

Diagnóstico de malária humana usando PCR em Tempo Real duplex para detecção precisa de *Plasmodium spp.* diante de cenários de eliminação

Human malaria diagnosis using duplex Real Time PCR for precise detection of *Plasmodium spp.* facing elimination scenarios

Janaina de L. Leão¹, Giselle M.R. Viana², Eduardo J.M. Santos³

¹ Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Belém, Pará, Brasil.

² Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária, Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil.

³ Laboratório de Genética Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

Resumo

Introdução: Novas abordagens moleculares, como a PCR em Tempo Real têm sido desenvolvidas com a finalidade de garantir a detecção acurada de espécies de *Plasmodium spp.* Essa técnica possui baixo risco de contaminação cruzada e ambiental, rápida execução e limite de detecção de 1-5 parasitos/ μ L de sangue, sendo factível para rastreamento de assintomáticos, detecção de infecções mistas e baixas parasitemias. O diagnóstico preciso de malária é fundamental para assegurar o tratamento eficaz desse agravo, além de melhorar a prestação de serviços em saúde e gerar dados para direcionar as ações de controle regionais e nacionais, sobretudo diante dos progressos dessas estratégias em direção à eliminação. **Objetivo:** Validar protocolo de PCR em Tempo Real duplex para detecção espécie-específica das quatro espécies do gênero *Plasmodium* em amostras clínicas. **Metodologia:** Foram incluídos pacientes com febre (temperatura axilar $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$) ou história de febre nas últimas 24h, que se apresentaram nos municípios de Belém, Goianésia do Pará e Itaituba, estado do Pará, para realizar o diagnóstico da malária nos anos de 2014 a 2015. O DNA foi extraído de amostras impregnadas em papel de filtro, usando *kits* comerciais e processamento do material em um laboratório de referência. Além da microscopia pelas técnicas de Gota Espessa/Distensão Sanguínea para identificação da espécie de plasmódio e determinação da parasitemia, preparadas e examinadas por dois microscopistas independentes, foram realizados ensaios de Nested-PCR e PCR em Tempo Real duplex. Todos os procedimentos laboratoriais foram executados em duplicatas e para a Nested-PCR e PCR em Tempo Real, foram utilizados controles positivos para cada uma das quatro espécies de *Plasmodium* e controle negativo. A Nested-PCR foi usada como teste de referência. **Resultados:** Do total de 312 amostras avaliadas, a Gota Espessa detectou 136 amostras positivas, sendo seis infecções mistas (*P.falciparum/P.vivax*) e 176 negativas. Já a PCR em Tempo Real identificou 138 e 174 isolados positivos e negativos, respectivamente, detectando 14 infecções mistas. A sensibilidade e a especificidade da PCR em Tempo Real foram 98,57% e 100,00%,

respectivamente. A microscopia mostrou sensibilidade de 97,14% e especificidade de 100,00%. A correlação entre PCR em Tempo Real e Nested-PCR apresentou excelente concordância na detecção de amostras positivas e negativas (0,96 e 0,98, *kappa* IC:95%). No caso de infecções mistas, a PCR em Tempo Real identificou maior número que a Nested-PCR, obtendo concordância boa para identificação deste perfil de resposta entre as duas técnicas (0,87 *kappa* IC:95%). **Conclusão:** O protocolo de PCR em Tempo Real duplex avaliado apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade excelentes para detecção de infecções por *Plasmodium spp.* em amostras clínicas, sendo uma ferramenta valiosa para o diagnóstico preciso de malária, em especial na detecção de infecções mistas.

Introdução

Métodos baseados em biologia molecular têm sido utilizados para detecção de espécies de *Plasmodium* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A técnica de Nested-PCR ou PCR aninhada pode ser aplicada na identificação de indivíduos com malária em triagens epidemiológicas e em centros de referência [1, 2, 3]. Apesar de algumas vantagens, como baixo limite de detecção (1 a 5 parasitos/ μ L de sangue), alta sensibilidade e especificidade (maior ou igual a 95%) [4], a técnica de Nested-PCR apresenta algumas limitações, como a demanda de tempo no processamento da técnica, risco de contaminação cruzada e ambiental na manipulação dos produtos da amplificação e infraestrutura adequada a sua aplicação [5]. Além disso, variações de sequências nas cepas de *P. ovale* tem afetado a precisão de detecção desta espécie em populações oriundas de diferentes regiões ao redor do mundo, quando se emprega a técnica de Nested-PCR com os *primers* ora disponíveis [6].

Assim, novas abordagens moleculares para detecção das espécies de *Plasmodium*, com ênfase as de importância clínica (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. ovale* e *P. malariae*), têm sido desenvolvidas, dentre essas há a PCR em Tempo Real [7, 8, 9]. A PCR em Tempo Real viabiliza uma ferramenta molecular ainda mais sensível que as disponíveis, com menor risco de contaminação, possibilidade de quantificação dos patógenos ou carga parasitária, além de processamento mais rápido, em um prazo de aproximadamente 3 horas [7]. Essas características não são importantes apenas para o diagnóstico individual e avaliação da eficácia clínica, mas serão cada vez mais indispensáveis diante de inquéritos epidemiológicos e para avaliar o sucesso dos programas de controle da malária e campanhas de eliminação [8, 9,10].

Portanto, a eficiência das ferramentas diagnósticas da malária deve incluir ensaios que possam detectar todos os casos, inclusive portadores ou assintomáticos, pois estes indivíduos são reservatórios do parasito, bem como portadores de infecção mistas, uma vez que a identificação correta do parasito é importante para a intervenção terapêutica adequada a cada espécie [1]. Há pesquisadores que sugerem, inclusive, a adoção de duas ou mais técnicas moleculares com fundamentos diferentes para estabelecimento do “Consenso Molecular”, que deveria ser considerado o padrão-ouro, pois garantiria um parâmetro seguro e acurado para fins de diagnóstico. E, diante

disso, a técnica de PCR em Tempo Real seria uma das empregadas para esse fim [1, 10, 11].

