofilização ou gelificação (retirada parcial da

água da amostra). Enquanto que na liofilização aplica-se vácuo sem adição de moléculas protetoras, a técnica da gelificação consiste na adição de agentes estabilizantes e moléculas antioxidantes antes de submeter à amostra ao vácuo (BIOTOOLS B&M LABS, 2002). Desta forma, aproximadamente 15-20% das moléculas de água permanecem na amostra, diminuindo o efeito inibitório do ressecamento na atividade enzimática necessária para a PCR.

#### 2.8.4 Testes *point of care* baseados em microfluídica

Para solucionar o problema do uso de equipamentos caros e especializados e que necessitam de condições adequadas de laboratório e pessoal treinado, diversas técnicas de nanotecnologia têm sido usadas para confinar todas as etapas necessárias para uma determinada reação em um único dispositivo. A coleção destas técnicas e soluções é um conceito que começou a se desenvolver no final dos anos 1990, e é atualmente conhecida como “*lab-on-a-chip* (LOC)” ou “*total micro analyses*” ( $\mu$ TAS) (ZHANG & OZDEMIR, 2009).

A técnica molecular de qPCR em chip baseada em microfluídica tem sido validada para vários testes diagnósticos. A LOC apresenta-se como uma técnica de operação simples, de preço acessível que utiliza baixo volume de amostra e reagentes, proporcionando pouco tempo de reação e contribuindo para a ausência de reação cruzada, fazendo com que esses dispositivos sejam adequados para uso clínico (WU et al., 2011). Tem o potencial de combinar a alta sensibilidade de um teste molecular com a possibilidade de realização do diagnóstico próximo ao paciente (*point of care* - POC) em condições precárias de campo, onde poucos recursos técnicos são disponíveis.

O baixo custo é pré-requisito para a fabricação em massa dos dispositivos microfluídicos aplicáveis em plataformas comercializadas (LEE, 2013). A maioria dos microcanais e microcâmeras são fabricados de materiais como silício (CHO et al., 2006) ou vidro (PRAKASH et al., 2007). Polímeros como polidimetilsiloxano (PDMS), policarbonato (PC) (WANG et al., 2006) e polimetilmetacrilato (PMMA), têm sido comumente utilizados como materiais alternativos (TSAI & SUE et al., 2006).

Na técnica de microfluídica para o sistema *lab-on-a-chip*, é utilizado um revestimento para diferenciar superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas. Nesse contexto, o interior de cada canal de reação permanece hidrofílico, enquanto que o

revestimento da superfície exterior é hidrofóbico (Noh et al., 2005). Esse diferencial hidrofílico e hidrofóbico de revestimento dos canais facilita uma leitura precisa e promove uma retenção da solução de PCR em canais individuais evitando contaminação cruzada (MATSUBARA et al., 2005).

Técnicas de imagem óptica, em geral, oferecem vantagens importantes para o desenvolvimento de diagnóstico de POC. As imagens ópticas podem fornecer informação macroscópica e microscópica de alta resolução, com diagnóstico rápido e que apresentam precisão. Técnicas de imagem óptica é uma tecnologia com sistema eletrônico óptico, fibras ópticas e sistemas microeletromecânico (MEMS), com capacidade de miniaturizar a plataforma de imagem óptica bem como reduzir seus custos (MAO & HUANG, 2012). Além do mais, a integração do sistema de microfluídica com o surgimento da plataforma de detecção óptica, tem sido uma perspectiva tecnológica para o avanço do diagnóstico *lab-on-a-chip* para uso de POC (ZHU et al., 2013).

Em geral, nos sistemas LOC os sinais de leitura dos chips são transduzidos de forma óptica ou eletroquímica e são realizados de duas formas; uma chamada transdução etiquetada ou não etiquetada. A mais usual é a forma etiquetada que utiliza uma partícula ligada ao receptor, a qual serve para diferenciar os receptores das demais substâncias. Há três formas diferentes para detecção dessas etiquetas: detecção óptica, eletroquímica e magnética. Dessas, a mais utilizada é a detecção óptica, onde uma câmera propicia a captação óptica em dispositivos POC com determinação colorimétrica ou por fluorescência. Neste sistema, a etiqueta é um marcador fluorescente que se integra no DNA sendo detectado.

Alguns destes sistemas possuem sensor CMOs (*Complementary metal-oxide semiconductor*) de 3.2 megapixels para detecção dos biomarcadores fluorescentes e um processador digital de sinais para processamento da imagem, permitindo a detecção da amplificação do DNA pela PCR em Tempo Real (GERVAIS et al., 2011). A imagem desse sistema possui uma resolução em escala de submicrômetro denominada super-resolução *multi-frame pixel* (BISHARA et al., 2011). Imagens obtidas por meio desta resolução melhoraram a capacidade de captar imagem em amostras de sangue humano infectados com *P. falciparum* (MUDANYALI, BISHARA & OZCAN, 2011).

Q3 é uma plataforma compacta projetada pela *STMicroelectronics* para ser facilmente utilizado por um técnico não qualificado em um ponto de atendimento.

Comparado com instrumentação de laboratório padrão (como por exemplo, o ABI7500, da Life Technologies), o custo acessível permite que ele seja utilizado como uma plataforma para testes de baixa demanda/processividade. A FIGURA 07 mostra a plataforma Q3 e seu chip de reação, que integra a tecnologia de PCR, o controle da temperatura elétrica, iluminação e detecção óptica através de um sistema de resolução em escala de submicrômetro denominada *super-resolução multi-frame pixel* (BISHARA et al., 2011).

O chip (FIGURA 07 B) é um dispositivo descartável, composto de uma pastilha de silício fabricado usando a tecnologia dos semicondutores, selado com uma estrutura transparente formando seis câmaras de reação. A plataforma Q3 (FIGURA 07 A) conduz o chip a controlar a temperatura da reação, por meio de aquecedores integrados e sensores de temperatura. Este equipamento permite a realização de reações com baixos volumes, em aproximadamente 1/3 do tempo de uma reação PCR em Tempo Real disponíveis no mercado, com capacidade de detecção *multiplex* em até dois canais de fluorescência (RAMPAZZO et al., 2014).

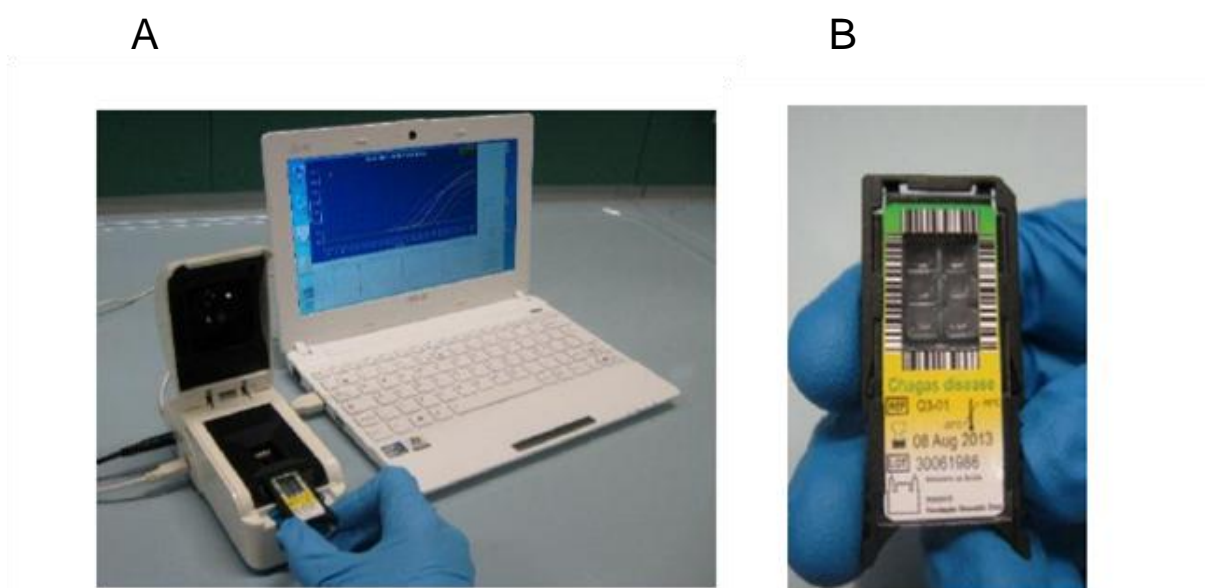


FIGURA 07 - PLATAFORMA Q3 CONECTADA VIA USB EM UM COMPUTADOR PARA VISUALIZAÇÃO DO RESULTADO DA PCR EM TEMPO REAL (A); CHIP PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA Q3 (B).

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar o diagnóstico qualitativo de malária através de uma PCR em Tempo Real utilizando plataforma Q3, uma nova plataforma portátil e estável em temperatura ambiente.

#### 5.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma qPCR líquida para detecção de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* na plataforma Q3.
- Desenvolver uma qPCR gelificada para detecção de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* na plataforma Q3.
- Estabelecer uma qPCR multiplex para detecção de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* na plataforma Q3 utilizando o sistema TaqMan.
- Comparar os resultados das reações de detecção desenvolvidas na plataforma Q3 com a qPCR desenvolvida na plataforma ABI7500 (Life Technologies).
- Comparar sensibilidade analítica e reprodutibilidade entre os ensaios desenvolvidos na plataforma Q3 com o sistema TaqMan.

## 6 METODOLOGIAS

### 6.1 AMOSTRAS UTILIZADAS

#### 6.1.1 Amostras utilizadas para o desenvolvimento e validação dos testes

As amostras foram cedidas por dois grupos colaboradores para o desenvolvimento do teste diagnóstico. O primeiro grupo de amostras foi cedido pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC-USA) e consistiu no DNA obtido de *Pool* de amostras clínicas de pacientes positivos para *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, previamente caracterizado por PCR convencional. O DNA destas amostras clínicas cedidas pelo CDC foi extraído utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) seguindo as especificações do fabricante e posteriormente enviados para o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

O segundo grupo foi de amostras de cepas de cultura *in vitro* do parasito *P. falciparum* cedidas pelo Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais de Rondônia (IPEPATRO-Rondônia) caracterizadas como positivas pela técnica de microscopia ótica.

O *Pool* de amostras de DNA enviadas pelo CDC foram diluídas a razão 1:10 e submetidas a um quantificador automático NanoVue Plus (GE healthcare) com leitura da densidade óptica a 260nm ( $DO_{260}$ ) para avaliar a quantidade de DNA. Para os testes realizados neste trabalho, foram utilizadas nas reações concentrações de DNA de 4,6 e 0,046 ng/ $\mu$ L para *P. vivax*, 9,8 e 0,98 ng/ $\mu$ L para *P. falciparum* e 1,4 ng/ $\mu$ L para *P. malariae*.

#### 6.1.2 Preparo das amostras para obtenção das curvas padrão

Foram utilizadas as amostras de culturas *in vitro* do parasito *P. falciparum* cedidas pelo IPEPATRO (Fiocruz-RO) e extraído o DNA genômico que foi utilizado para gerar as curvas padrão para PCR em Tempo Real. Inicialmente, preparou-se a papa de hemácias nas condições de lavagem a seguir: centrifugou-se 10 mL de sangue fresco tipo O negativo por 5 minutos a 3.000 rpm. Após centrifugação descartou-se o sobrenadante e inclusive o anel de leucócitos e adicionou-se a

mesma quantidade de papa de hemácias ressuspensa em PBS 1x. Repetiram-se as etapas de adição de papa de hemácias seguidas de centrifugação por quatro vezes. Adicionou-se então 150 microlitros da cultura parasitária (2000 parasitos/ $\mu\text{L}$ ) em 2850 $\mu\text{L}$  de papa de hemácias (213,75 parasitos/ $\mu\text{L}$ ). Posteriormente, foi realizada diluição seriada (razão 1:2) de papa de hemácia obtendo sete concentrações: 100 parasitos/ $\mu\text{L}$ ; 50 parasitos/ $\mu\text{L}$ ; 25 parasitos/ $\mu\text{L}$ ; 12,5 parasitos/ $\mu\text{L}$ ; 6,25 parasitos/ $\mu\text{L}$ ; 3,12 parasitos/ $\mu\text{L}$  e 1,5 parasitos/ $\mu\text{L}$ . As amostras foram diluídas em sangue humano total não infectado, de forma que o gene humano de referência não sofresse alterações decorrentes das diluições. O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit de Extração Genérico do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) seguindo instruções do fabricante.

## 6.2 PCR EM TEMPO REAL

Para o protocolo de PCR em Tempo Real desenvolvido neste trabalho, utilizou-se iniciadores descritos pelo CDC (TABELA 01) (JOHNSTON et al., 2006) para aplicação em *nested* PCR, gentilmente cedidos ao IBMP para adaptação de PCR em Tempo Real na plataforma ABI7500 e Q3. As reações para amplificações e a detecção da fluorescência foram conduzidas em um equipamento protótipo denominado "Q3", desenvolvido pela empresa franco-italiana *STMicroelectronics*, tendo como referência os resultados da plataforma ABI7500 (Life Technologies) já padronizados pelo grupo de Pesquisa e Desenvolvimento do IBMP (GÓES & KRIEGER, COMUNICAÇÃO PESSOAL).

As sequências dos conjuntos de iniciadores e sondas (TABELA 01) foram selecionadas tendo como alvo o gene 18S que codifica RNA ribossomal. Para a detecção do gene RNase P do DNA humano no Q3, foi utilizado a sonda RNase P (Biosearch Technologies), com o repórter HEX ("Canal\_HEX"), possibilitando a utilização em multiplex com as sondas *P. falciparum*, *P. malariae* ou *P. vivax* (Biosearch Technologies) com o repórter FAM ("Canal\_FAM").

TABELA 01 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E SONDAS GÊNERO-ESPECÍFICAS PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *Plasmodium* spp UTILIZADOS PARA REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

ESPÉCIES	PARES DE BASES	ÓLIGONUCLEOTIDEOS	PARES DE BASES	SEQUÊNCIA 5'- 3'	Nº DE ACESSO NCBI
<i>Plasmodium</i> spp.	-	Plasmo1 F (forward)	24 pb	5'- GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA - 3'	KF018665
		Plasmo2 R (reverse)	26 pb	5'- AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA - 3'	KF018665
<i>P. falciparum</i>	205 pb	Sonda Fal	31 pb	5' FAM - AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT - 3'*	KF691781
<i>P. viviax</i>	120 pb	Sonda Viv	35 pb	5' FAM - AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTC - 3' *	KC750243.1
<i>P. malariae</i>	144 pb	Sonda Mal	19 pb	5' FAM - CTATCTAAAAGAAACTCAT - 3' **	AF488000.1
RNase P	65 pb	RNase P F (Forward)	19 pb	5' - AGATTTGGACCTGCGAGCG - 3'	U77665.1
		RNase P R (Reverse)	20 pb	5' - GAGCGGCTGTCTCCACAAGT - 3'	CP000248.1
		Sonda RNase P	23 pb	5' – HEX - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG - 3' *	U77665.1

Nota: BHQ1 (\*) E MGBNFQ (\*\*)

### 6.2.1 Controle negativo e controle interno

Tanto nas reações de qPCR na plataforma ABI7500 quanto as reações de qPCR no chip na plataforma Q3, utilizou-se como controle negativo e controle interno da reação o gene da enzima RNase P humana.

### 6.2.2 PCR em Tempo Real para a plataforma ABI7500 Real Time PCR System (Life Technologies)

As reações foram preparadas com 5 µL de DNA genômico para um volume final de 25 µL, contendo 8,5 µL de Master Mix IBMP 3X, 0,2 µM de cada iniciador para amplificação de *Plasmodium* spp. (Plasmo 1 *forward* e Plasmo 2 *reverse*), 0,4 µM dos iniciadores RNase P *forward* e *reverse* (F/R), 0,08 µM de sondas espécies específicas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, 0,02 µM de sonda para o controle endógeno RNase P e água q.s.p. As condições do PCR em Tempo Real foram padronizadas como segue: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As amostras de DNA foram testadas em duplicata no ABI7500 nas concentrações finais de 4,6 ng/µL para *P. vivax*, 9,8 e 0,98 ng/µL para *P. falciparum* e 1,4 ng/µL para *P. malariae*.

### 6.2.3 PCR em Tempo Real para reação líquida no chip na plataforma Q3

A reação de PCR em Tempo Real no Q3 para reação líquida no chip foi preparada utilizando 1,67µL de Master Mix IBMP 3X, 1,2 µM de iniciadores Plasmo 1 e Plasmo 2; 0,24 µM das sondas específicas para as subespécies de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, 2 µM de iniciador RNase P F/R; 0,1 µM de sonda para amplificação da RNase P e 1 µL de DNA genômico na concentração final de 4,6 e 0,046 ng/µL para *P. vivax*, 9,8 e 0,98 ng/µL para *P. falciparum* e 1,4 ng/µL para *P. malariae*, e água q.s.p para um volume final de 5 µL.

A técnica de PCR em Tempo Real para amplificação espécie-específica no Q3 foi submetida a modificações quanto à redução do volume e concentração de oligonucleotídeos. A TABELA 02 descreve as diferentes condições de concentrações

dos oligonucleotídeos (iniciadores e sondas) e de ciclagens testadas durante o desenvolvimento do teste.

TABELA 02 - DIFERENTES CONDIÇÕES DE VARIAÇÃO NAS CONCENTRAÇÕES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS DURANTE A OTIMIZAÇÃO DO TESTE DIAGNÓSTICO

CONCENTRAÇÃO	SONDA ESPECÍFICA PARA <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> E <i>P. malariae</i>	INICIADORES Plasmo 1 E Plasmo 2	CONCENTRAÇÃO	INICIADOR RNase P (F/R)	SONDA RNase P
1X	0,08 µM	0,4 µM	1x	0,4 µM	0,02 µM
2X	0,16 µM	1,2 µM	5x	2 µM	0,1 µM
3X	0,24 µM	1,2 µM	5x	2 µM	0,1 µM
6X	0,48 µM	1,2 µM	5x	2 µM	0,1 µM
7X	0,56 µM	1,2 µM	5x	2 µM	0,1 µM
8X	0,64 µM	1,2 µM	5x	2 µM	0,1 µM
9X	0,72 µM	1,2 µM	5x	2 µM	0,1 µM

As condições de ciclagem da PCR em Tempo Real no chip realizadas no Q3 foram otimizadas ao longo dos experimentos alterando-se o tempo de extensão (TABELA 3) e foram padronizadas como segue: 99°C por 40 segundos seguidos de 45 ciclos de 99°C por 20 segundos e 64°C por 60 segundos. A plataforma Q3 permite também alteração dos parâmetros ópticos para otimização da detecção da fluorescência da reação. Os parâmetros ópticos que podem ser manipulados são a potência da lâmpada (“led power”, de 7 a 10), o ganho do sinal (“gain”, de 5.31 a 16.03), e a taxa de captura da imagem (“frame rate f/s”, de 0.5 a 0.25).

TABELA 03 - DIFERENTES CONDIÇÕES DE CICLAGENS UTILIZADAS DURANTE A OTIMIZAÇÃO DO TESTE DIAGNÓSTICO

CICLAGENS	99°C/40 seg, 45 ciclos de 99°C/20 seg e 64°C/30 seg.	99°C/40 seg, 45 ciclos de 99°C/20 seg e 64°C/60 seg.

#### 6.2.4 PCR em Tempo Real no Q3 para reação gelificada no chip

A reação gelificada no chip para PCR em Tempo Real no Q3 foi preparada para um volume final de 5  $\mu$ L, substituindo a água por 1  $\mu$ L de mistura de gelificação (MG), então submetido a ciclos de vácuo conforme especificações (BIOTOOLS B&M LABS, 2002) ( FIGURA 08) e armazenado a 4°C por 24 horas para uso.

Um passo que antecede a realização da qPCR é a hidratação da reação com uma mistura de 1  $\mu$ L de DNA genômico (diluído 1:10) mais 3  $\mu$ L de água. No Q3, esta hidratação é realizada durante os primeiros 40 segundos a 99°C.

As condições de ciclagem da PCR em Tempo Real no chip gelificado, realizadas no Q3, foram padronizadas como segue: 99°C por 40 segundos seguidos de 45 ciclos de 99°C por 20 segundos e 64°C por 60 segundos.

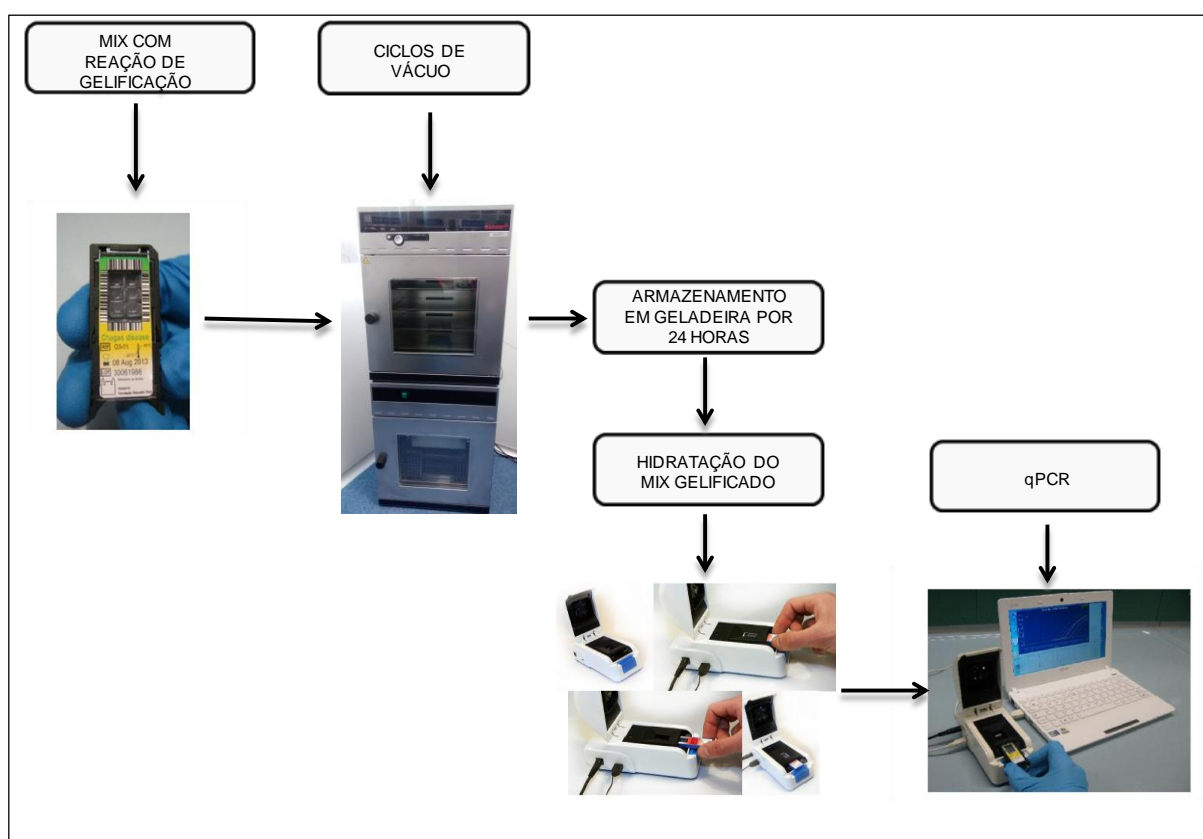


FIGURA 08 - ESQUEMA DO PROCESSO DE GELIFICAÇÃO, E POSTERIOR USO PARA AS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA Q3.

### 6.2.5 Sensibilidade e reprodutibilidade analítica do controle positivo do teste diagnóstico Q3 e Determinação do Limite de Detecção Ótico (LOD)

A sensibilidade analítica foi avaliada com experimentos realizados na plataforma Q3 por meio da determinação do limite ótico de detecção (LOD). Foi

utilizado o DNA extraído das amostras de cultura de *P. falciparum* com quantidades conhecidas de parasitos tendo como referência os resultados do limite de detecção obtidos da plataforma ABI7500 pelo grupo de Pesquisa e Desenvolvimento do IBMP.

Para determinação do limite de detecção foram realizadas quatro repetições dos ensaios de PCR em Tempo Real da curva padrão utilizando-se reações preparadas na concentração padrão dos reagentes oligonucleotídeos. As menores concentrações de DNA que produziram resultados positivos em todas as repetições foram definidas como o LOD inicial.

A reprodutibilidade interexperimentos, foi medida com a dispersão de resultados dos ensaios em estudo, em aferições de replicatas de uma mesma amostra para cada espécie; *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*.

#### 6.2.6 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5.0.1, através dos testes de regressão linear, teste “*t*” de Student e One Way ANOVA; pós-teste Tukey. Valores de “*p*” inferiores a 0,05 foram considerados significativos para o teste.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 TESTES INICIAIS PARA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DE qPCR NO CHIP

#### 7.1.1 Testes iniciais para padronização dos ensaios com DNA *P. falciparum*

Este estudo foi iniciado a partir dos testes de PCR em Tempo Real para diagnóstico de malária na plataforma ABI7500, já padronizados no IBMP, tanto em formato líquido quanto gelificado. A FIGURA 09 exemplifica os resultados das amplificações das reações líquidas (FIGURA 09 A) e gelificadas (FIGURA 09 B) na plataforma ABI7500.

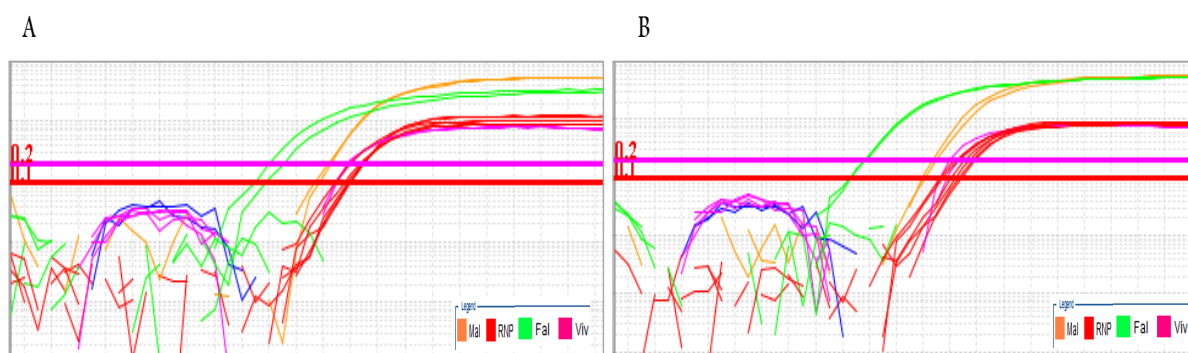


FIGURA 09 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL - REAÇÃO LÍQUIDA (A); CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL- REAÇÃO GELIFICADA (B).  
Nota: *P. malariae* (Mal) linhas laranja; RNase P (RNP) linhas vermelhas; *P. falciparum* (Fal) linhas verdes; *P. vivax* (Viv) linhas rosas. As linhas vermelhas na horizontal representam o *threshold* calculado para cada reação de detecção do DNA de *Plasmodium* spp. e as linhas rosas na horizontal o *threshold* calculado para a reação de detecção do gene de RNase P humana.

Experimento similar foi realizado a fim de reproduzir os resultados usando o termociclador portátil Q3. Como amostra, utilizou-se primeiramente a diluição 1:10 do DNA de *P. falciparum* extraído do *pool* de amostras clínicas enviadas pelo CDC (concentração estoque de 9,8 ng/ $\mu$ L na reação). Partindo da mesma concentração da mistura de reação padrão (mistura de reação padronizada para o ABI7500), foi preparada a reação de PCR em Tempo Real no chip, tanto para reação líquida quanto para a reação gelificada em um volume final de 5  $\mu$ L.

Sun et al. (2013), otimizaram as condições de gelificação para qPCR em chip testando cinco volumes diferentes e verificaram que o melhor desempenho da reação gelificada foi obtido com volumes finais entre 4,2 e 4,9  $\mu$ L. No presente

estudo, também foram realizados testes para otimização do volume final da reação, e estes indicaram a possibilidade de utilização de até 3  $\mu\text{L}$  de volume final. Porém, em linha com os resultados de Sun et al. (2013), o volume final mais adequado para a reação gelificada foi de 5  $\mu\text{L}$  (dados não mostrados).

As condições de ciclagem dos testes iniciais foram de 99°C por 40 segundos seguidos de 45 ciclos de 99°C por 20 segundos e 64°C por 30 segundos. Os parâmetros óticos foram calibrados em led power 7, ganho de câmera 5.31 e captura de imagem de 0.25 f/s (fotos por segundo) para o canal de leitura da fluorescência FAM (detecção de cada uma das três espécies de plasmódios *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*). Para o canal de leitura da fluorescência HEX (detecção da RNase P), foi calibrado led power em 10, ganho de câmera 5.31 e captura de imagem de 0.25 f/s. Confirmando a expectativa, houve detecção do DNA de *P. falciparum* tanto para a reação líquida quanto para a gelificada na plataforma Q3 (FIGURA 10). Entretanto, a falta de reprodutibilidade entre as réplicas (linhas amarelas) e uma baixa amplitude do platô de fluorescência na fase estacionária (diferença entre a fluorescência do platô na fase estacionária e a fluorescência basal) sugeriu indicava que a reação precisava ser e otimizada (FIGURA 10).

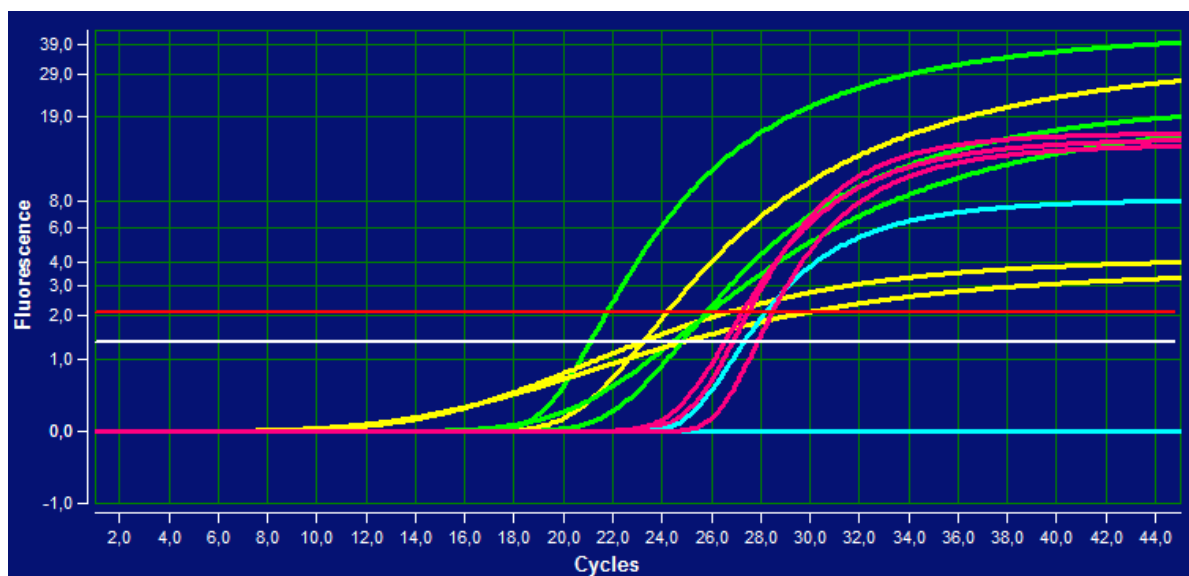


FIGURA 10 - FIGURA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *P. falciparum* DA REAÇÃO PADRÃO DE MENOR CONCENTRAÇÃO DE INICIADORES E SONDA.

Nota: Detecção *P. falciparum*: reação gelificada (linha amarela); reação líquida (linha verde). Detecção RNase P: reação gelificada (linha azul); reação líquida (linha rosa). Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (1,6) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (4,2) calculado para a reação do gene de RNaseP humana.