Várias tecnologias e protocolos de PCR em Tempo Real estão disponíveis [12, 13, 14, 15]. O protocolo adotado nesse estudo foi descrito por Rougemont *et al.* [7], é uma técnica de PCR em Tempo Real duplex, que pode detectar em um só ensaio a presença das quatro principais espécies de *Plasmodium* e utiliza conjunto de *primers* para amplificação da menor subunidade do gene 18S rRNA, uma vez que este alvo contém regiões altamente conservadas e em grande número de cópias. Além disso, esse protocolo pode ser adaptado para identificação de outras espécies de importância clínica, por meio da inclusão de sondas do sistema *Taqman* para identificação, por exemplo, do *P. knowlesi* em uma abordagem multiplex [7, 11]. Ressalta-se que esse protocolo pode ser aplicado como ferramenta de triagem em larga escala, pois processa grande número de amostras ao mesmo tempo [16, 17, 18].

Assim, esse trabalho teve como objetivo principal validar um protocolo qualitativo de PCR em Tempo Real duplex para detecção espécie-específica das quatro espécies de *Plasmodium* em amostras clínicas de indivíduos provenientes de três municípios do estado do Pará, Brasil.

Métodos

Aspectos éticos

Todas as amostras utilizadas no estudo para análise de microscopia, Nested-PCR e PCR em Tempo Real somente foram obtidas após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas, sob o parecer de nº 004/2015 (IEC/SVS/MS). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), no caso dos maiores de 18 anos, ou assentiram em participar por meio da adoção do termo de assentimento para os menores de 18 anos, para posterior preenchimento de Ficha Clínico-Epidemiológica.

Área de estudo

A área de estudo compreendeu os municípios de Belém, Goianésia do Pará e Itaituba, no estado do Pará, região Amazônica brasileira. As condições climáticas, distribuição hídrica e o desmatamento florestal favorecem a manutenção do ciclo de transmissão da malária nessa região [19, 20, 21, 22]. Belém é um município de área não endêmica localizado no nordeste do estado, Goianésia do Pará é um município de área endêmica para malária que está localizado na região sudeste do estado e Itaituba, localizado a sudoeste do estado, é uma localidade caracterizada pela intensa atividade de mineração de ouro no Vale do Rio Tapajós [23, 24, 25]. Essas áreas possuem clima equatorial, marcado por longos períodos chuvosos durante o ano, com uma curta estação seca. Há predominância da vegetação tropical úmida, com temperatura média anual de 26° a 28°C. Esses fatores climáticos associados aos fatores socioeconômicos influenciam na manutenção dos casos de malária no estado do Pará [26].

As duas áreas endêmicas desse estudo compõem o grupo dos 27 (vinte e sete) municípios que concentram 60% dos registros de malária na região Amazônica brasileira, além de também fazerem parte dos 17 municípios prioritários do estado do Pará que detém 90% dos casos neste estado [27].

Dos 142.314 casos registrados na região Amazônica em 2015, o estado do Pará foi responsável por 9.418 casos, sendo o *P. vivax* a espécie com maior prevalência no estado. Este cenário evidencia redução significativa dos casos da doença, entretanto é necessário manter a efetividade das ações de controle e prevenção da malária, como objetiva o PNCM (Programa Nacional de Controle da Malária) [19].

Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de sangue da polpa digital provenientes de indivíduos com manifestações clínicas sugestivas de malária que buscarem o Serviço Público de Saúde nos municípios selecionados. Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos com idade maior que oito e menor que 80 anos, febre documentada (temperatura auxiliar $>37.5^{\circ}$ C) ou referida nas 24 horas anteriores e primeira consulta para a doença atual. Já os critérios de exclusão, foram: pacientes menores de 08 (oito) anos, afebril ou nenhum histórico de febre, consulta de acompanhamento ou retorno para a doença atual, gravidez referida ou nutrizes e uso de tratamento antimalárico nos últimos 30 dias.

Para minimizar o desconforto do paciente, as amostras de sangue foram obtidas no momento em que os pacientes foram submetidos à coleta de sangue pela equipe de saúde dos municípios participantes. Um total de oito gotas (360 μ L) de sangue foi necessário para essa avaliação. Quatro gotas (cerca de 200 μ L) foram utilizadas no preparo de quatro lâminas: duas Distensões Sanguíneas e duas Gotas Espessas (GE). As quatro gotas de sangue adicionais foram recolhidas em papel de filtro (cartões FTA Elute tipo Whatman®) para extração de DNA.

Diagnóstico microscópico

Para cada participante, duas lâminas foram confeccionadas e coradas da seguinte forma: duas gotas de sangue total (cada uma com ~ 10 μ L de sangue) foram aplicadas a uma lâmina para preparar a GE e outras duas gotas (cada uma com ~ 3 μ L de sangue) para as Distensões sanguíneas. Após secagem à temperatura ambiente (TA), a hemoglobina foi removida das GE pela utilização de solução de azul de metileno fosfatado e a Distensão foi fixada com o auxílio de solução de álcool métilico. Em seguida, as GE e Distensões foram coradas com solução alcoólica de Giemsa (4% em solução tamponada a um pH de 7,0%). Uma vez coradas, as lâminas foram armazenadas no Instituto Evandro Chagas para a leitura [28].

GE foram examinados 1000X para identificar espécies de parasitos e determinar a densidade parasitária. A parasitemia foi calculada pela contagem do número de parasitos assexuados identificados em 200 leucócitos pela GE, e convertido o resultado para parasitos por microlitro, assumindo uma contagem padrão de 6000 leucócitos μ L. O esfregaço sanguíneo foi utilizado para complementar a identificação das espécies de

Plasmodium, quando necessário. Todas as leituras de microscopia foram realizadas no Laboratório de Pesquisas Básicas em Malária do Instituto Evandro Chagas, em Ananindeua, Pará.

Todos os esfregaços de sangue foram examinados por dois microscopistas independentes no Instituto Evandro Chagas. Eles revisaram os resultados uns dos outros de forma cega. Esfregaços de sangue com diferenças no diagnóstico da espécie ou densidade parasitária assexuada > 50% entre os dois microscopistas foram reexaminados por um terceiro microscopista independente também no Instituto Evandro Chagas.

Extração de DNA

Foram utilizados *kits* comerciais (*QIAamp*[®] *DNA Blood Kit* - QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) para extração de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) das amostras de sangue impregnadas em papel de filtro, segundo recomendações do fabricante. O DNA extraído foi armazenado à temperatura de -20 °C (curto período), até a realização das análises moleculares (Nested-PCR e PCR em Tempo Real).