É importante ressaltar que o algoritmo de cálculo do software da plataforma Q3 utiliza os valores máximos de fluorescência de cada curva para determinar a fluorescência basal e, conseqüentemente, o valor de *threshold*. Desta forma, fases estacionárias com baixa fluorescência diminuem a sensibilidade da reação e, portanto, não são desejáveis.

Com o intuito de intensificar a detecção do alvo e aumentar a amplitude de fluorescência obtida no teste inicial (FIGURA 10), preparou-se uma reação aumentando em três vezes a concentração de iniciadores Plasmio 1 e Plasmio 2 (de 0,4 para 1,2  $\mu\text{M}$ ), e sonda para *P. falciparum* (de 0,08 para 0,24  $\mu\text{M}$ ) Nesta reação, foram adicionados também os iniciadores e sonda para o controle endógeno RNase P.

Foram utilizadas as mesmas condições de ciclagem e parâmetros óticos para a detecção do DNA de *P. falciparum* (FAM), mas alterando os parâmetros óticos para fluorescência RNase P (HEX) como segue: led power de 7 para 10, e o ganho de câmera de 5.31 para 16.03; e captura de imagem de 0.25 f/s.

Analisando a amplificação obtida para a reação com maior (3X) concentração de iniciadores e sonda para *P. falciparum* e com parâmetros óticos modificados (FIGURA 11 A), é possível observar uma melhor detecção em relação à condição anterior (FIGURA 11 B).

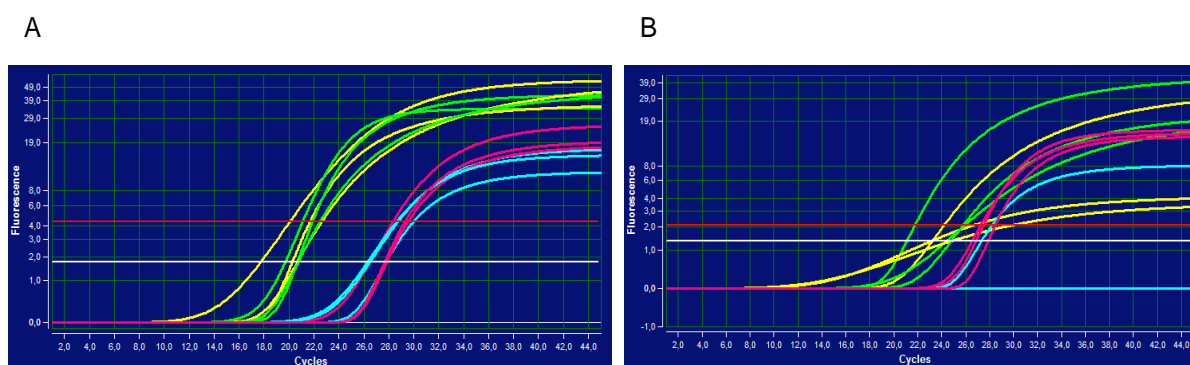


FIGURA 11 - FIGURA DE AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *P. falciparum* CONTENDO 3X INICIADORES E SONDA (A); AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE *P. falciparum* CONTENDO 1X INICIADORES E SONDA (B).

Nota: Detecção *P. falciparum*: reação gelificada (linha amarela); reação líquida (linha verde). Detecção RNase P: reação gelificada (linha azul); reação líquida (linha rosa). (A) Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (1,7) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (4,2) calculado para a reação do gene de RNaseP humana; (B) Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (1,6) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (4,2) calculado para a reação do gene de RNaseP humana.

Dentre as melhoras observadas, podemos citar que as réplicas são similares, a curva de amplificação tem o formato sigmoidal característico, e a amplitude da fluorescência do platô da fase estacionária é satisfatória.

É possível observar também que as reações para detecção de *P. falciparum* ou RNase P não sofrem alteração significativa quando são gelificadas por 24 horas (FIGURA 11). A TABELA 04 resume os resultados obtidos com pelo menos 3 chips de cada condição experimental testada nos experimentos mostrados na FIGURA 11. É possível observar que o aumento da concentração de iniciadores e sondas para *P. falciparum* resultou em um ganho de sensibilidade (detecção da mesma amostra em um Ct menor), e que este ganho se manteve quando as reações foram gelificadas.

Alemayehu et al. (2013), em ensaios de PCR em Tempo Real na plataforma ABI7500, amplificaram DNA de *P. falciparum* utilizando o sistema TaqMan, com iniciadores em concentrações de 0,2  $\mu$ M e 0,4  $\mu$ M, e verificaram que a eficiência do teste foi diretamente proporcional à concentração dos iniciadores. Da mesma forma, os resultados obtidos no presente estudo, (FIGURA 11 e TABELA 04), mostram que concentrações maiores de iniciadores produzem melhores resultados para detecção do parasito. Entretanto, este aumento de concentração tem um limite, pois quando foram utilizadas maiores concentrações de sondas (até nove vezes a concentração inicial; ver TABELA 2), observou-se inibição da qPCR (dados não mostrados).

TABELA 04 - MÉDIA DOS Ct PARA *P. falciparum* E RNase P PARA AS REAÇÕES COM CONCENTRAÇÃO 1X E 3X DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

OLIGONUCLEOTÍDEOS A 1X		
REAÇÃO	<i>P. falciparum</i>	RNase P
GELIFICADA	23,33 $\pm$ 0,72	26,60 $\pm$ 0
LÍQUIDA	24,06 $\pm$ 2,14	26,93 $\pm$ 0,44
OLIGONUCLEOTÍDEOS A 3X		
REAÇÃO	<i>P. falciparum</i>	RNase P
GELIFICADA	21,20 $\pm$ 0,51	26,73 $\pm$ 0,41
LÍQUIDA	21,40 $\pm$ 0,26	27,16 $\pm$ 0,26

Seguindo a lógica observada de aumento da qualidade e sensibilidade da reação mediante aumento da concentração de iniciadores e sondas (FIGURA 11 e TABELA 04), e de acordo com resultados já obtidos pelo grupo desta pesquisa

(RAMPAZZO et al. 2014), foram preparadas reações líquidas e gelificadas contendo reagentes para detecção de *P. falciparum* como na FIGURA 11 A, porém acrescido de cinco vezes (5X) a concentração de iniciadores e sonda para detecção da RNase P (TABELA 02).

O experimento foi realizado em duplicata para cada amostra em 09 chips distintos; totalizando 18 réplicas de uma mesma amostra. Foi utilizada a mesma ciclagem e mantidos os mesmos parâmetros óticos da FIGURA 11 (led power 7, ganho de câmera 5.31 e captura imagem de 0.25 f/s para *P. falciparum* e led power 10, ganho de câmera 16.03 e captura de imagem de 0.25 f/s para RNase P). Do total das 18 réplicas, foi observado que em 16 delas houve um aumento significativo na detecção da amplificação do sinal RNase P, tanto para as reações líquidas quanto para as gelificadas (FIGURA 12).

A reação contendo cinco vezes mais oligonucleotídeos para RNase P resultou em um melhor desempenho na detecção da amplificação deste alvo (FIGURA 12).

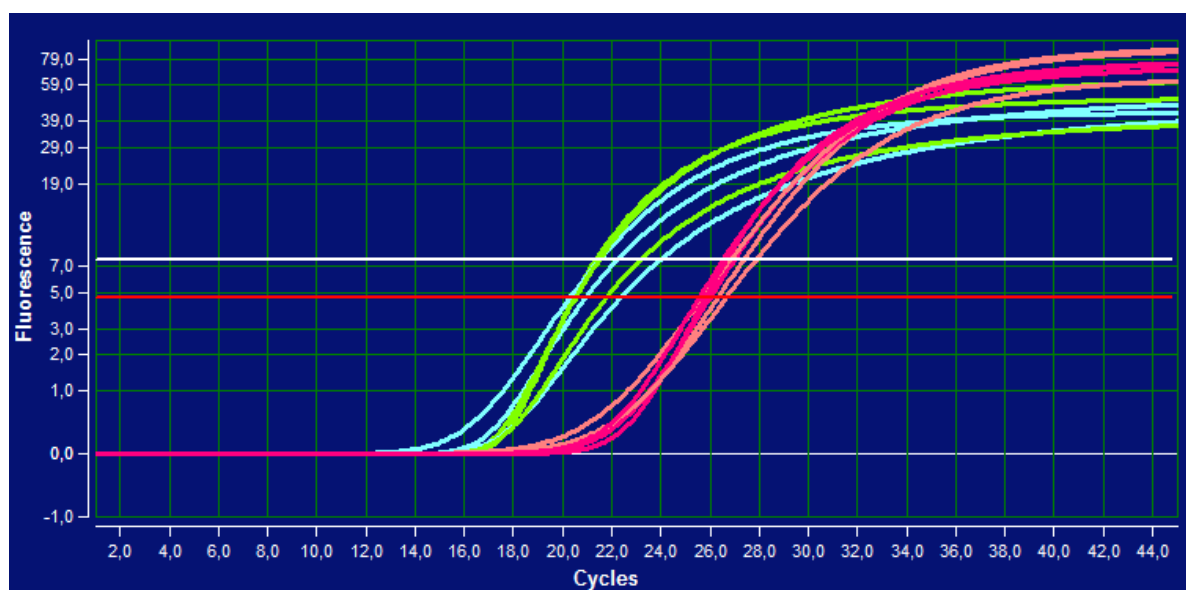


FIGURA 12 - AMPLIFICAÇÃO DAS TRIPLICATAS TÉCNICAS DE DNA *P. falciparum* COM AS CONCENTRAÇÕES DE TRÊS VEZES (3X) E CINCO VEZES (5X) OLIGONUCLEOTÍDEO PARA *P. falciparum* E RNASE P RESPECTIVAMENTE.

Nota: Detecção *P. falciparum*: reação gelificada (linha azul); reação líquida (linha verde). Detecção RNase P: reação gelificada (linha rosa claro); reação líquida (linha rosa escuro). (A) Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (4,5) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (5,7) calculado para a reação do gene de RNaseP humana.

É possível observar que todas as réplicas amplificaram e a amplitude do sinal fluorescente aumentou significativamente (linha rosa, FIGURA 12). A média e

variação dos Ct obtidos para as 16 réplicas para a reação contendo 3X iniciadores e sonda *P. falciparum* em conjunto com 5X de iniciadores e sonda RNase P podem ser observados na TABELA 05.

TABELA 05 - MÉDIAS E VARIAÇÃO DOS VALORES DE Ct PARA *P. falciparum* E RNase P.

REAÇÃO	<i>P. falciparum</i>	RNase P
Reação gelificada	20,34 ± 0,77	25,42 ± 3,42
Reação líquida	20,01 ± 0,47	25,54 ± 1,31

### 7.1.2 Ensaios de padronização para detecção da curva padrão e definição do limiar de detecção

Após verificar a reprodutibilidade dos testes de PCR em Tempo Real na plataforma Q3 (FIGURAS 10 a 12), foram realizados os testes de verificação do limite de detecção (LOD) utilizando amostras artificialmente contaminadas com quantidades conhecidas de *P. falciparum* obtidos de cultura, conforme descrito em métodos (seção 6.1.2).

Utilizando como parâmetro os pontos da curva padrão amplificados no equipamento ABI7500 (FIGURA 13), foram definidos três pontos para testes no equipamento Q3: 25 parasitos/ $\mu$ L, 6,25 parasitos/ $\mu$ L e 1,56 parasitos/ $\mu$ L.

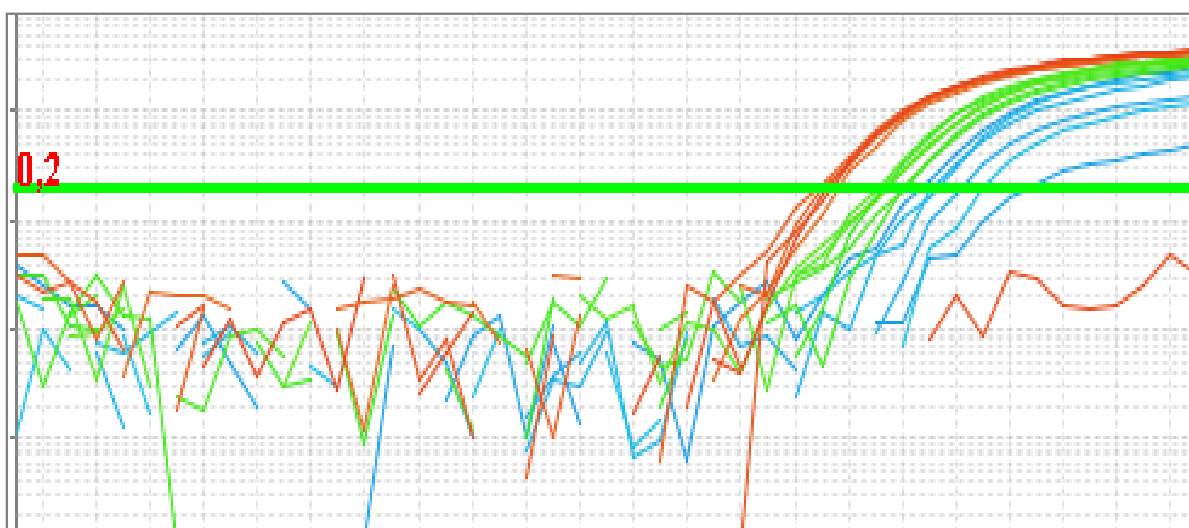


FIGURA 13 - CURVA PARA DETECÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL SIMPLEX DAS CURVAS DE DNA GENÔMICO PARA *P. falciparum* NO APARELHO ABI7500.

Nota: 1,56 parasitos/ $\mu$ L (linha azul), 6,25 parasitos/ $\mu$ L (linha verde), 25 parasitos/ $\mu$ L (linha laranja). A figura mostra triplicata de cada concentração de parasitos para duas diluições seriadas

independentes. A linha verde na horizontal representa o *threshold* calculado para a reação de *P. falciparum*.

Os resultados mostrados na FIGURA 14 são representativos dos experimentos realizados em condições ótimas, alcançadas após serem testados vários parâmetros, dentre eles: aumento do ciclo de extensão de 30 para 60 segundos, variações dos parâmetros óticos, tais como o ganho (de 5.31 para 8.03) e o led power (de 7 para 10). A condição que apresentou melhor desempenho na amplificação dos três pontos da curva de diluição de DNA de *P. falciparum* foi obtida com ciclo de extensão em 60 segundos, e parâmetros óticos em led power 10 e ganho 5.31 (FIGURA 14).

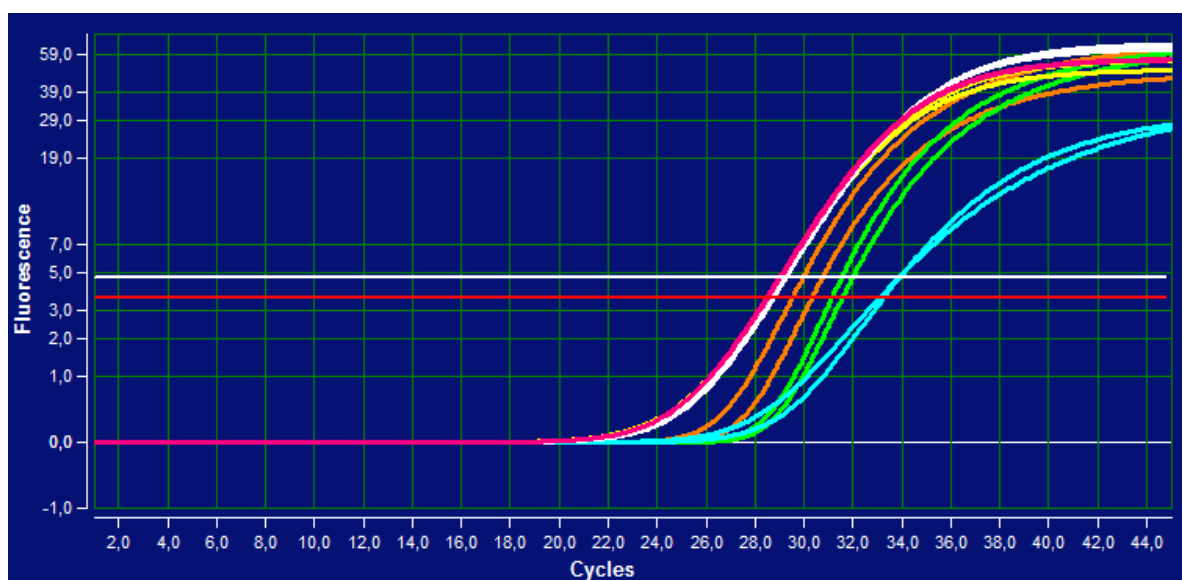


FIGURA 14 - AMPLIFICAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL DUPLEX DA CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA DE *P. falciparum* DAS AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.

Nota: Detecção *Plasmodium*: 1,56 parasitos/ $\mu$ L (linha azul), 6,25 parasitos/ $\mu$ L (linha verde), 25 parasitos/ $\mu$ L (linha laranja); detecção RNase P: 1,56 parasitos/ $\mu$ L (linha amarela), 6,25 parasitos/ $\mu$ L (linha rosa), 25 parasitos/ $\mu$ L (linha branca). A linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (4,5) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (5,2) calculado para a reação do gene de RNase P humana.

Tanto a PCR em Tempo Real no ABI7500 quanto no chip (Q3), foram capazes de amplificar todas as amostras testadas, sendo a de menor diluição (25 parasitos/ $\mu$ L) detectada na plataforma Q3 com Ct de 30,1 e a maior diluição (1,56 parasitos/ $\mu$ L) com Ct de 33,5 e na plataforma ABI7500 a menor diluição (25 parasitos/ $\mu$ L) detectada com Ct de 31,16 e a maior diluição (1,56 parasitos/ $\mu$ L) com Ct de 35,37. A média dos resultados da detecção das diferentes concentrações de

*P. falciparum* em ambas as plataformas, e também para detecção de RNase P no Q3, podem ser observados na TABELA 06.

Foram testadas também amostras mais diluídas, contendo DNA de *P. falciparum* equivalente a 0,8 parasitos/ $\mu$ L, e os resultados obtidos foram negativos (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que o limite de detecção (LOD) da reação de qPCR desenvolvida para ambas as plataformas está ao redor de 1,56 parasitos/ $\mu$ L, em concordância com resultados publicados por outros autores (KAMAU et al., 2013).

TABELA 06 - ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS MÉDIAS E VARIAÇÃO DOS VALORES DE Ct CONSIDERANDO OS DIFERENTES PONTOS DA CURVA DE DILUIÇÃO DO DNA *P. falciparum*.

MÉDIA DOS Ct DA CURVA DE DILUIÇÃO DNA <i>P. falciparum</i> Q3		
	<i>P. falciparum</i>	RNase P
25 PARASITOS/ $\mu$ l	29,98 $\pm$ 0,21	29,76 $\pm$ 0,21
6,25 PARASITOS/ $\mu$ l	31,42 $\pm$ 0,09	30,10 $\pm$ 0,10
1,56 PARASITOS/ $\mu$ l	33,50 $\pm$ 0,52	30,53 $\pm$ 0,32
MÉDIA DOS Ct DA CURVA DE DILUIÇÃO DNA <i>P. falciparum</i> ABI7500		
	<i>P. falciparum</i>	RNase P
25 PARASITOS/ $\mu$ l	31,16 $\pm$ 0,21	Não realizado
6,25 PARASITOS/ $\mu$ l	33,51 $\pm$ 0,40	Não realizado
1,56 PARASITOS/ $\mu$ l	35,37 $\pm$ 0,30	Não realizado

Alemayehu et al. (2013), também realizaram experimentos utilizando sistema TaqMan na plataforma ABI7500 e determinaram o LOD em 0,3 parasitos/ $\mu$ L. De acordo com esses pesquisadores, o baixo número de cópias do gene alvo do parasito pode dificultar a determinação do LOD na amostra.

Os resultados das amplificações da curva de diluição em reações líquidas para determinar o limiar de detecção nas plataformas ABI7500 (FIGURA 13) e Q3 (FIGURA 14) foram comparados para avaliar o desempenho do limiar de detecção. Na TABELA 06, é possível verificar a similaridade dos resultados entre as plataformas ABI7500 e Q3. A diferença de Ct observada é constante ao longo das diluições e não interfere no LOD, já observada em outro teste (RAMPAZZO et al., 2014). Desta forma, considerou-se que não há diferenças significativas entre as plataformas com relação ao limiar de detecção.

Na FIGURA 15, pode-se observar que, apesar das diferenças entre os Ct, ambas as reações são lineares na faixa de diluição testada. É possível perceber que a reação na plataforma Q3 sofre alguma influência que a torna artificialmente mais eficiente (eficiência de 187,55% para Q3 versus 95,30% para ABI7500). Entretanto, acredita-se que esta diferença não será significativa em testes clínicos, pois o LOD foi preservado (FIGURAS 13 e 14 e TABELA 06), característica importante em um teste tipo POC.

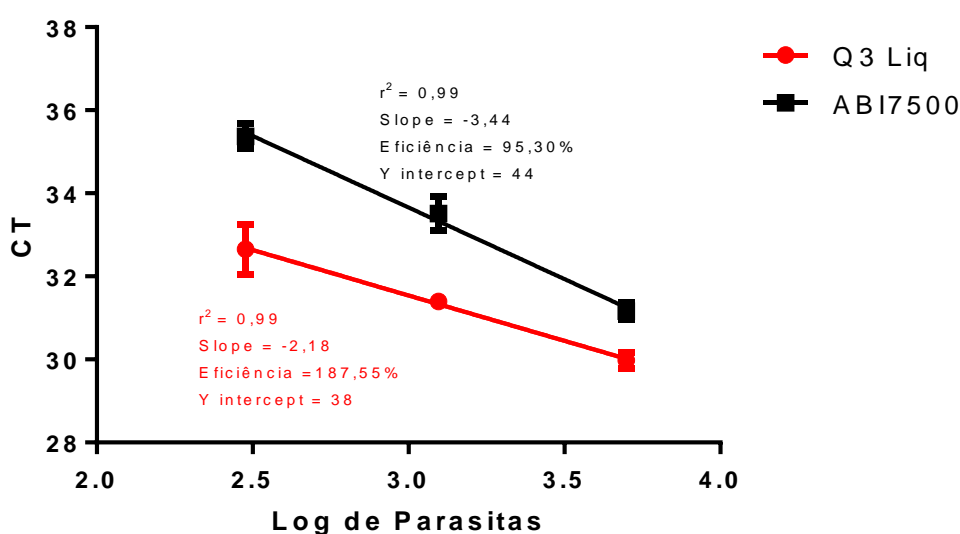


FIGURA 15 - MÉDIA DOS Ct DE DETECÇÃO DA REAÇÃO LÍQUIDA DA CURVA PADRÃO DO DNA *P. falciparum* DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA ABI7500 E Q3 VERSUS A QUANTIDADE LOGARÍTMICA DE PARASITOS.

Nota: ABI7500 (linha preta); Q3 (linha vermelha).

Esses dados estão de acordo com os resultados publicados por Rampazzo et al. (2014), utilizando o patógeno *Trypanossoma cruzi* como objeto de estudo, no qual encontraram eficiência de 142% para o ABI7500 e eficiência de 163% para o Q3 para reações líquidas; os mesmos autores encontraram valores de  $R^2 = 0,982$  para ABI7500 e  $R^2 = 0,974$  no Q3. Dessa forma considerou-se que os valores de  $R^2$  e eficiência encontrados para a plataforma Q3 no presente estudo são similares aos publicados por Rampazzo e colaboradores (2014). Além disso, em concordância com os resultados deste estudo, estes autores também mostraram que o LOD para detecção do DNA de *T. cruzi* não foi alterado, apesar da diferença de eficiência entre as reações.

Plataformas microfluídicas representam uma tecnologia promissora para detecção de ácidos nucleicos (FOCKE et al., 2010; SUN et al., 2011). Disponível em chip ou cartuchos, estas plataformas incorporam um mix de reagentes e controle eficiente da temperatura, para se tornar totalmente compatível com técnicas como PCR em Tempo Real (LIU et al., 2009). De acordo com CHAN et al. (2013), o método de PCR em Tempo Real possui sensibilidade e acurácia suficiente para diagnosticar vários alvos em reações multiplex. Porém, é de difícil manipulação, além de requerer técnico treinado e equipamentos de alto custo para o desenvolvimento dos experimentos. Em situação oposta, os testes de diagnóstico tipo *point of care* baseados em microfluídica envolvem soluções de fácil uso, miniaturização da reação e alvos multiplex; gerando um ótimo potencial para aprimorar o tratamento de pacientes que necessitam de um diagnóstico rápido (KULINSKY et al., 2013).

O sistema de PCR em Tempo Real no chip da plataforma Q3 apresenta vantagens sobre o sistema de detecção em placa da plataforma ABI7500. A interface do Q3 utiliza um chip de silício para modular a temperatura da reação, que permite uma rápida variação da temperatura durante a oscilação da ciclagem, e diminui assim o tempo total da reação (RAMPAZZO et al., 2014). No presente estudo, foi utilizada uma reação de 80 minutos na plataforma Q3, contrastando com 105 minutos das reações previamente padronizadas pelo grupo de desenvolvimento do IBMP na plataforma ABI7500. Interessantemente, notou-se que há uma diferença média de 2 a 3 Ct entre as plataformas ABI7500 e Q3, onde este último apresenta valores mais baixos. Rampazzo et al. (2014), também notaram uma diferença média de 3 a 5 Ct a menos para os resultados obtidos com a plataforma Q3 em comparação com ABI7500 para o parasito *T. cruzi*. Entretanto, da mesma forma que os resultados mostrados aqui, o LOD para detecção de *T. cruzi* no Q3 é similar ao obtido no ABI7500. A partir destes dados, sugere-se que a plataforma Q3 apresenta sensibilidade e precisão apta para diagnosticar doenças infecto parasitárias com o mesmo nível de sensibilidade que a plataforma padrão ABI7500.

## 7.2 DESEMPENHO COMPARATIVO DA PCR EM TEMPO REAL PARA AS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NA PLATAFORMA Q3 EM FUNÇÃO DO LOD

A partir dos resultados apresentados na FIGURA 14, realizou-se a gelificação daquela reação no chip Q3, e resultados representativos das amplificações da curva de diluição podem ser observados na FIGURA 16. Nota-se que não há diferença entre as reações líquidas e gelificadas quanto ao LOD.

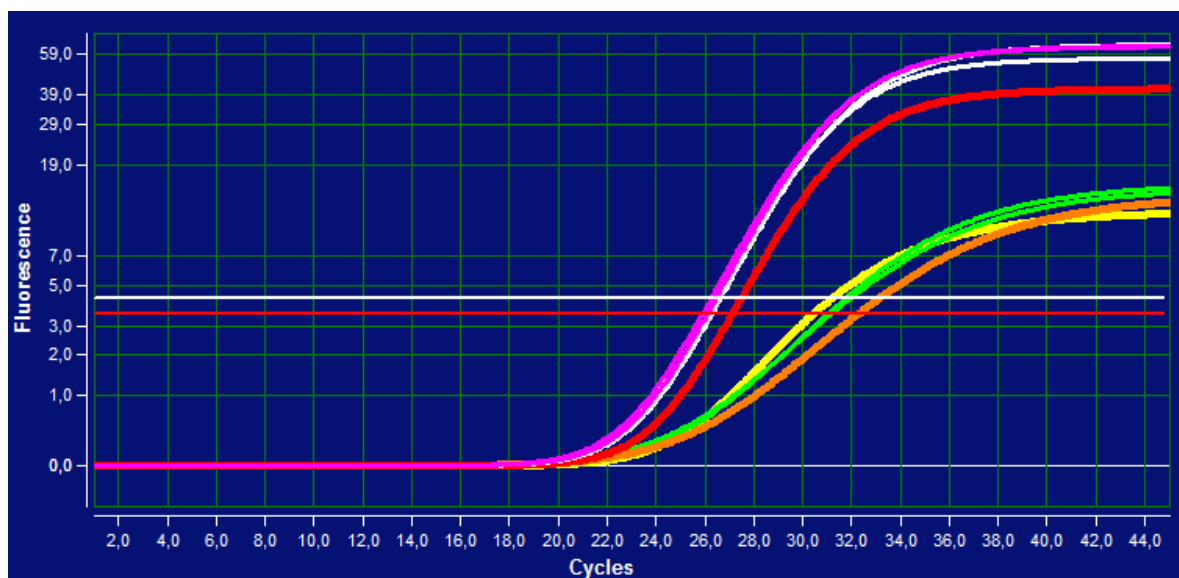


FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO DA DETECÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL DUPLEX GELIFICADO PARA A CURVA DE DILUIÇÃO DE DNA DE *P. falciparum* DAS AMOSTRAS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.

Nota: Detecção *Plasmodium*: 1,56 parasitos/ $\mu$ L (linha laranja), 6,25 parasitos/ $\mu$ L (linha amarela), 25 parasitos/ $\mu$ L (linha verde); detecção RNase P: 1,56 parasitos/ $\mu$ L (linha vermelha), 6,25 parasitos/ $\mu$ L (linha branca), 25 parasitos/ $\mu$ L (linha rosa). A linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (3,5) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (4,3) calculado para a reação do gene de RNase P humana.

Os resultados apresentados na TABELA 07 são as médias de três experimentos para detecção das diferentes concentrações de parasitos. Comparando-se os valores de Ct para reação líquida e gelificada da curva de *P. falciparum* nota-se a similaridade dos resultados entre as reações conduzidas na plataforma Q3.

TABELA 07 - COMPARAÇÃO DE CICLOS DE DETECÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PARASITAS - LÍQUIDA E GELIFICADA NA PLATAFORMA Q3.

CARGA PARASITÁRIA	Q3 GELIFICADA	Q3 LÍQUIDA
25 parasitos/ $\mu$ L	29,90 $\pm$ 0,07	29,98 $\pm$ 0,21
6,25 parasitos/ $\mu$ L	31,30 $\pm$ 0,40	31,40 $\pm$ 0,09
1,56 parasitos/ $\mu$ L	33,10 $\pm$ 0,30	33,65 $\pm$ 0,52

Realizou-se então uma regressão linear para comparar o desempenho da detecção da curva padrão entre as reações líquidas e gelificadas (FIGURA 17).

Ambas as reações conduzidas no Q3 demonstraram desempenhos semelhantes, podendo-se observar nos valores de eficiência (187,6% e 137,7% para reação líquida e gelificada, respectivamente) e  $R^2$  (0,99 e 0,95 para reação líquida e gelificada, respectivamente).

Os resultados apresentados na TABELA 07 mostram que as reações líquidas e gelificadas possuem desempenhos semelhantes. Estes resultados também estão em concordância com Iglesias et al. (2014), que verificaram que os ensaios de PCR em Tempo Real em reações gelificadas, conduzidos em equipamento convencional, apresentaram sensibilidade similar e uma excelente especificidade em comparação à microscopia e o teste rápido.

As curvas obtidas em ambas as condições (líquida versus gelificada) (FIGURA 17) foram comparadas através do teste “t de Student”, não sendo observadas diferenças entre os mesmos pontos das diferentes reações ( $p=0,8717$ ).