Controle Interno Endógeno

Para garantir a qualidade do DNA genômico extraído, foram realizadas reações de PCR para o alvo da β -globina (*Homo sapiens*), um gene de controle interno da reação molecular. Alíquotas do DNA obtidas da extração, controles positivo (amostra de DNA de sangue humano) e negativo (amostra contendo a mistura de reagentes e água ultrapura) foram submetidos à reação de PCR, seguindo o protocolo e conjunto de *primers* descritos por Bell *et al.* [29] (Tabela 1), o qual produzirá um fragmento ou *amplicon* de 268 pb (pares de bases) nas amostras positivas, o que é indicativo da qualidade do DNA genômico.

Tabela 1- Sequência de *primers* para o gene da β -globina humana pela reação de PCR convencional, segundo o protocolo de Bell *et al.* [29].

Nome do iniciador	Sequência do nucleotídeo (5' → 3')
GH20 (forward)	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC
PC04 (reverse)	CAACTTCATCCACGTTACC

Reação de Nested-PCR

A reação de Nested-PCR para amplificação da subunidade menor do gene para o RNA ribossômico 18S (ssurRNA) de *Plasmodium spp.* foi realizada utilizando *primers* para o gênero *Plasmodium* (rPLU 5 e rPLU 6), e conjunto de *primers* específicos para cada espécie, como previamente descrito [2] (Tabela 2). A reação foi realizada em um volume total de 50 μ L, contendo 10Mm Tris pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 125 μ M, 50mM KCL, dNTP, 2,5mM de cada *primer* (rPLU5\rPLU6 para nested 1 e rPV1\rPV2 , rPF1\rPF2, rPM1\rPM2, rPO1\rPLU6, para *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. ovale*, respectivamente, para a nested 2), e 0.5 U Taq

Polymerase (Bioline). Os produtos da Nested-PCR, controles positivos e negativos e marcador de peso molecular de 100 pb foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% (*Ultra pure agarose*, BRL 155517-014), corados com *GelRed* 10.000x em água (*GelRed Nucleic Acid Gel Stain*, Biotium®, Uniscience LTDA.), a 100 volts por 1 hora. Posteriormente, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta (Fluo-Link, Flowgen) e fotografado em sistema de fotodocumentação (Kodak® Edas 290), produzindo *amplicon* de 144 a 1.100 pb nas amostras positivas, de acordo com a espécie detectada.

Tabela 2. Sequência de primers para amplificação do gene do RNA ribossômico 18S (ssurRNA) de *Plasmodium spp.* pela Técnica de Nested-PCR.

<i>Primer</i>	Sequência do nucleotídeo (5' → 3')	Espécie	Comprimento do <i>amplicon</i> (pb)
PLU5 PLU6	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	<i>Plasmodium spp.</i> (primeira amplificação)	~ 1,100
rFAL1 rFAL2	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	<i>P. falciparum</i>	205
rVIV1 rVIV2	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	<i>P. vivax</i>	120
rMAL1 rMAL2	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	<i>P. malariae</i>	144
rOVA1 rOVA2	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG	<i>P. ovale</i>	800

Desenho de primers e sondas para a reação de PCR em Tempo Real

Primers (forward e reverse) e sondas fluorescentes do sistema *TaqMan* foram utilizadas de acordo com protocolo estabelecido [7] com modificações, conforme listados na Tabela 3. O corante de referência da PCR em Tempo Real foi o ROX (Applied Biosystems, USA).

Modificações foram realizadas nas sondas fluorescentes para *P. vivax* (VIC- repórter e TAMRA, *quencher*) e *P. ovale* (VIC- repórter e MGBNFQ, *quencher*), para adequações aos filtros de leitura do aparelho ou termociclador do tipo *StepOne Plus* (Applied Biosystems, USA) utilizado no estabelecimento do protocolo.

Sondas para *P. malariae* e *P. ovale* continham grupos *Minor Groove Binder* (MGB) (Applied Biosystems, USA) e *P. falciparum* continham *Black Hole Quencher* (BHQ), que formavam ligação dupla estável na fita simples de DNA, permitindo o uso de pequenas sondas, com maior especificidade em ensaios de hibridização.

Tabela 3. Sequência de *primers* e sondas para detecção e identificação de espécies de *Plasmodium spp.* por PCR em Tempo Real.

Espécie	<i>Primers</i> ou sondas	Concentração (nM)	Sequência (5'-3')
<i>Plasmodium spp.</i>	Plasmo 1-F	200	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA
<i>Plasmodium spp.</i>	Plasmo 2- R	200	AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA
<i>P.falciparum</i>	Falcproube	80	FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-BHQ1
<i>P.vivax</i>	Vivproube	80	VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-TAMRA
<i>P.malariae</i>	Malaproube	80	FAM-CTATCTAAAAGAAACACTCAT-MGBNFQ
<i>P.ovale</i>	Ovaproube	80	VIC-CGAAAGGAATTTTCTTATT-MGBNFQ

F: Forward; R: Reverse; FAM: 6-carboxyfluorescein; TAMRA: 6-carboxytetramethyl-rodamine; VIC: 6-carboxyfluorescein; BHQ: Black Hole Quencher; MGBNFQ: Minor Groove Binder Non fluorescent Quencher.

Reação de PCR em Tempo Real duplex

Todos os ensaios de PCR em Tempo Real foram realizados em placa de 96 poços, em termociclador *StepOne Plus* (Applied Biosystems, USA). Resumidamente, o ensaio foi realizado em um volume final de 12,5 µL, contendo 2 µL de DNA extraído, 6,25 µL de TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0,25 µL de cada *primer* (Plasmo-F e Plasmo R, para gênero) e 0,1 µL de cada sonda específica por espécie de *Plasmodium*, acopladas de forma duplex em um mesmo tubo (conjunto de sondas das seguintes duplas *VivProbe/FalProbe* e *MalProbe/OvaProbe*) [7].

Todas as análises de PCR em Tempo Real foram realizadas em duplicata, utilizando controles positivos para as quatro espécies testadas e negativos (*no template control*) para cada reação. Para controles positivos, foram utilizadas amostras de DNA da linhagem padrão Sal-1 para *P. vivax*, DNA da linhagem referência 3D7, W2 e Dd2 para *P. falciparum*, e linhagens 3D7 para *P. malariae* e *P. ovale*. Água Ultra Pura livre de DNase (BRL 155617-020) foi utilizada como controle negativo.

Além das amostras e controles citados anteriormente, foi incluído um grupo de 21 amostras correspondentes a outras espécies de hemoparasitas, a saber: *Babesia canis* (9), *Leishmania chagasi* (7) e *Anaplasma platys* (5), que foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Tecnologia Biomolecular da Universidade Federal do Pará. Esses isolados foram crescidos para se verificar a especificidade dos *primers* utilizados pelo protocolo molecular.