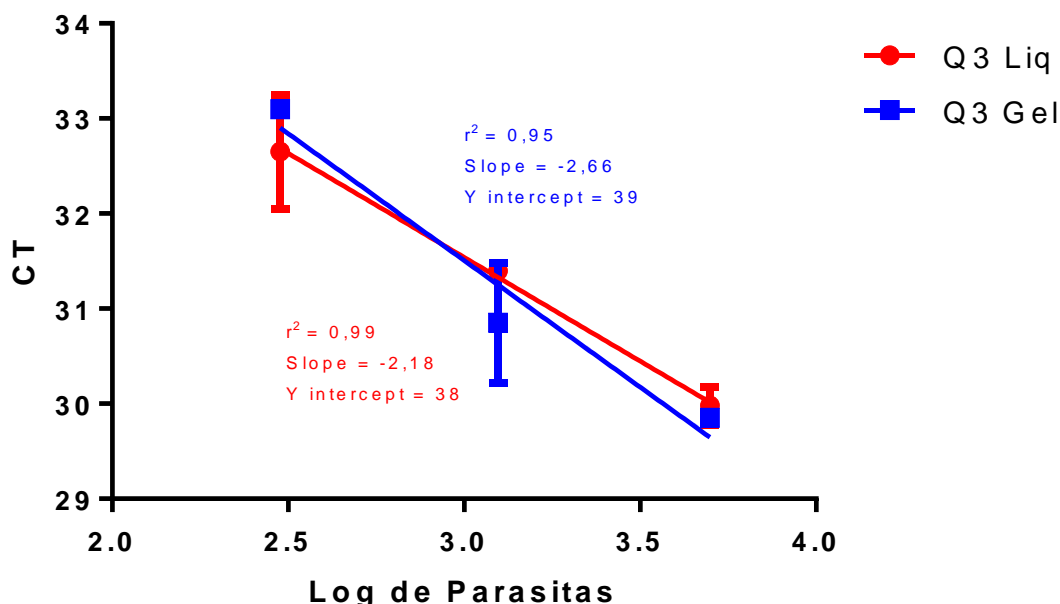


FIGURA 17 - MÉDIA DOS VALORES DE Ct DA DETECÇÃO DA CURVA DE DILUIÇÃO DO DNA DE *P. falciparum* DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS DE PCR EM TEMPO REAL NA PLATAFORMA Q3 VERSUS A QUANTIDADE LOGARÍTMICA DE PARASITOS.

Nota: Q3 reação líquida (linha vermelha); Q3 reação gelificada (linha azul). Teste “t” ( $p = 0,8717$ ).

### 7.3 PADRONIZAÇÃO DO CONTROLE INTERNO DA REAÇÃO (DETECÇÃO DO GENE HUMANO RNase P)

Considerando-se que as amostras de pacientes obtidas estavam agrupadas em um *pool*, é possível que o DNA genômico de cada amostra esteja presente em concentrações diferentes. Desta forma, foi utilizado a detecção do gene humano RNase P, comumente usado como controle endógeno em qPCR, para balizar a quantidade de DNA genômico que estava sendo testado nas reações. Para determinar esta quantidade, as amostras de DNA de *P. falciparum* foram diluídas seriadamente três vezes (razão 1:10) obtendo as diluições 1:10, 1:100 e 1:1000. Nos experimentos anteriores com *P. falciparum*, foi utilizada a diluição 1:10 (FIGURAS 10 a 12). Traçados representativos estão mostrados na FIGURA 18.

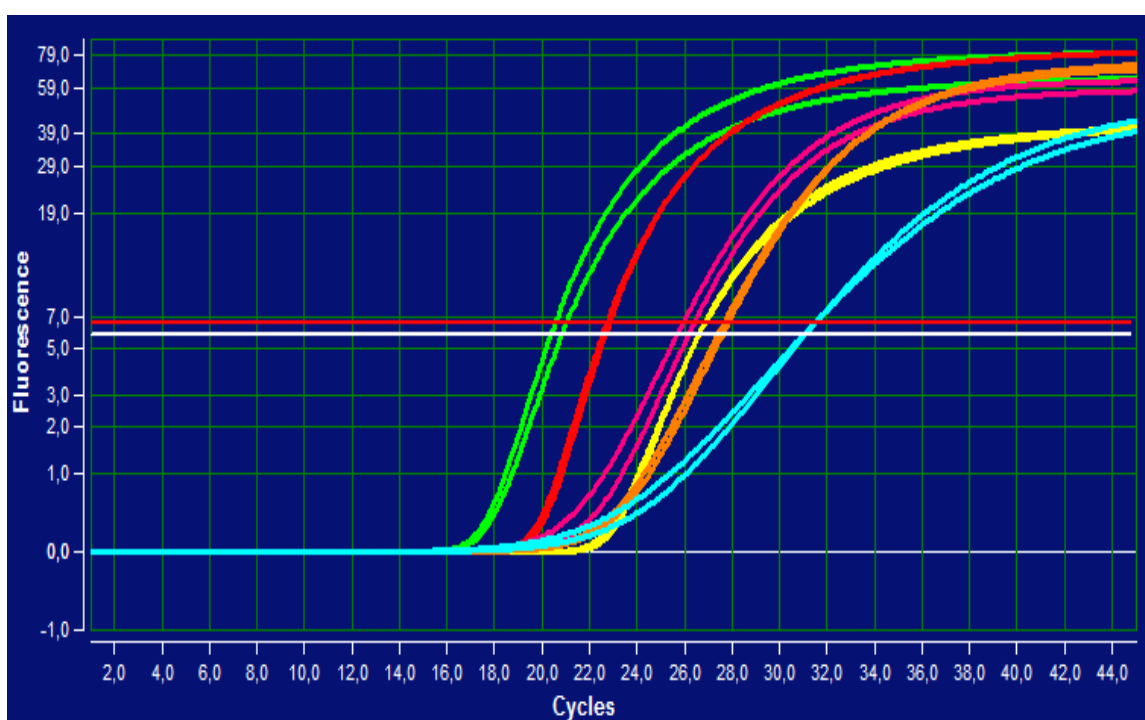


FIGURA 18 - DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO RNase P UTILIZANDO O DNA DE *P. falciparum* NO DIAGNÓSTICO DE PCR EM TEMPO REAL PARA MALARIA NA PLATAFORMA Q3.

Nota: Detecção *P. falciparum*: diluição 1:10 (linha verde), diluição 1:100 (linha vermelha), diluição 1:1000 (linha amarela); detecção RNase P: diluição 1:10 (linha rosa), diluição 1:100 (linha laranja), diluição 1:1000 (linha azul). A linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (6,5) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca na horizontal o *threshold* (5,8) calculado para a reação do gene de RNase P humana.

É possível observar que, em relação à presença do gene RNase P, a diluição da amostra contendo DNA de *P. falciparum* que obteve a detecção que

melhor se compara com as outras amostras de DNA *P. malariae* e *P. vivax* foi a de 1:100. O valor de Ct obtido é similar ao encontrado em amostras utilizadas em outros projetos do IBMP ( $28 < Ct < 30$ ). Os resultados das triplicatas experimentais estão resumidos na TABELA 08.

TABELA 08 - MÉDIA DOS Ct DAS DILUIÇÕES DE DNA *P. falciparum* PARA DETERMINAÇÃO DO LIMIAR DE DETECÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO RNase P.

DILUIÇÃO DNA	<i>P. falciparum</i>	RNase P
<i>P. falciparum</i> 1:10	20,06 ± 0,56	26,12 ± 1,35
<i>P. falciparum</i> 1:100	22,34 ± 0,40	28,00 ± 0,18
<i>P. falciparum</i> 1:1000	26,08 ± 0,87	31,68 ± 1,28

Kamau et al. (2013) determinaram o LOD de DNA genômico de *P. falciparum* em 310 parasitos/ $\mu$ L na plataforma ABI7500, tendo encontrado os seguintes valores de Ct para a detecção de *P. falciparum*: diluição 1:10 (Ct 21,77); diluição 1:100 (Ct 24,19) e diluição 1:1000 (Ct 26,3); e o gene RNase P, diluição 1:10 (Ct 22,3); diluição 1:100 (Ct 24,98) e diluição 1:1000 (Ct 27,38). Comparando-se estes resultados com os mostrados na TABELA 08, observa-se que há uma correlação dos valores de Ct para *P. falciparum* na plataforma Q3 com os resultados dos Ct encontrados pelos pesquisadores citados quando foi testada neste estudo a diluição 1:100.

#### 7.4 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS PARA DETECÇÃO DE DNA DE *P. falciparum*, *P. vivax* E *P. malariae* NA PLATAFORMA Q3

Após verificar a melhor condição para detecção das amostras mais diluídas (FIGURA 14), foram preparados dezoito chips para as reações líquidas em duplicata para detectar o DNA de cada espécie; *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, contendo diferentes concentrações dos iniciadores e sondas específicos (TABELA 02). A figura representativa da amplificação da reação líquida de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* em diferentes condições de concentrações estão representadas na FIGURA 19. É importante ressaltar que a FIGURA 19 A é semelhante à FIGURA

12, com a correção na concentração do DNA de *P. falciparum* sugerida pelos valores de Ct para detecção de RNase P (FIGURA 18).

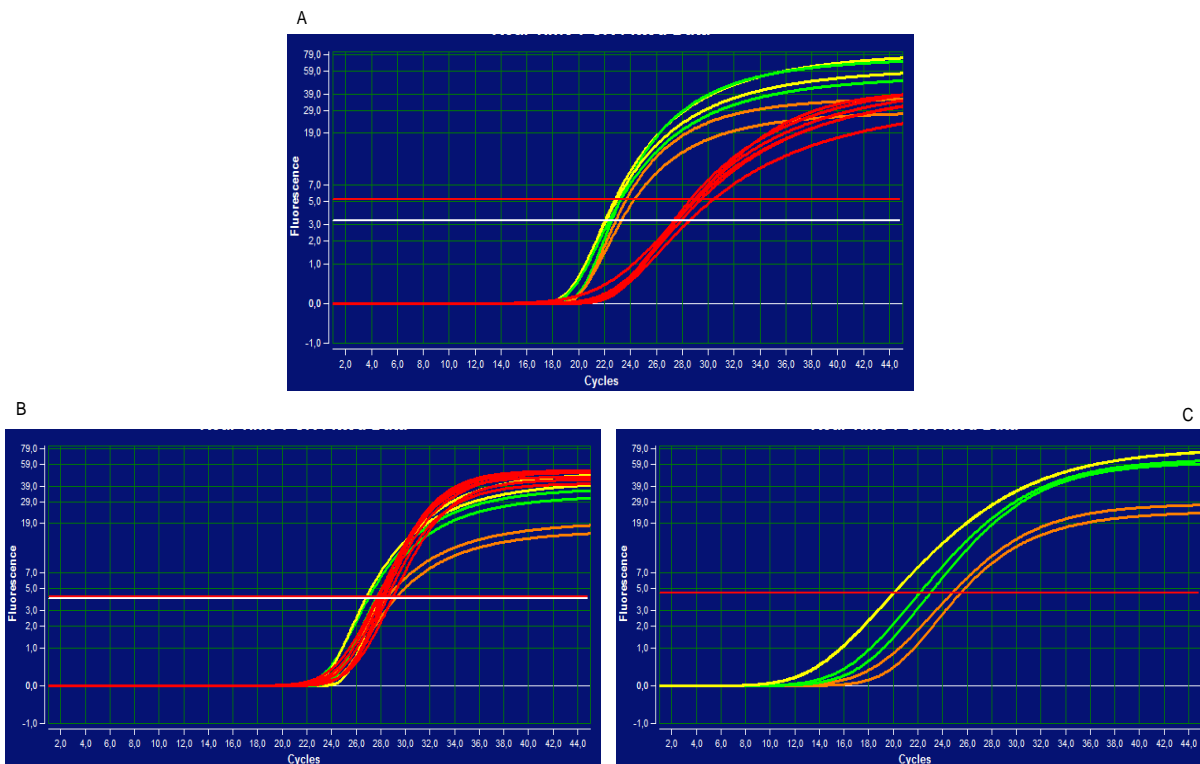


FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE *P. falciparum* (A); AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE *P. malariae* (B); AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE *P. vivax* (C).

Nota: (A) Detecção *P. falciparum*: 1x (linha laranja); 2x (linha verde); 3x (linha amarela), detecção RNase P: (linhas vermelhas). (B) Detecção *P. malariae*: 1x (linha laranja); 2x (linha verde); 3x (linha amarela), detecção RNase P: (linhas vermelhas). (C) Detecção *P. vivax*: 1x (linha laranja); 2x (linha verde); 3x (linha amarela) sem RNase P. (A) Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (4,5) calculado para a reação de *P. falciparum* e a linha branca o *threshold* (5,4) calculado para o gene RNase P. (B) Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (3,2) calculado para a reação de *P. malariae* e a linha branca o *threshold* (4,8) calculado para o gene RNase P. (C) Linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (4,9) calculado para a reação de *P. vivax*.

É possível observar que a condição que obteve melhor desempenho apresentando amplificação e detecção dos alvos para todas as réplicas foi a condição com concentração três vezes maior (1,2  $\mu\text{M}$ ) de iniciadores em conjunto com a concentração três vezes maior (0,24  $\mu\text{M}$ ) de sonda específica (TABELA 09).

As reações com outras condições de concentrações testadas (TABELA 02), não apresentaram amplificações (dados não mostrados).

TABELA 09 - MÉDIA DE Ct OBTIDOS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE *P. falciparum*, *P. malariae* E *P. vivax*.

CONCENTRAÇÃO DE SONDA ESPECÍFICA	CONCENTRAÇÃO DE INICIADOR 0,4µM	CONCENTRAÇÃO DE INICIADOR 1,2µM
<i>Plasmodium falciparum</i>		
0,08 µM	23,10 ± 0,68	22,72 ± 0,29
0,16 µM	23,10 ± 0,52	22,37 ± 0,31
0,24 µM	22,88 ± 0,62	22,17 ± 0,45
<i>Plasmodium malariae</i>		
0,08 µM	27,22 ± 1,03	25,43 ± 0,57
0,16 µM	27,15 ± 1,03	25,23 ± 0,25
0,24 µM	27,05 ± 0,28	24,87 ± 0,25
<i>Plasmodium vivax</i>		
0,08 µM	25,90 ± 1,00	24,73 ± 0,30
0,16 µM	23,78 ± 1,14	23,18 ± 0,69
0,24 µM	22,65 ± 1,02	22,08 ± 0,29
0,08 µM	23,10 ± 0,68	22,72 ± 0,29
0,16 µM	23,10 ± 0,52	22,37 ± 0,31
0,24 µM	22,88 ± 0,62	22,17 ± 0,45
<i>Plasmodium malariae</i>		
0,08 µM	27,22 ± 1,03	25,43 ± 0,57
0,16 µM	27,15 ± 1,03	25,23 ± 0,25
0,24 µM	27,05 ± 0,28	24,87 ± 0,25
<i>Plasmodium vivax</i>		
0,08 µM	25,90 ± 1,00	24,73 ± 0,30
0,16 µM	23,78 ± 1,14	23,18 ± 0,69
0,24 µM	22,65 ± 1,02	22,08 ± 0,29

Na FIGURA 20, pode-se observar o resultado representativo de uma detecção das três espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* em um mesmo chip, com as melhores condições experimentais obtidas até o momento.

A partir dos resultados obtidos na TABELA 09, realizou-se 18 réplicas para padronização da reação gelificada com as três espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* no chip, em paralelo à reação líquida.

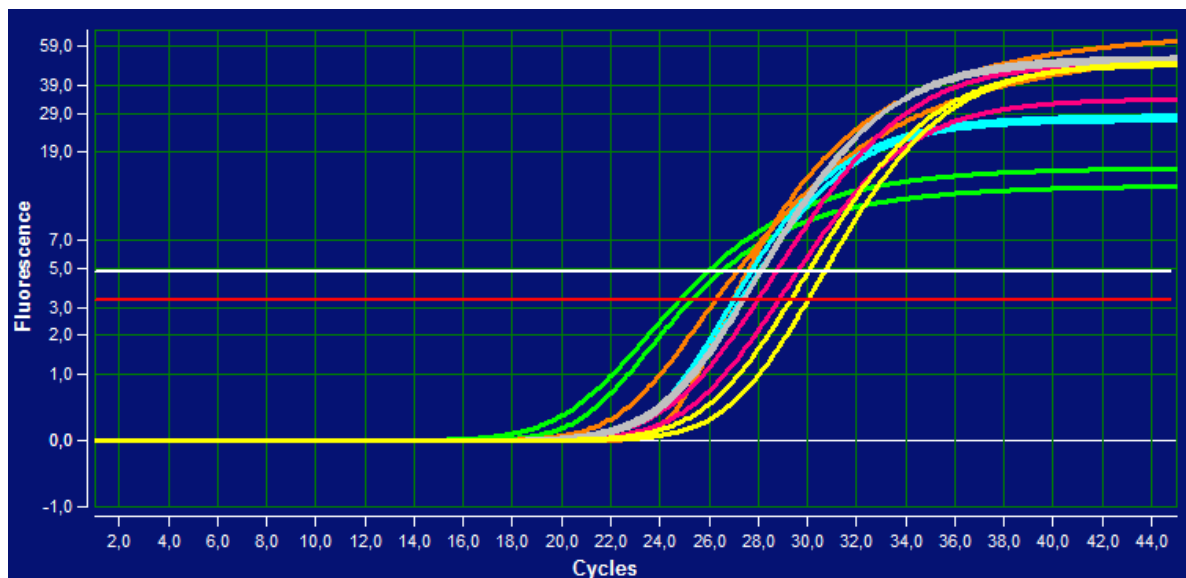


FIGURA 20 - FIGURA REPRESENTATIVA DA AMPLIFICAÇÃO PARA PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS DE *P. falciparum*, *P. malariae* E *P. vivax*.