As condições de PCR em Tempo Real consistiram em uma etapa inicial de 50°C por 2 min, seguida de fase de desnaturação a 95°C por 10 min, 45 ciclos a 95°C por 15 s, e extensão a 60°C por 1 min, com aquisição de fluorescência no final de cada etapa de extensão. Foi utilizado como *cut-off* o valor de até 40 ciclos limiar (Ct), para amostra ser considerada positiva.

Análise estatística

Os dados coletados e obtidos pelo estudo foram inseridos em um banco de dados eletrônico no programa Epi-Info (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, CDC, Atlanta-Georgia-EUA) e foram utilizados para o gerenciamento e análise dos dados. Para elaboração de gráficos e tabelas, foi utilizado o programa Bioestat@5.0. A análise estatística foi realizada pela abordagem da distribuição das probabilidades, utilizando-se o teste do Crivo ou *Screening Test* para determinação dos parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo do teste positivo (VPP) e negativo (VPN), falso-positivo, falso-negativo e acurácia em relação ao padrão-ouro (Nested-PCR). Para análise da concordância dos resultados, foi adotado o teste *Kappa*. O nível de significância adotado foi de 0,05 [30].

Os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram calculados conforme segue:

Sensibilidade = verdadeiros positivos / (verdadeiros positivos + falsos negativos) x 100.

Especificidade = verdadeiros negativos / (verdadeiros negativos + falsos positivos) x 100.

VPP= verdadeiros positivos/ (verdadeiros positivos – falsos positivos) x 100.

VPN= verdadeiros negativos/ (verdadeiros negativos – falsos negativos) x 100.

Resultados

Um total de 312 amostras foram coletadas através de punção digital no período de junho de 2014 a novembro de 2015. Dessa amostragem, 159 amostras foram procedentes do município de Goianésia do Pará, 132 de Itaituba e 42 isolados oriundos do município de Belém, estado do Pará.

A média geométrica da parasitemia assexuada de todos os pacientes foi 151.3 parasitos/uL (intervalo: 0–15.414), enquanto a média aritmética simples para a parasitemia sexuada foi 15.1 parasitos/uL (intervalo: 0–120).

Espécie-especificidade dos *primers* e sondas de PCR em Tempo Real duplex

Todos os conjuntos de *primers* e também as sondas específicas para cada espécie de *Plasmodium* corresponderam corretamente às amostras controles (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malaria* e *P. ovale*) utilizadas em cada ensaio de PCR em Tempo Real. Inclusive a sonda referente ao *P. falciparum* (FalcProbe) detectou todas as cepas de referência adotadas (3D7, W2 e Dd2). Quanto às sondas modificadas para *P. vivax* e *P. ovale*, houve também boa detecção para as cepas das linhagens Sal-1 e 3D7, respectivamente.

Para análise de especificidade clínica, o grupo de outros hemoparasitos testado (*Babesia canis*, *Leishmania chagasi* e *Anaplasma platys*) não apresentou nenhuma amplificação sugestiva de positividade, nem reação cruzada com as amostras testadas, sendo negativo em todos os ensaios de PCR em Tempo Real.

Reação de PCR em Tempo Real duplex para identificação espécie-específica

Do total de 312 amostras analisadas, 43,59% (136/312) foram positivas para ao menos uma espécie do gênero *Plasmodium* (densidades parasitárias de 5 a 16.414 parasitos/uL de sangue) e 56,41% (176/312) foram negativas pela microscopia. O método molecular de Nested-PCR detectou 44,87% (140/312) amostras positivas e 55,13% (172/312) negativas, enquanto o PCR em Tempo Real identificou 44,24% (138/312) amostras positivas e 55,76% (174/312) negativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Frequência dos resultados por espécie obtida pelas técnicas de Microscopia, Nested-PCR e PCR em Tempo Real.

Resultados	Frequências		
	Microscopia	Nested-PCR	PCR em Tempo Real
Negativo	56,41% (176/312)	55,13% (172/312)	55,76% (174/312)
<i>Plasmodium vivax</i>	19,23% (60/312)	21,47% (67/312)	20,51% (64/312)
<i>Plasmodium falciparum</i>	22,43% (70/312)	19,87% (62/312)	19,23% (60/312)
<i>Plasmodium malariae</i>	0,00% (00/312)	0,00% (00/312)	0,00% (00/312)
<i>Plasmodium ovale</i>	0,00% (00/312)	0,00% (00/312)	0,00% (00/312)
Mista (<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>)	1,92% (06/312)	3,53% (11/312)	4,48% (14/312)

Quanto à correlação de cada agente etiológico detectado pelos testes realizados, a tabela 5 demonstra a associação entre os achados obtidos pela Nested-PCR e PCR em Tempo Real, em que foram observados 7 resultados discordantes entre os ensaios. Dois resultados foram considerados negativos pela PCR em Tempo Real, enquanto eram positivos para *P. vivax* (densidade parasitária 10 a 120 parasitos/uL de sangue) pela Nested-PCR.

Tabela 5 - Correlação dos resultados obtidos pela Nested-PCR e PCR em Tempo Real

PCR em Tempo Real	Nested-PCR						TOTAL
	Negativo	PV	PF	PM	PO	Mista*	
Negativo	172	02	-	-	-	-	174
<i>P. vivax</i>	-	62	02	-	-	-	64
<i>P. falciparum</i>	-	-	60	-	-	-	60
<i>P. malariae</i>	-	-	-	-	-	-	00
<i>P. ovale</i>	-	-	-	-	-	-	00
Mista*	-	03	-	-	-	11	14
TOTAL	172	67	62	00	00	11	312

PF: *P. falciparum*, PV: *P. vivax*, PM: *P. malariae*, PO: *P. ovale*, Mista*: *P. falciparum* + *P. vivax*.

Já na tabela 6, estão correlacionados os resultados obtidos pela Microscopia em relação à Nested-PCR, observando-se 15 achados divergentes entre os ensaios. Ademais, não foram detectados quatro resultados de positividade pela Microscopia, quando comparados às duas técnicas moleculares, onde os valores de *Ct* (ciclo limiar) obtidos pela PCR em Tempo Real variaram de 29,33 a 37,49.

Tabela 6 – Correlação dos resultados obtidos pela Microscopia e Nested-PCR.