Nota: Detecção *P. falciparum*: (linha verde); Detecção RNase P: (linha rosa). Detecção *P. malariae*: (linha laranja); Detecção RNase P: (linha cinza). Detecção *P. vivax*: (linha azul); Detecção RNase P: (linha amarela). A linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (4,9) calculado para a reação de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax* e a linha branca na horizontal o *threshold* (5,2) calculado para a reação do gene da RNase P humana.

A amplificação representativa das reações líquidas e gelificadas realizadas no mesmo chip encontra-se na FIGURA 21.

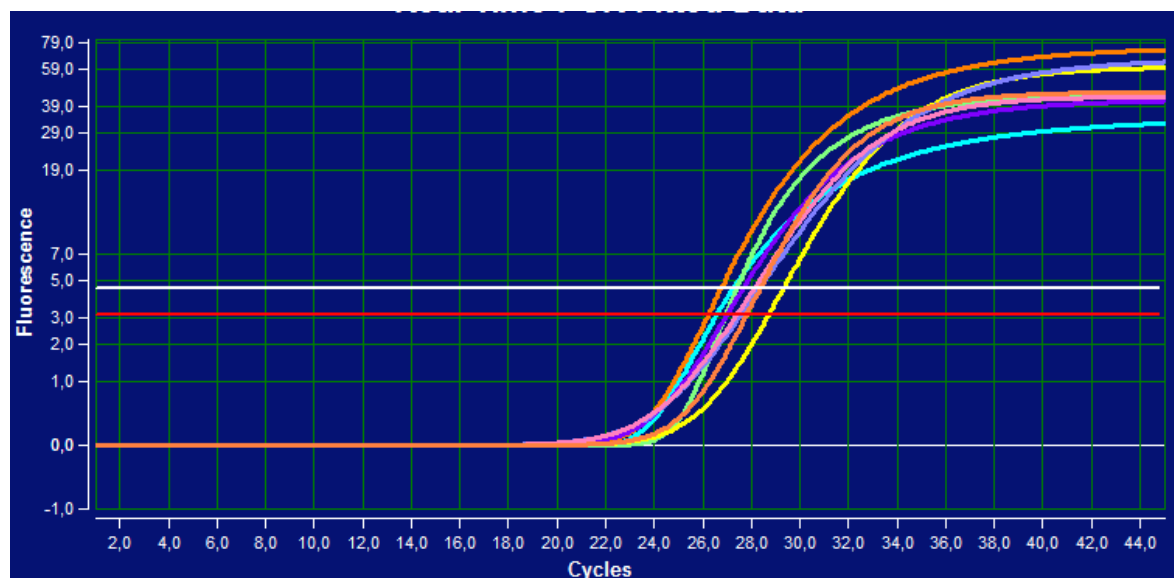


FIGURA 21 - FIGURA REPRESENTATIVA DA AMPLIFICAÇÃO DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NO CHIP COM DNA DE *P. falciparum*, *P. malariae* E *P. vivax*.

Nota: Detecção *P. falciparum*: reação gelificada (linha roxa); reação líquida (linha lilás), detecção RNase P: reação gelificada (linha azul); reação líquida (linha amarela). Detecção *P. malariae*: reação gelificada (linha laranja); reação líquida (linha laranja), detecção RNase P: reação gelificada (linha rosa); reação líquida (linha salmão). Detecção *P. vivax*: reação gelificada (linha azul); reação líquida (linha verde), detecção RNase P: reação gelificada (linha salmão); reação líquida (linha amarela). A linha vermelha na horizontal representa o *threshold* (3,2) calculado para a reação de *P. falciparum*, *P.*

*malariae* e *P. vivax* e a linha branca na horizontal o *threshold* (4,5) calculado para a reação do gene de RNase P humana.

As reações gelificadas e líquidas no chip apresentaram pouca variabilidade entre as réplicas. A reação gelificada demonstrou um desempenho similar à reação líquida, apresentando detecção e amplificação esperada para os Ct de *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*. Os valores das médias de Ct obtidos para padronização das reações líquidas e gelificadas no mesmo chip estão descritos na TABELA 10.

TABELA 10 - VALORES DAS MÉDIAS DOS Ct DAS REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NO CHIP

REAÇÃO	<i>P. falciparum</i>	RNase P	<i>P. malariae</i>	RNase P	<i>P. vivax</i>	RNase P
GELIFICADA	23,20 ± 0,28	28,10 ± 0,56	24,93 ± 0,56	27,36 ± 1,00	26,35 ± 0,35	29,05 ± 0,91
LÍQUIDA	23,63 ± 0,75	28,75 ± 0,49	26,53 ± 0,30	28,50 ± 0,14	26,40 ± 0,70	30,02 ± 0,42

Sun et al. (2013), realizaram um PCR em Tempo Real comparando reagentes líquidos e gelificados e, ao observarem os produtos amplificados em gel de agarose a 2% sugeriram que a integridade da enzima foi mantida durante o processo de gelificação. Os resultados dos reagentes de gelificação estocados por 3 meses a 4°C, demonstraram viabilidade no sistema *lab-on-a-chip*.

Iglesias et al. (2014), realizaram um estudo de comparação utilizando reagente gelificados entre a qPCR, a *nested* PCR, um teste rápido comercial e a microscopia para detecção de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*. Os autores determinaram uma sensibilidade de 98,1% para o teste gelificado para os ensaios de qPCR, sendo superior à microscopia (sensibilidade de 82,7%) e o teste rápido (sensibilidade de 94,2%). Todos os testes obtiveram uma alta especificidade para identificar as três espécies do gênero *Plasmodium* spp. (100%). Entretanto, o teste que apresentou maior sensibilidade (98,1%) foi o qPCR, confirmando a importância de estudos como este aqui desenvolvido.

## 7.5 DESEMPENHO DA PCR EM TEMPO REAL PARA REAÇÕES LÍQUIDAS E GELIFICADAS NA PLATAFORMA Q3 E NA PLATAFORMA ABI7500

As análises entre as reações líquidas e gelificadas conduzidas na plataforma ABI7500 previamente realizadas pelo grupo de desenvolvimento do IBMP foram gentilmente cedidas para a comparação entre as reações conduzidas na plataforma Q3. As análises dos valores de médias e variações de Ct das reações conduzidas nas plataformas ABI7500 e Q3 encontram-se na TABELA 11. Podemos observar que os resultados para detecção de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* são semelhantes entre as condições (líquida versus gelificada) e entre as plataformas (Q3 versus ABI7500).

TABELA 11 - VALORES DE MÉDIA E VARIAÇÃO DOS Ct DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL LÍQUIDAS E GELIFICADAS NAS PLATAFORMAS ABI7500 E Q3.

ESPÉCIE	REAÇÃO LÍQUIDA		REAÇÃO GELIFICADA	
	Parasito (FAM)	RNAse P (HEX)	Parasito (FAM)	RNAse P (HEX)
PLATAFORMA ABI7500				
<i>P. falciparum</i>	20,40 + 0,12	25,13 + 0,08	20,11 + 0,12	24,84 + 0,17
<i>P. vivax</i>	26,27 + 0,30	26,69 + 0,53	25,95 + 0,15	26,32 + 0,24
<i>P. malariae</i>	25,75 + 0,92	26,69 + 0,36	24,05 + -0,20	26,54 + 0,21
PLATAFORMA Q3				
<i>P. falciparum</i>	23,27 + 06	28,75 + 0,95	22,60 + 0,35	28,85 + 0,49
<i>P. vivax</i>	25,4 + 0,9	29,06 + 0,60	26,80 + 0,95	30,40 + 1,00
<i>P. malariae</i>	25,21 + 0,7	26,68 + 0,36	25,12 + -0,70	27,01 + 0,70

A diferença no aumento dos valores para detecção do Ct quando comparados com os valores obtidos na plataforma ABI7500, tanto para as reações líquidas quanto para as reações gelificadas na plataforma Q3, está provavelmente relacionada às características particulares do equipamento Q3, uma vez que diferença semelhante entre os valores de detecção foram observados para *T. cruzi* (RAMPAZZO et al., 2014).

Realizou-se uma análise de variância (One Way ANOVA, seguido de teste Tukey) para avaliar se há diferença significativa entre as reações de PCR em Tempo Real, por espécie, nas diferentes plataformas. Para *P. vivax* e *P. malariae*, não houve diferença significativa entre as reações líquidas e gelificadas, tampouco entre as plataformas ABI7500 e Q3 (FIGURA 22 B B e 22 C).

Para *P. falciparum*, não houve diferença significativa nas análises estatísticas da reação líquida versus gelificada na plataforma ABI7500, tampouco para líquida versus gelificada na plataforma Q3. Entretanto, foi encontrada diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) nas comparações entre líquida e gelificada entre ambas as plataformas (FIGURA 22 A). Considerando que as amostras de *P. falciparum* e *P. vivax* testadas na plataforma Q3 foram diluídas 10 vezes a mais do que para ABI7500, de acordo com o limiar definido pelo controle endógeno (RNase P) deste estudo, supõe-se que esta diluição tenha contribuído para esta diferença estatística encontrada em *P. falciparum*. Sugere-se que a plataforma Q3 pode ser utilizada tanto para reações líquidas quanto gelificadas, apresentado a mesma sensibilidade encontrada comumente na plataforma ABI7500, apesar da diferença vista em *P. falciparum*, levando em consideração a maior diluição utilizada para esta amostra.

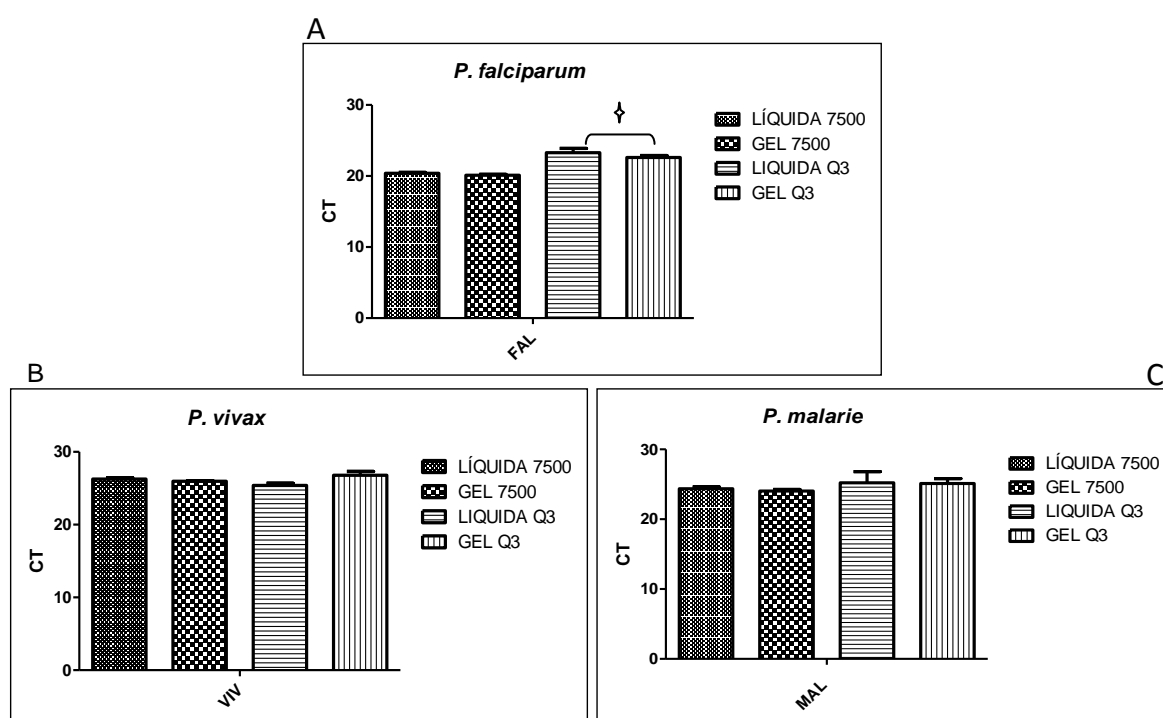


FIGURA 22 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL LÍQUIDAS E GELIFICADAS NAS PLATAFORMAS ABI7500 E Q3. - *P. Falciparum* (A); *P. vivax* (B) E *P. malariae* (C).

Nota: One Way ANOVA, pós-teste Tukey. Figura A ( $p < 0,0001$ ); Figura B ( $p = 0,0570$ ); Figura C ( $p = 0,2990$ ).

## 7.6 ASPECTOS COMPARATIVOS ENTRE OS ENSAIOS MOLECULARES DAS PLATAFORMAS TESTADAS

Com o objetivo de avaliar o teste de diagnóstico propriamente dito, com as diferentes reações líquidas e gelificadas e as diferentes plataformas ABI7500 e Q3, levando em consideração todas as espécies testadas, foi realizada uma análise de

variância (One-way ANOVA) que mostrou que não há diferença significativa para nenhum dos parâmetros avaliados: reações líquidas versus gelificadas, e plataforma ABI7500 versus plataforma Q3, para quaisquer das três espécies estudadas (FIGURA 23). Sugere-se então que a plataforma Q3 é tão válida quanto a plataforma ABI7500 para identificar indivíduos infectados e distinguir entre as espécies do gênero *Plasmodium* spp. (Figura 23).

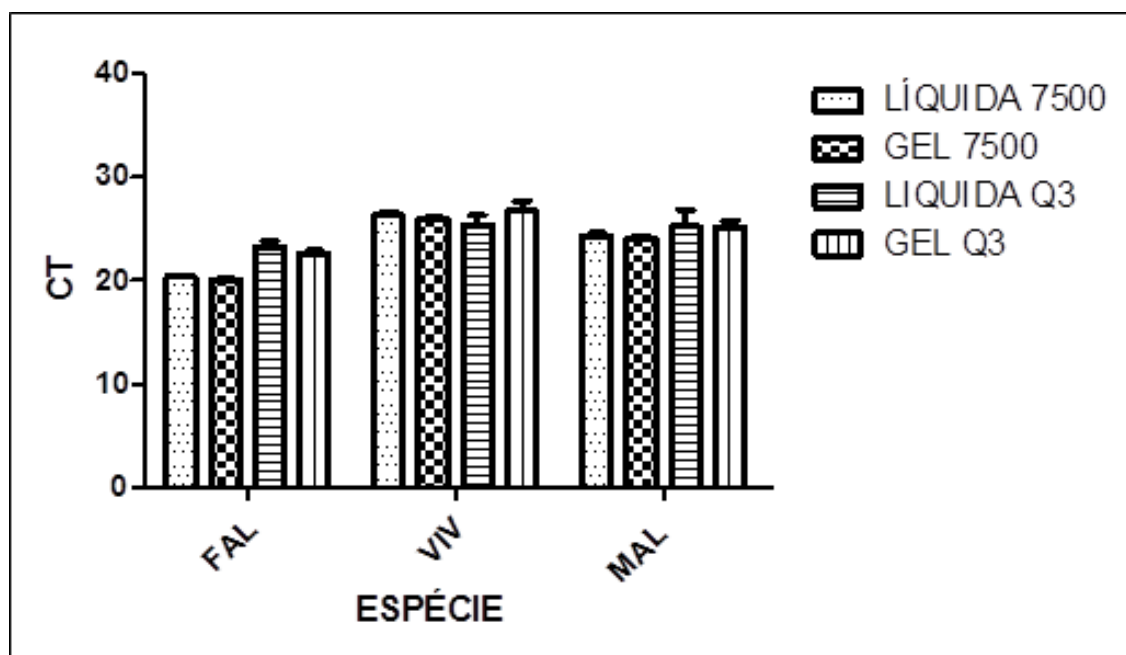


FIGURA 23 - ANÁLISE COMPARATIVA DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL LÍQUIDA E GELIFICADA ENTRE AS ESPÉCIES *P. falciparum*, *P. vivax* E *P. malariae* NAS PLATAFORMAS ABI7500 E Q3.

Nota: One Way ANOVA ( $p=0,8530$ )

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram que a qPCR realizada na plataforma portátil Q3 produz resultados comparáveis à qPCR conduzida na plataforma padrão ABI7500, quando utilizada para detecção do DNA de *P. falciparum*, *P. malariae*, e *P. vivax*. A plataforma Q3 apresenta uma sensibilidade semelhante ao ABI7500 (FIGURA 14), visto que a LOD encontrada para os dois testes foi idêntica (1,56 parasitos/ $\mu$ L) (TABELA 07).

A tabela abaixo (TABELA 12) resume as melhores condições experimentais para aplicação na plataforma portátil Q3 encontradas no presente estudo.

TABELA 12 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ÓTIMAS PARA PCR EM TEMPO REAL NO Q3

CONCENTRAÇÃO FINAL		CONCENTRAÇÃO FINAL		PARÂMETROS ÓPTICOS		LOD	CICLAGEM
SONDA (FAM)	INICIADOR	SONDA (HEX)	INICIADOR	FAM	HEX	1,56 parasitos/ $\mu$ L	99°C/ 40'+45 ciclos: 99°C/20' 64°C/60'
<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i>  0,24 $\mu$ M	Plasmo (1 e 2)  1,2 $\mu$ M	RNase P  0,1 $\mu$ M	RNase P (F e R)  2 $\mu$ M	led power 7, ganho de câmera 5.31 captura de imagem de 0.25 f/s	led power 10, ganho de câmera 16,03 captura de imagem de 0.25 f/s		

As reações gelificadas e líquidas na plataforma Q3 não apresentam diferenças significativas, ou seja, ambas as técnicas podem ser utilizadas com a mesma precisão. O Q3 tem a vantagem de ser um equipamento portátil, de menor dimensão, menor utilização de reagentes e com menor tempo de reação, assim sendo apto para a realização do teste em áreas endêmicas isoladas, pois não necessita de treinamento especializado para operação, tampouco de condições especiais de armazenamento ou transporte.

Apesar da pequena diferença encontrada para *P. falciparum*, conclui-se que a diluição maior da amostra foi responsável pela variação significativa de Ct. Sabe-se que quanto maior a diluição do DNA, mais variação é encontrada na sua detecção. Entretanto, as grandes diluições das amostras neste teste servem apenas

para definir o limite mínimo do diagnóstico molecular, pois estão muito além da capacidade de detecção pelo método tradicional de microscopia. Conclui-se que o teste é capaz de detectar cargas parasitárias normalmente assintomáticas, com grande margem de segurança.

O teste diagnóstico desenvolvido no Q3, quando avaliado em todos os seus parâmetros, não apresenta diferença significativa com relação ao teste desenvolvido no ABI7500, mostrando que o Q3 possui condições ser testado na prática clínica (reais usuários e ambiente de aplicação), com a mesma confiabilidade de um teste molecular realizado em equipamento tradicional de PCR em Tempo Real.

## 9 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

✓ **Testar soluções de extração de DNA *point of care* para utilização em conjunto com o teste aqui desenvolvido.** Um dos grandes obstáculos para a utilização de testes moleculares tipo qPCR em situações *point of care* é a necessidade de preparação da amostra e/ou extração do DNA, devido à presença de diversos inibidores da reação qPCR encontrados em amostras biológicas. Desta forma, pretende-se testar algumas soluções de extração de DNA e/ou concentração dos parasitas que independem de equipamentos não-portáteis (como centrífugas). Um exemplo é a pipeta descartável desenvolvida pelo Dr. David Pawlowski (University of New York at Buffalo, EUA), cujo vídeo demonstrativo pode ser acessado em <http://www.jove.com/video/4202/>. Outro exemplo é a família de produtos “Sample-to-SNP” da empresa Life Technologies, cujos tampões de lise impedem a ação dos inibidores encontrados nas amostras biológicas e, portanto, permitem a utilização da amostra com poucos passos de manipulação.

✓ **Validar novos fornecedores dos insumos chave do teste.** Este passo é importante para a transferência do produto para a planta de Produção do IBMP, pois aumenta a confiabilidade da manutenção da qualidade do teste independentemente do fornecedor utilizado. Desta forma, o sistema produtivo não se torna refém de um determinado fornecedor, situação que pode ser crítica no longo prazo.

✓ **Iniciar os testes de estabilidade de longo prazo.** Testes de estabilidade de médio prazo serão iniciados para validação do teste quando estocado em

temperatura ambiente (20-25°C) ou refrigerado (2-8°C). Inicialmente, serão testados os tempos de estocagem de 15, 30, 60 e 90 dias.

✓ **Inclusão da reação para detecção de *P. ovale*.** Caso haja demanda, podemos trabalhar em colaboração com a empresa STMicroelectronics para modificar o design do chip para incluir a reação para detecção de *P. ovale*. Esta demanda pode surgir dos nossos parceiros CDC (EUA) ou Instituto Nacional de Saúde de Moçambique, locais onde o teste padronizado para o equipamento ABI7500 será implementado em 2015.

## REFERÊNCIAS

ALEMAYEHU S., FEGHALI KC, COWDEN J., KOMISAR J., OCKENHOUSE C.F., KAMAU E. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. **Malaria Journal**, 12: 277, 2013.

ALLISON, A. C. Genetic control of resistance to human malaria. **Curr Opin Immunol**, 21, 499- 505, 2009.

ALY, A. S.; VAUGHAN, A. M.; KAPPE, S. H. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. **Annual Review Microbiology**, 63:195-221, 2009.

AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MÉNARD, R. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nature Medicine**, 12, 220-224, 2006.

APHELOCOMA SÓRDIDA (Swainson). *Plasmodium praecox* Grassi & Feletti, 1890. Plimmer, 1914, Mexico.

ÁVILA, S. L.M. **Avaliação do desempenho de métodos de laboratório no diagnóstico da malária humana: Sugestões para normatização**. São Paulo: USP, Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas/Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, 1994.

BARILLAS-MURY, C., WIZEL, B.; HAN, Y. S. Mosquito immune responses and malaria transmission: lessons from insect model systems and implications for vertebrate innate immunity and vaccine development. **Molecular Biology**, 30, 429-442, 2000.

BARROSO, W. J. A malaria da mata Atlântica no Brasil. **Infarma**, 15, 76 – 77, 2003.

BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut pithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. **Parasitology**, 129, 663-676, 2004.

BELL, B.; WONGSRICHANALAI, C.; B, J.W. Ensuring quality and access for malaria diagnosis: how can it be achieved? **Nature Reviews Microbiology**, 4, 682–695, 2006.

BILLKER, O.; SHAW, M. K.; MARGOS, G.; SINDEN, R. E. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* in vitro. **Parasitology**, 115, 1–7, 1997.

BIOTOOLS B&M LABS. De Sarabia Rosado. **Method for preparing stabilised reaction mixtures, which are totally or partially dried, comprising at least one enzyme, reaction mixtures and kits containing said mixtures.** n. WO2002072002 A2, 11 mar. 2002, 19 setembro 2002.

BISHARA W., SIKORA U., MUDANYALI O., SU T. W., YAGLIDERE O., LUCKHART S., OZCAN A. Holographic pixel super-resolution in portable lensless on-chip microscopy using a fiber-optic array. **Lab Chip**. 7: 1276-9, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Controle da malária. Diretrizes técnicas.** Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Terapêutica da Malária.** 6. ed. Brasília: FUNASA, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Controle da Malária:** PNCM. 2. ed. Brasília: MS/SVS, 2004.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de Bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** 6ª Ed. Rev. Brasília: Ministério da saúde, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Ações de controle da malária: manual para profissionais de saúde na atenção básica.** Brasília: MS/SVS, 2006. 52p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil.** Brasília: MS/SVS, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica: caderno 10 malária.** 7a ed. Brasília: MS/SVS, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Volume 32: 1; 2011.

BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Volume 44: 1, 2013.

BRAY, R. S. On the Parasitic Protozoa of Liberia. II. The Malaria Parasites of Agamid Lizards. **The Journal of Protozoology**. 6: 1, 13–18, 1959.

BRONNER, U.; DIVIS, P.C.; FARNERT, A.; SINGH, B. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. **Malaria Journal**, 8, 15, 2009.

BUSS, P. M. Globalization, poverty and health. **Ciência, saúde coletiva**, 12, 1575-89, 2007.

CASTRO, M. C.; SINGER, B. H. Meio ambiente e saúde: metodologia para análise espacial da ocorrência de malária em projetos de assentamento. **Revista Brasileira de Estudos de População**, 24, 247-262, 2007.

CASTRO, L. P. **Protozooses humanas**. S. Paulo: Fun. BYK, 1993, 14-37.

Center of Disease Control. **Simian Malaria in a USA traveler** - New York, CDC, 58, 229-232, 2009.

CHAN, C. et al. Evidence-Based Point-of-Care Diagnostic Current Status and Emerging Technologies. **Annual Review Analytical Chemistry**, 09: 2641, 2013.

CHO, Y.K.; KIM, J.; LEE, Y., KIM, Y.A.; NAMKOONG, K.; LIM, H.; OH, K.W.; KIM, S.; HAN, J. Clinical evaluation of micro-scale chip-based PCR system for rapid detection of hepatitis B virus. **Biosens Bioelectron**, 21: 2161–2169, 2006.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. Plasmodium ovale: parasite and disease. **Clinical Microbiology Reviews**, 18, 570-81, 2005.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T. M. E.; LEE, K. S.; SHASUL, S. S. G.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H. A.; CONWAY, D. J.; Singh, B. *Plasmodium knowlesi* malaria in human is widely distributed and potentially life threatening. **Clinical Infectious Diseases**, 46: 165-71, 2008

COX-SINGH, J.; HIU, J.; LUCAS, S. B.; DIVIS, P. C.; ZULKARNAEN, M.; CHANDRAN, P.; WONG, K. T.; ADEM, P.; ZAKI, S. R.; SINGH, B.; KRISHNA, S. Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report. **Malaria Journal**, 11: 9-10, 2010.

DAS, A.; HOLLOWAY, B.; COLLINS, W. E.; SHAMA, V. P.; GHOSH, S. K.; SINHA, S.; HASNAIN, S. E.; TALWAR, G. P.; LAL, A. A. Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. **Molecular and Cellular Probes**, 9, 161-165, 1995.

DEANE, L. M. Os grandes marcos na história do controle da malária. Anais do 2º Simpósio de Malária. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 25: II, 12-22, 1992.

DE SOUZA, J. M.; CALVOSA, V. S. P.; VENTURA, A. M. R. S.; PINTO, A. Y. N.; SILVA, R. S.U.; LIBONATI, R. M.F. Malária. In: TONELLI, E.; FREIRE, L. M. S. Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência. Rio de Janeiro: **Medsj**, 2, 1271-1296, 2000.

DVORAK, J. A.; MILLER, L. H.; WHITEHOUSE, W. C.; SHIROISHI, T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. **Science**, 187: 748-50, 1975.

EEDE, V. D. P.; VAN, H. N.; VAN, O. C.; VYTHILINGAM, I.; D. U. C. T.N.; HUNG, L. X.; MANH, H. N.; ANNE, J.; D'ALESSANDRO, U.; ERHART, A. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. **Malaria Journal**, 8:249, 2009.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, 8: 871-4, 1971.

ERDMAN, L. K., KAIN, K. C. Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 6, 82-99, 2008.

FAERSTEIN, N. F. A doença, o parasito, o transmissor. In: TAUIL, P. L. Malária: Agrava-se o quadro da doença no Brasil. **Ciência Hoje** 2: 12, 58-63, 1984.

FERRARI, T. C. A. Malária. IN: CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. **Protozooses Humanas**. São Paulo: Fundo Editorial BYK ,1994. Cap. 2, 14-37.

FOCKE, M.; KOSSE, D.; MÜLLER, C.; REINECKE, H.; ZENGERLE, R.; VON STETTEN, F. Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films. **Lab Chip**. 11, 1365-86, 2010.

GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. Monkey malaria kills four humans. **Trends Parasitology**, 25, 200-4, 2009.

GARRET, L. A **Próxima Peste: As novas doenças de um mundo em equilíbrio**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1995. 47-48p

GAUR, D.; MAYER, G. C. D.; MILLER, H. L. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **International Journal for Parasitology**, 34, 1413 - 1429, 2004.

GERVAIS, L.; DE ROOIJ, N.; DELAMARCHE, E. Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics. **Advanced. Materials**, 23: H151–H176, 2011.

GREENWOOD, B. M.; BOJANG K., WHITTY, C. J., TARGETT, G. A. Malaria. **Lancet**, 365, 1487-98, 2005.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, 415, 670-2, 2002.

GRIMBERG, B. T.; UDOMSANGPETCH, R.; XAINLI, J.; MCHENRY, A.; PANICHAKUL, T. *Plasmodium vivax* invasion of human erythrocytes inhibited by antibodies directed against the *Duffy* binding protein. **PLoS Medicine**, 4: e337, 2007.

GUPTA, L.; KUMAR, S.; HAN, Y. S.; PIMENTA, P. F.; BARILLAS-MURY, C. Midgut epithelial responses of dfferente mosquito-*Plasmodium* combinations: the actin cone zipper repair mechanism in *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National. Academy of Sciences**, 11, 4010-4015, 2005.

HADLEY, T. J.; KLOTZ, F. W.; MILLER, L. H. Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview. **Annual Reviews Microbiology**, 40, 451-77, 1986.

HALL, N.; KARRAS, M.; RAINE, J. D.; CARLTON, J. M.; KOOIJ, T. W.; BERRIMAN, M.; FLORENS, L.; JANSSEN, C. S.; PAIN, A.; CHRISTOPHIDES, G. K.; JAMES, K.; RUTHERFORD, K.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; CHURCHER, C.; QUAIL, M. A.; ORMOND, D.; DOGGETT, J.; TRUEMAN, H. E.; MENDOZA, J.; BIDWELL, S. L.; RAJANDREAM, M. A.; CARUCCI, D. J.; YATES, J. R. R.D.; KAFATOS, F. C.; JANSE, C. J.; BARRELL, B.; TURNER, C. M.; WATERS, A. P.; SINDEN, R. E. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. **Science**, 307, 82-6, 2005.

HERMSEN, C. C.; TELGT, D. S.; LINDERS, E. H.; VAN DE LOCHT, L. A.; ELING, W. M. Detecção de *Plasmodium falciparum* da malária in vivo por PCR em tempo real quantitativo. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 118, 247-51, 2001.

HONGYING, Z. H. U.; SERHAN, O.; ISIKMAN, O. N. U. R.; MUDANYALI, A. L. O. N.; GREENBAUM, A. N. D.; AYDOGAN, O. Z. C. A. N. Optical Imaging Techniques for Point-of-care Diagnostics. **Lab Chip**, 1, 51-67, 2013.

IGLESIAS, N.; SUBIRATS, M.; TREVISI, P.; RAMÍREZ-OLIVENCIA, G.; CASTÁN, P.; PUENTE, S.; TORO, C. Performance of a new gelled nested PCR test for the diagnosis of imported malaria: comparison with microscopy, rapid diagnostic test, and real-time PCR. **Parasitology Research**, 7, 2587-91, 2014.