Microscopia	Nested-PCR						TOTAL
	Negativo	PV	PF	PM	PO	Mista*	
Negativo	172	04	-	-	-	-	176
<i>P. vivax</i>	-	57	-	-	-	03	60
<i>P. falciparum</i>	-	06	62	-	-	02	70
<i>P. malariae</i>	-	-	-	-	-	-	00
<i>P. ovale</i>	-	-	-	-	-	-	00
Mista*	-	-	-	-	-	06	06
TOTAL	172	67	62	00	00	11	312

PF: *P. falciparum*, PV: *P. vivax*, PM: *P. malariae*, PO: *P. ovale* e Mista*: *P. falciparum* + *P. vivax*.

O limite de detecção geral para Nested-PCR e PCR em Tempo Real foi de 5 parasitos/uL de sangue. Para este menor valor de parasitemia, a variação do *Ct* esteve entre 33,98 a 39,18 na PCR em Tempo Real.

Reação de PCR em Tempo Real duplex para identificação de infecções mistas

A PCR em Tempo Real alcançou maior detecção de infecções mistas (*P. falciparum*/*P. vivax*) quando comparada a técnica padrão-ouro, Nested-PCR (Tabela 5). Pois, enquanto PCR em Tempo Real detectou 14 infecções mistas, a Nested-PCR detectou três infecções mistas como sendo monoinfecção por *P. vivax*. Já a técnica de Microscopia demonstrou resultados muito discrepantes em relação à Nested-PCR (Tabela 6). Três resultados foram identificados como *P. vivax* e dois como *P. falciparum*. Nos casos de infecções mistas, a variação de parasitemia foi de 5 a 16.000 parasitos/uL de sangue para a espécie *P. vivax* e 10 a 11.500 parasitos/uL de sangue para o *P. falciparum*.

Sensibilidade, especificidade clínica e concordância da reação de PCR em Tempo Real duplex

Os parâmetros estatísticos obtidos pela PCR em Tempo Real e Microscopia em relação à Nested-PCR estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros estatísticos da PCR em Tempo Real e Microscopia em relação a Nested-PCR.

Parâmetros	Sensibilidade	Especificidade	V.P.P.	V.P.N.
Testes Laboratoriais				
PCR em Tempo Real	98,57%	100,00%	100,00%	98,85%
Microscopia	97,14%	100,00%	100,00%	97,72%

V.P.P. = Valor Preditivo Positivo; V.P.N. = Valor Preditivo Negativo.

A análise da PCR em Tempo Real em relação à Nested-PCR apresentou concordância excelente na detecção de amostras positivas (0,96 *kappa*, IC: 95%) e negativas (0,98 *kappa*, IC: 95%), com sensibilidade de 98,57% (IC 95% - 95.3-98.5) e especificidade de 100,00%. (IC 95% - 95.4-100). No caso de infecções mistas (*P. falciparum*/*P. vivax*), a PCR em Tempo Real identificou maior número (14/312) que a Nested-PCR (11/312), apresentando nível de correlação bom para identificação deste perfil de resposta entre as duas técnicas moleculares (0,87 *kappa*, IC:95%).

No entanto, foi observada correlação moderada entre a PCR em Tempo Real e Microscopia (0,58 IC: 99%) para identificação de infecções mistas. Contudo, a concordância entre as duas técnicas foi considerada excelente na detecção de amostras positivas (0,93 *kappa*, IC: 95%) e negativas (0,98 *kappa*, IC: 95%).

A sensibilidade e especificidade para cada uma das espécies de *Plasmodium*, de acordo com a técnica diagnóstica, estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros estatísticos da Microscopia e PCR em Tempo Real por espécie.

Espécie	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Testes Laboratoriais				
PCR em Tempo Teal				
Sensibilidade	96,77%	95,52%	Não se aplica	Não se aplica
Especificidade	100,00%	100,00%	Não se aplica	Não se aplica
Microscopia				
Sensibilidade	100,00%	89,55%	Não se aplica	Não se aplica
Especificidade	96,80%	100,00%	Não se aplica	Não se aplica

Foi alcançada melhor sensibilidade para identificação precisa de *P. vivax* utilizando a técnica de PCR em Tempo Real do que pela Microscopia, embora a especificidade observada para ambas técnicas tenha sido de 100%. Quando avaliamos a detecção de *P. falciparum*, a situação se inverteu, pois a Microscopia obteve maior sensibilidade na identificação dessa espécie em comparação com a PCR em Tempo Real. No entanto, a especificidade da Microscopia foi menor do que a PCR em Tempo Real nessa situação.

Discussão

A padronização do ensaio molecular de PCR em Tempo Real duplex descrita neste trabalho apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade excelentes, utilizando amostras clínicas de indivíduos provenientes de áreas endêmicas e não-endêmica para malária, além de painel de isolados de outros hemoparasitos. Quanto à identificação de espécies por essa abordagem molecular, *P. vivax* foi a que alcançou melhor poder estatístico quanto à sensibilidade de detecção precisa pela técnica molecular e foi também a mais prevalente (20,51%), seguida de *P. falciparum* (19,23%). Esse achado está de acordo com a distribuição esperada para as espécies do gênero *Plasmodium* na região Amazônica [19, 28].

Não foi observada nenhuma amostra positiva para *P. ovale* tampouco para *P. malariae* tanto pelas técnicas moleculares como pela microscopia. Todavia, no caso da espécie *P. malariae*, há indícios que a correta identificação desta espécie possa estar subnotificada em regiões amazônicas, onde o diagnóstico seja realizado somente pela microscopia [31]. Uma investigação realizada na bacia Amazônica mostrou prevalência de 1,2% de *P. malariae* identificados pela GE, enquanto a técnica de PCR detectou 11,90% casos para esta mesma espécie [31]. Outro estudo desenvolvido em Rondônia, demonstrou prevalência de 10,00% de infecções por *P. malariae* diagnosticados por Nested-PCR, que haviam sido negligenciadas pela microscopia [32].

Melhor desempenho foi encontrado para rastreio de infecções mistas pela PCR em Tempo Real do que pela Nested-PCR, mostrando que o protocolo molecular avaliado foi factível para detecção robusta de espécies co-existentes. Essa situação foi verificada pelo fato da Nested-PCR ter considerado três isolados como monoinfecção por *P. vivax*, enquanto eram infecções mistas por *P. vivax* e *P. falciparum* pela PCR em Tempo Real. Normalmente, a carga parasitária predominante de uma das espécies em co-infecção malárica favorece para que a segunda espécie seja erroneamente ignorada por diferentes metodologias de diagnóstico [10, 33]. Estudos apontam que em áreas endêmicas na Amazônia, a presença de infecções mistas associadas a *P. falciparum* é um cenário comumente identificado por técnicas moleculares, porém subnotificado pela microscopia [34, 35, 36]. Portanto, o rastreio de portadores de infecções mistas e assintomáticos é de extrema importância para o controle eficaz dos casos de malária em

determinada área, pois representam focos para a manutenção da transmissão [37, 38, 39].

Em contrapartida, outros trabalhos demonstraram menor desempenho na triagem de infecção malárica utilizando protocolo de Rougemont e colaboradores [40, 41]. Vale ressaltar que as condições técnicas e de infraestrutura recomendadas pelo protocolo foram seguidas. Entretanto, outros fatores influenciaram esta discrepância, como interpretação dos dados, inibição competitiva (no caso de infecções mistas) e variações nas sequências de *primers* utilizados.

No nosso trabalho, a microscopia não identificou quatro amostras positivas para *P. vivax*, podendo a baixa carga parasitária ser a causa provável para esse resultado falso-negativo. Barbosa e colaboradores [39] encontraram 54,00% de falhas no exame microscópico para identificação de *P. vivax* em comunidade de área rural da Amazônia, apontando ainda para o grande número de infecções subclínicas com baixas parasitemias nessa área. Em regiões endêmicas para malária, é comum a circulação de indivíduos com carga parasitária baixa, quer sejam assintomáticos ou sintomáticos, o que prejudica o diagnóstico acurado e preciso da doença onde infecções submicroscópicas são prevalentes [42, 43]. Com base nos dados reportados por nosso trabalho, não podemos estimar a existência de portadores ou indivíduos assintomáticos, pois o relato de febre aferida ou quadro febril nas últimas 24 horas foi critério para inclusão no estudo.

Dessa forma, embora a microscopia seja o diagnóstico de referência para identificação e quantificação de parasitemia recomendado pelo Ministério da Saúde no Brasil, a OMS (Organização Mundial de Saúde) e a OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde) preconizam o uso de abordagens moleculares em auxílio à microscopia, a fim de se conhecer melhor a importância de infecções submicroscópicas em regiões endêmicas [44].

A necessidade de se estabelecer uma segunda técnica diagnóstica é importante, principalmente para elucidação da espécie, seguida de intervenção terapêutica adequada e consequente interrupção da transmissão da infecção malárica, como meta para se alcançar o *status* de eliminação. Para interromper a transmissão, é necessário garantir a identificação precisa de todos os portadores de *Plasmodium spp.*, tanto sintomáticos e assintomáticos, utilizando ferramentas de diagnóstico altamente sensíveis e específicas, tempos de resposta diagnóstica rápidos, além da possibilidade de execução dos testes diagnósticos no próprio ambiente da área rural. Nesse sentido, embora a sensibilidade da microscopia possa ser aprimorada e garantida por meio do estabelecimento de sistemas de gestão da qualidade, métodos moleculares como a PCR em Tempo Real têm potencial para melhorar a detecção de portadores ou reservatórios de transmissão, devido aos elevados parâmetros de sensibilidade e especificidade alcançados pela técnica molecular, sobretudo nos casos de baixas parasitemias e infecções mistas [10, 45, 46].

Os dados desse estudo estiveram limitados a municípios do estado do Pará e, portanto, não podem ser representativos para a região Amazônica na sua totalidade. Contudo, estudos desenvolvidos em outras localidades ou estados da Amazônia, como o de Costa e colaboradores [35], também observou frequência de 5,30% de infecções mistas que foram subnotificadas pela GE em área da Amazônia Ocidental brasileira. Outro estudo realizado em comunidades ribeirinhas de Rondônia demonstrou que a Nested-PCR detectou seis vezes mais casos de infecções sintomáticas e assintomáticas do que a microscopia [36].

Por outro lado, a PCR em Tempo Real não detectou dois casos que eram positivos para *P. vivax* tanto pela microscopia como Nested-PCR. Apesar do limite de detecção de 5 parasitos/ μ L alcançado pela PCR em Tempo Real nesse estudo, as amostras em questão tinham parasitemias baixas de 10 e 120 parasitos/ μ L. Uma razão plausível para esse fato pode está fundamentada nas inconsistências observadas por ensaios de PCR em Tempo Real ao testar densidades parasitárias baixas, mesmo adotando o mesmo protocolo [47,48]. Amostras com parasitemias baixas podem, ocasionalmente, amplificar em apenas uma alíquota do ensaio em duplicata [49] ou mesmo não amplificar, como observado nessa situação, em que as amostras apresentaram valores de *Ct* maior que 40 e, portanto, negativos. Esses achados inconsistentes não são tão infrequentes, como demonstrado em outros trabalhos em que a reprodutibilidade dos ensaios de PCR em Tempo Real diante de baixas parasitemias alternou entre positivo e negativo em quase 40,00% de repetições realizadas [47, 48,50].

De acordo com nossos achados, a Nested-PCR foi mais eficiente que a PCR em Tempo Real para detecção de amostras com baixa parasitemia. Isso pode ser devido ao fato da PCR aninhada envolver duas etapas de amplificação de DNA, o que culminaria em ampliação da sensibilidade diante, sobretudo, de densidades parasitárias baixas. No entanto, devemos considerar o maior tempo de execução desse método, a maior possibilidade de contaminação e que a aplicabilidade dessa técnica em larga escala para rastreio de amostras é limitada, uma vez que é tecnicamente mais laboriosa que o protocolo de PCR em Tempo Real analisado [51,52].

No entanto, a PCR em Tempo Real possui reagentes e insumos que são caros para aplicação na rotina de laboratórios, e seu desenvolvimento exige uma infraestrutura necessária para ser aplicada a estudos de campo. Diante disso, novas metodologias estão sendo desenvolvidas, como o RealAmp, HtLamp e PET-PCR, que apesar de um menor custo para serem realizadas [53,54,55], possuem ainda algumas limitações, como o fato de ainda não detectarem todas as espécies de *Plasmodium*, necessitando de melhoramentos no desenho dos *primers* específicos ora desenhados [56].