JONGWUTIWES, S., PUTAPORNITP, C.; IWASAKI, T.; SATA, T.; KANBARA, H. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, 10, 2211-213, 2008.

KAIN, K. C.; MACPHERSON, D. W.; KELTON, T.; KEYSTONE, J. S.; MENDELSON, J.; MACLEAN, J. D. Malaria deaths in visitors to Canada and in Canadian travelers: a case series. **Canadian Medical Association Journal**, 5, 654-659, 2008.

KAPPE, S.; BRUDERER, T.; GANTT, S.; FUJIOKA, H.; NUSSENZWEIG, V.; MENARD, R. Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. **Journal of Cell Biology**, 147, 937-44, 1999.

KAMAU, E.; TOLBERT, L. S.; KORTEPETER, L.; PRATT, M.; NYAKOE, N. Desenvolvimento de um género específico da transcriptase inversa quantitativa em tempo real de ensaio altamente sensível por PCR para a detecção e quantificação de plasmódio por amplificação de ARN e de ADN dos genes de rRNA 18S. **Journal of Clinical Microbiology**, 49, 2946-2953, 2011.

KIRCHGATTER, K.; NOGUEIRA, S. L.; PADILHA, A.; CURADO, I.; BOULOS, M.; D SANTI, S. M. Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in an asplenic patient in Brazil. **British Medical Journal**, 331, 576 – b, 2005.

KROGSTAD, D. J. **Paludismo species. Malaria**. In: MANDELL, G.; BENNET, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. USA: Churchill Livingstone, 4<sup>a</sup> ed, 1995, p. 2415-2427.

KROTOSKI, W. A. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 79: 1, 1-11, 1985.

KULINSKY, L., NOROOZI, Z.; MADOU, M. Present technology and future trends in point-of-care microfluidic diagnostics. **Methods in Molecular Biology**, 949, 3-23, 2013.

KUMAR, S.; BARILLAS-MURY, C. Ookinete-induced midgut peroxidases detonate the time bomb in anopheline mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 35, 721-727, 2005.

KUMAR, N.; PANDE, V.; BHATT, R. M.; SHAH, N. K.; MISHRA, N.; SRIVASTAVA, B. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. **Acta Tropica**; 125: 1, 119 -121, 2013.

KAMAU, E., ALEMAYEHU, S., FEGHALI, K.C.; SAUNDERS, D., OCKENHOUSE, C.F. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. **PLoS One**, 8, e71539, 2013.

KWIATKOWSKI, D. P. How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. **American Journal of Human Genetics**, 77: 2, 171–192, 2005.

LAL, A. A.; CHANGKASIRI, S.; HOLLINGDALE, M. R.; MCCUTCHAN, T. F. Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 36, 67-71, 1989.

LAVÉLAN, A. Des hématozoaires des oiseaux voisins de l'hématozoaire du paludisme. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie et de ses Filiales**, Paris, v.43, p.127-132. 1891.

Lee, M. A.; Tan, C. H.; A. W., L. T.; Tang, C. S.; Singh, M. I. Em tempo real de fluorescência baseada em PCR para detecção de malária Parasitas. **Journal of Clinical Microbiology**, 40, 4343-4345, 2002.

Lee, N. Y. Recent Progress in Lab-on-a-Chip Technology and Its Potential Application to Clinical Diagnoses. **International Neurology Journal**. 17: 1, 2–10, 2013.

LIU, C.; QIU, X.; ONGAGNA, S.; CHEN, D.; CHEN, Z.; ABRAMS, W. R.; MALAMUD, D.; CORSTJENS, P. L.; BAU, H. H. A timer-actuated immunoassay cassette for detecting molecular markers in oral fluids. **Lab Chip**. 6: 768-76, 2009.

LOMAR, A.; VIDAL, J. E.; LOMAR, F. P.; BARBAS, C. V.; DE MATOS, G. J.; BOULOS, M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 9, 425-30, 2005.

LUCHAVEZ, J.; ESPINO, F.; CURAMENG, P.; ESPINA, R.; BELL, D.; CHIODINI, P.; NOLDER, D.; SUTHERLAND, C.; LEE, K.; SINGH, B. Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines. **Emerging Infectious Diseases**, 14, 811-3, 2008.

MAEGRAITH, B. G.; ADAMS, A. R. D. **Clinical Tropical Diseases**. 2<sup>a</sup>ed., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1960,189-225.

MANGOLD, K. A.; MANSON, R. U.; KOAY, E. S.; STEPHENS, L.; REGNER, M.; THOMSON, R. B. Jr.; PETERSON, L. R.; KAUL, K. L. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, 43, 2435-2440, 2005.

MANSON, P., A Clinical Lecture on the Parasite of Malaria and its Demonstration, **Lancet**, 1, 6-9, 1894.

MAO, X., HUANG, T. J. Microfluidic diagnostics for the developing world. **Lab Chip**, 8, 1412-6, 2012.

MARCHIAFAVA, E.; CELLI, A. Weitere Untersuchungen über die Malariainfektion. Fortschritte der Medicin. **München**, 3, 787–806, 1885.

MARX, A.; PEWSNER, D.; EGGER, M.; NÚRESCH, R.; BUCHER, H. C.; GENTON, B. Meta-analysis: accuracy of rapid tests for malaria in travelers returning from endemic areas. **Annals of Internal Medicine**, 142: 10, 836-846, 2005.

MATSUBARA, Y.; KERMAN, K.; KOBAYASHI, M.; YAMANURA, S.; MORITA, Y.; TAMIYA, E. Microchamber array based DNA quantification and specific sequence detection from a single copy via PCR in nanoliter volumes. **Biosensors & Bioelectronics**, 20, 1482–1490, 2005.

MEIS, J. F.; WISMANS, P. G.; JAP, P. H.; LENSEN, A. H.; PONNUDURAI, T. A. Scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. **Acta Tropica**, 3, 227-236, 1992.

MENS, P.; SPIEKER, N.; OMAR, S.; HEIJNEN, M.; SCHALLIG, H.; KAGER, P. A.: Is molecular biology the best alternative for diagnosis of malaria to microscopy? A comparison between microscopy, antigen detection and molecular tests in rural Kenya and urban Tanzania. **Tropical Medicine & International Health**, 12, 238-244, 2007.

MILLER, L. H.; MASON, S. J.; DVORAK, J. A.; MCGINNIS, M. H.; ROTHMAN, I. K. Erythrocyte receptors for *Plasmodium knowlesi* malaria: *Duffy* blood group determinants. **Science**, 189, 561–3, 1975.

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

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. **Cellular Microbiology**, 12, 1113-1118, 2004.

MUDANYALI, O., BISHARA, W., OZCAN, A. Lensfree super-resolution holographic microscopy using wetting films on a chip. **Optics Express**. 29:18, 17378-89, 2011.

MURRAY, C. K. Jr.; GASSER, R. A.; MAGILL, A. J.; MILLER, R. S. Update on RDT Mal. **Clinical Microbiology Reviews**, 21, 97- 110, 2008.

NG, O.; O. O. I., E.; LEE, C.; LEE, P.; NG, L.; PEI, S.; TU, T.; LOH, J.; LEO, Y. Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, 14, 814-6, 2008.

NOEDL, H.; YINGYUEN, K.; LAOBOONCHAI, A.; FUKUDA, M.; SIRICHAISINTHOP, J.; MILLER, R. S. Sensitivity and specificity of an antigen detection ELISA for malaria

diagnosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75, 1205-1208, 2006.

NOH, J.; SUNG, S. W.; JEON, M.K.; KIM, S.H.; LEE, L.P.; WOO, S.I. In situ thermal diagnosis of the micro-PCR system using liquid crystals. **Sensors and Actuators A Physical**, 122, 196–202, 2005.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Repartição Sanitária Pan-Americana. Escritório Regional da ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Manual de Diagnóstico Microscópico da Malária**. 4ª ed., Washington, D.C., E.U.A. 1975. 109p.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Recompilação da Produção Intelectual do Dr. Agostinho Cruz Marques**, Brasília: 1998.

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe de la situacion del paludismo em las Americas**, 2008. Washington, D.C.: OPS; 2010.

PARAJUI, K.; HANCHANA, S.; INWONG, M.; PUKRITTAYAKAYAMEE, S.; GHIMIRE, P. Comparative evaluation of microscopy and polimerase chain reaction (PCR) for the diagnosis in suspect malaria patients of Nepal. **Nepal Medical College Journal**, 11, 23-27, 2009.

PERANDIN, F.; MANCA, N.; CALDERARO, A.; PICCOLO, G.; GALATI, L.; RICCI, L.; MEDICI, M.C.; ARCANGELETTI, M.C.; SNOUNOU, G.; DETTORI, G.; CHEZZI, C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 42, 1214-1219, 2004.

PÉREZ, H. A. La malaria por Plasmodium Vivax (Grassi y Feletti, 1890) en los trópicos y los retos de la cura radical trópicos y los retos de la cura radical. **Interciência**, 9, 9, 2004.

PESSOA, S. M.; AMILCAR, V. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.10ª ed.

PESSOA, S. B.; AMILCAR, V. Gênero *Plasmodium* - Parasitas da malária. In: **Parasitologia Médica**. 11<sup>a</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982. p. 280-291.

PRAKASH, R.; KALER, K. V. I. S. An integrated genetic analysis microfluidic platform with valves and a PCR chip reusability method to avoid contamination. **Microfluidics and Nanofluidics**. 3, 177–187, 2007.

PRICE, L.; PRANCHE, T.; RAYNER, C.; KRISHNA, S. Acute respiratory distress syndrome in *Plasmodium vivax* malaria: case report and review of the literature. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 101, 655-9, 2007.

RAMPAZZO, R. C. P; CEREDA, M.; COCCI, A.; DE FAZIO, M.; BIANCHESSI, M. A.; GRAZIANI, A. C.; KRIEGER, M. A.; COSTA, A. D. T. Demonstration of na On-chip Real-Time PCR for the detection of *Trypanossoma cruzi*. **IFMBE Proceeding**, 41, 872 – 873.

REY, L. **Malária: Os Plasmódios Humanos**. In: Bases da Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.p. 106-114.

RUBIO, J. M.; BENITO, A.; BERZOSA, P. J.; ROCHE, J.; PUENTE, S.; SUBIRATS, M.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA, L.; ALVAR, J. Usefulness of seminested multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, 37, 3260-4, 1999.

SANTOS FILHO, L. C. **História Geral da Medicina Brasileira**. São Paulo: HUCITEC, 1991.

SINNIS, P.; ZAVALA, F. The skin stage of malaria infection: biology and relevance to the malaria vaccine effort. **Future Microbiology**, 3, 275-278, 2008.

SNEWIN, V. A.; KHOURI, E.; WATTAVIDANAGE, J. A new polymorphic marker for PCR typing of *Plasmodium vivax* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 71, 135–138, 1995.

SNOUNOU, G.; VIRIYAKOSOL, S.; JARRA, W.; THAITHONG, S.; BROWN, K.N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 58, 283-289, 1993.

SNOUNOU, G. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. **Methods in Molecular Biology**, 50, 263-291, 1996.

SOUZA, J. M.; COUTO, Á.; AUGUSTO, R. A. Malária. In: Leão, Queiróz, R.N. **Doenças Infecciosas e Parasitárias Enfoque Amazônico**. Belém: CEJUP, 1997. Cap.41, p. 645-669.

STEPHANIE, P.; JOHNSTON, N. J.; PIENIAZEK, M. V.; XAYAVONG, S. B.; SLEMENDA, P. P.; WILKINS, A. N. D; SILVA, A. J. PCR as a Confirmatory Technique for Laboratory Diagnosis of Malaria. **Journal of Clinical Microbiology**, 44: 3, 1087–1089, 2006.

STEPHENS, J. W. W. A new malaria parasite of man. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 16, 383–388, 1922.

STEVENSON, M. M.; RILEY, M. M. Innate immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, 4, 169 – 80, 2004.

TURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J. M.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science**, 313, 1287-90, 2006.

SUAREZ-MUTIS, M. C.; COURA, J. R. Changes in the epidemiological pattern of malaria in a rural area of the middle Rio Negro, Brazilian Amazon: a retrospective analysis. **Cadernos de Saúde Pública**, 23, 795-804, 2007.

SUN, Y.; DHUMPA, R.; BANG, D. D.; HØGBERG, J.; HANDBERG, K.; WOLFF, A. A lab-on-a-chip device for rapid identification of avian influenza viral RNA by solid-phase PCR. **Lab Chip**. 8, 1457-63, 2011.

SUN, Y.; HOGBERG, J.; CHRISTINE, T.; FLORIAN, L.; MONSALVE, L. G.; RODRIGUEZ, S.; CAO, C.; WOLFF, A.; RUANO-LOPEZ, J. M.; BANG, D. D. Pre-storage of gelified reagents in a lab-on-a-foil system for rapid nucleic acid analysis. **Lab Chip**. 8, 1509-14, 2013.

TADA, M. S.; MARQUES, R. P.; MESQUITA, E.; DALLA MARTHA, R. C.; RODRIGUES, J. A.; COSTA, J. D.; PEPELASCOV, R. R.; KATSURAGAWA, T. H.; PEREIRA-DA-SILVA, L. H. 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 263-9, 2007.

TSAI, N. C.; SUE, C.Y. SU-8 based continuous-flow RT-PCR biochips under high-precision temperature control. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 313–317, 2006.

VAUGHAN, J. A.; THIMASARN, K.; KHUNTIRAT, B. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/vivax* endemic area in Thailand. **Malaria Journal**, 5, 121, 2006.

VAUGHAN, A. M.; ALY, A. S. I.; KAPPY, S. H. I. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. **Cell Host Microbe**, 4, 209-18, 2008.

VIVIER, E.; DESPORTES, I. Apicomplexa. In **Handbook of Protozoa**, MARGULIS, L.; CORLISS, J.; MELKONIAN, M.; CHAPMAN, D., eds. Boston: Jones and Bartlett. 1989.

VYTHILINGAM, I.; NOORAZIAN, Y. M.; HUAT, T. C., JIRAM, A. I.; YUSRI, Y. M.; AZAHARI, A. H. I.; NORPARINA, A.; NOORRAIN, S. LOKMANHAKIM. *Plasmodium knowlesi* in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia. **Parasites & Vectors**, 1, 26. 2008.

WATERS, A.; MCCUTCHAN, T. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. **Lancet**, 17, 1343-1346, 1989.

WANG, J.; CHEN, Z.Y.; CORSTJENS, P.L.A.M.; MAUK, M.G.; BAU, H.H. A disposable microfluidic cassette for DNA amplification and detection. **Lab Chip** 6, 46–53, 2006.

WELCH, S. G.; GREGOR, M. C. I. A.; WILLIAMS, K. The *Duffy* blood group and malaria prevalence in Gambian West African. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 71, 295-6, 1977.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Diseases**, 46, 172-3, 2008.

WHO. **World malaria report 2013**. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2013.

WILSON, L.; HARPER, D. C.; TAMI-MAURY, I.; ZARATE, R.; SALAS, S.; FARLEY, J. Global Health Competencies for Nursing in the Americas. **Journal of Professional Nursing**, 28: 4, 213-22, 2012.

WONGSRICHANALAI, C.; BARCUS, M.J.; MUTH, S.; SUTAMIHARDJA, A.; WERNSDORFER, W. H. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 77, 119-127, 2007.

WU, W.; KANG, K.T.; LEE, N.Y. Bubble-free on-chip continuous-flow polymerase chain reaction: concept and application. **Analyst**. 7; 136: 11, 2287-93, 2011.

YAMAUCHI, L.; COPPI, A.; SNOUNOU, G.; SINNIS, P. *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. **Cellular Microbiology**, 9, 1215-1222, 2007.

ZHANG, C.; XING, D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. **Nucleic Acids Research**, 35: 13; 4223-4237, 2007.

ZHANG, Y.; OZDEMIR, P. Microfluidic DNA amplification a review. **Analytical Chimica Acta**, 13; 638: 2; 115-25, 2009.

ZHU, H. M.; LI, J.; ZHENG, H. Human natural infection of *Plasmodium knowlesi*. **Display Setting**, 24:1, 70-1, 2006.