Quando utilizados ensaios combinados em duplex ou multiplex PCR em Tempo Real, a formação de dímeros de *primers* e inibição competitiva é uma possibilidade [40, 46, 57], o que não ocorreu em nosso estudo. As modificações de sondas no terminal *quencher* contribuíram para que este problema fosse superado. Além disso, adotamos *primers* para identificação das quatro espécies de *Plasmodium*, incluindo *P. ovale*, que apesar de não ser uma espécie que seja transmitida no Brasil, é importante abranger em

triagens epidemiológicas e como resposta em situações de inquéritos de medicina do viajante. Outros fatores também devem ser considerados, como a intensa mobilidade humana entre países que adotam medidas distintas de controle [58, 59].

Ressalta-se que o protocolo de PCR em Tempo Real analisado também pode ser adaptado para implementação de sondas direcionadas ao *P. knowlesi* [60,61], a quinta espécie envolvida como causa de infecção malárica humana [62]. Embora a identificação de *P. knowlesi* em humanos esteja concentrada na Malásia Bornéu [63] e algumas áreas do Sudeste da Ásia [64], alguns países estão adotando triagem diagnóstica para esta espécie, principalmente no que diz respeito a viajantes regressos de locais de alto risco de transmissão para essa espécie [64, 65, 66].

O protocolo estabelecido nesse trabalho poderá ser uma excelente alternativa à microscopia para esclarecimento ou confirmação diagnóstica no contexto de um laboratório de referência, assim como também pode ser empregada nas redes descentralizadas de diagnóstico e triagem em bancos de sangue, fortalecendo a capacidade diagnóstica bem como o sistema de vigilância epidemiológica do Brasil e as ações de controle desse agravo, com vistas à eliminação.

Conclusão

O protocolo de PCR em Tempo Real estabelecido nesse trabalho permitiu a detecção espécie-específica de *Plasmodium spp.* em uma única etapa de PCR duplex. Esse procedimento molecular apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade excelentes para detecção de infecções por *Plasmodium spp.* em amostras clínicas, sendo uma ferramenta valiosa para o diagnóstico preciso de malária, em especial na detecção de infecções mistas. O estabelecimento de um protocolo molecular com elevada sensibilidade é importante como uma ferramenta auxiliar as técnicas convencionais, quer seja no contexto do serviço ou de pesquisas científicas.

Referências

1. Boonma P, Christensen PR, Suwanarusk R, Price RN, Russel B, Lek-Uthai U. Comparison of three molecular methods for the detection and speciation of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2007; 6:124.
2. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.*1993; 61: 315-320.
3. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RBJ, et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp.* *J Clin Microbiol.*2005; 43:2435–2440.
4. Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluetcha A, et al. Comparison of PCR and microscopy for detection of asymptomatic malaria in a *Plasmodium falciparum/ vivax* endemic area in Thailand. *Malar J.* 2006; 5:121.
5. Morassin B, Fabre F, Berry A, Magnaval JF. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2002; 66:503-508.
6. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Snounou, G. et al. Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:1624- 1627.
7. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol.*2004; 42:5636-5643.
8. Cnops L, Jacobs J, Esbroeck MV. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections. *Clin Microbiol Infect.*2010; 17(7):1101-1107.
9. Imwong I, Hanchana S, Malleret B, Renia L, Day NPJ, White NJ, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemia. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(9): 3303-3309.
10. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewaka-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed Real-Time PCR assay for discrimination of *Plasmodium* species with improved sensitivity for mixed infections. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(4):975–980.
11. Barber EB, William T, Grigg MJ, Yeo TW, Anstey NM. Limitations of microscopy to differentiate *Plasmodium* species in a region coendemic for *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J.*2013; 12:8.
12. Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCR em tempo real: Uma inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *R Biot Cienc Desenvol.* 2004; 33: 10-13.

13. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996; 6: 995-1001.
14. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005; 5:2.
15. Kim S, Nhem S, Dourg D, Ménard D. Malaria rapid diagnostic test as point-of-care test: Study protocol for evaluating the Vikia® malaria ag pf/pan. *Malar. J.* 2015; 14:114.
16. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria diagnosis: A brief review. *Korean J. Parasitol.* 2009; 47 (2): 93-102.
17. Lima GFMC, Levi JE, Geraldi MP, Sanchez MCA, Segurado AA, Hristov AD, et al. Malaria diagnosis from pooled blood samples: Comparative analysis of real-time PCR, nested PCR and immunoassay as a platform for the molecular and serological diagnosis of malaria on a large-scale. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106(6):691-700.
18. Kamau E, Tolbert LS, Kortepeter L, Pratt M, Nyakoe N, Muringo L. et al. Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of *plasmodium* by amplifying RNA and DNA of the 18s rRNA genes. *J Clin. Microbiol.* 2011; 49(8): 2946–2953.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação e Vigilância Epidemiológica da Malária. SIVEP/Malária. Disponível em <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp>. Acesso em 14/05/2016.
20. Marques AC. Migrations and dissemination of malaria in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1986; 81:39-41.
21. Fearnside PM. Social impacts of Brazil's Tucuruí Dam. *J Environ Manage.* 2002; 24(4): 483-495.
22. Barbieri AF. Uso do solo e prevalência de Malária em uma região da Amazônia brasileira. *Cadernos de Geografia.* 2005; 15:9-30.
23. Barata RCB. Malaria in Brazil: Trends in the last ten years. *Cad Saude Publica.* 1995; 11(1): 128-136.
24. Tauil PL. The prospect of eliminating Malaria transmission in some regions of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011; 106:105-106.
25. Mourão FR, Cunha AC, Silva RA, Souza EB. A vigilância da malária na Amazônia brasileira. *Biota Amazônia* 4. 2014; (2):161-168.
26. Duarte EC, Ramalho WM, Tauil PL, Fontes CJF, Pang L. The changing distribution of Malaria in the Brazilian Amazon, 2003-2004 and 2008-2009. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2014; 47(6):763-769.
27. Braz RM, Duarte EC, Tauil PL. Caracterização das Epidemias de Malária nos Municípios da Amazônia Brasileira em 2010. *Cad Saude Publica.* 2013; 29(5):935-944.

28. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informação e Vigilância Epidemiológica da Malária. Sivep/Malária. Disponível em <http://portalweb04.saude.gov.br/sivep_malaria/default.asp>. Acesso em 20/04/2015.
29. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: A common inherited defect of the Carcinogen-Metabolism gene glutathione s-transferase m1 (gstm1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1993; 85:1159-1164.
30. Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 5.0: Aplicação Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas.* 3 ed. Belém, Pará, 2007.
31. Scopel KK, Fontes, CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga M. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon Endemic Area (Apiacás – Mato Grosso State) as detected by Polymerase Chain Reaction. *Acta Trop.* 2004; 90: 61-64.
32. Cavasini MTV, Ribeiro WL, Kawamoto F, Ferreira MU. How Prevalent is *Plasmodium malariae* in Rondonia, Western Brazilian Amazon? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2000; 33 (5): 489-492.
33. Mekonnen SK, Aseffa A, Medhin G, Berhe N, Velavan TP. Re-evaluation of microscopy confirmed *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malária by nested PCR detection in southern ethiopia. *Malar. J.* 2014; 13:48.
34. Lorenzetti A, Fornazari PA, Bonini-Domingos AC, Penhalbel RSR, Fugikaha E, Bonini-Domingos CR, et al. Mixed *Plasmodium falciparum* infections and its clinical implications in four areas of the Brazilian Amazon Region. *Acta Trop.* 2008;107: 8-12.
35. Costa MRF, Vieira PPR, Ferreira CO, Lacerda MVG, Alecrim WD, Alecrim MGC. Molecular Diagnosing of Malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon Region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(4):381-385.
36. Alves FP, Durlacher RR, Menezes MJ, Krieger H, Silva LH, Camargo EP. High prevalence of asymptomatic *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in native Amazonian Populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66: 641–648.
37. Wu L, Van Den Hoogen LL, Slater H, Walker PGT, Ghani AC, Drakeley CJ, et al. Comparison of diagnostics for the detection of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections to inform control and elimination strategies. *Nature.* 2015;528:7580.
38. Coura JR, Suarez-Mutis M, Ladeia-Andrade S. A new challenge for Malaria control in Brazil: Asymptomatic *Plasmodium* infection a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101:229–237.
39. Barbosa S, Gozze AB, Lima NF, Batista CL, Bastos MS, Nicolete VC, et al. Epidemiology of disappearing *Plasmodium vivax* Malaria: A case study in rural Amazonia. *Plos Negl Trop Dis.* 2014; 8:8.

40. Bialasiewicz S, Whiley DM, Nissen MD, Sloots TP. Impact of competitive inhibition and sequence variation upon the sensitivity of Malaria PCR. *J Clin. Microbiol.* 2007; 45:1621-1623.
41. Alemayehu S, Feghali KC, Cowden J, Komisar J, Ockenhouse CF, Kamau E. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar. J.* 2013; 12:277.
42. Wang B, Han SS, Cho C, Han JH, Cheng Y, Lee SK, et al. Comparison of microscopy, nested-PCR, and real-time-PCR assays using high-throughput screening of pooled samples for diagnosis of Malaria in asymptomatic carriers from areas of Endemicity in Myanmar. *J Clin. Microbiol.* 2014; 52(6):1838-1845.
43. Baum E, Sattabongkot J, Sirichaisinthop J, Kiattibutr K, Davies DH, Ain A, et al. Submicroscopic and asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections are common in Western Thailand-molecular and serological evidence. *Malar. J.* 2015; 14:95.
44. WHO. Evidence review group on malaria diagnosis in low transmission setting. Meeting Report. Geneva: World Health Organization; 2014. p. 33.
45. Waltmann A, Darcy AW, Harris I, Koepfli C, Lodo J, Vahi V, et al. High Rates of Asymptomatics, Sub-microscopic *Plasmodium vivax* Infection and Disappearing *Plasmodium falciparum* Malaria in an Area of Low Transmission in Solomon Islands. *Plos Negl Trop Dis.* 2015; 9:5.
46. Lee PC, Chong ETJ, Anderios F, Lim YA, Chew CH, Chua KH. Molecular detection of human *Plasmodium* species in Sabah using Plasmonex™ multiplex PCR and hydrolysis probes real-time PCR. *Malar J.* 2015; 14:28.
47. Proux S, Suwanarusk R, Barends M, Zwang J, Price RN, Leimanis M. Considerations on the use of nucleic acid based amplification for malaria parasite detection. *Malar J.* 2011; 10: 323.
48. Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BA, Gomes LT, Fontes CJ. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014; 109: 21–28.
49. Lima GF, Lucchi NW, Silva-Flannery L, Macedo-de-Oliveira A, Hristov AD, Inoue J, et al. Still Searching for a Suitable Molecular Test to Detect Hidden *Plasmodium* Infection: A Proposal for Blood Donor Screening in Brazil. *PLoS One.* 2016; 11:3.
50. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis.* 2013; 208(4):645–652.
51. Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, Kain KC. Evaluation of the RealArt Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):636-638.

52. Ongagna-Yhombi SY, Corstjen P, Geval E, Abrams WR, Barber CA.; Malamud D, et al. Improved assay to detect *Plasmodium falciparum* using an uninterrupted, semi-nested PCR and quantitative lateral flow analysis. *Malar J.* 2013; 12:74.
53. Patel JC, Lucchi NW, Srivastava P, Lin JT, Sug-Aram R, Aruncharus S, et al. Field Evaluation of a Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay, Realamp, for the diagnosis of Malaria in Thailand and India. *J. Infect. Dis.* 2014; 210:1180-1187.
54. Britton S, Cheng Q, Grigg M, Poole CB, Pasay C, William T, et al. Sensitive Detection of *Plasmodium vivax* Using a High-throughput, Coulometric Loop Mediated Isothermal Amplification (HtLAMP) Platform: A Potential Novel Tool for Malaria Elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10:2.
55. Lucchi NW, Karell MA, Jornel I, Rogier E, Goldman I, Ljolje D, et al. Pet-PCR Method for the molecular detection of Malaria parasites in a national malaria surveillance study in Haiti, 2011. *Malar. J.* 2014; 13:462.
56. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-Mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:12.
57. Satterfield BC. Cooperative Primers. *J Mol Diagn.* 2014; 16 (2): 163-173.
58. Ferreira UM , Castro MC. Challenges for Malaria Elimination in Brazil. *Malar. J.* 2016; 15:284.
59. Wangdi K, Gatton ML, Kelly GC, Clements ACA. Cross-Border Malaria: A major obstacle for Malaria elimination. *Adv. Parasitol.* 2015; 89:79–107.
60. Divis PC, Shokoples SE, Singh B, Yanow SK: A Taqman real-time PCR assay for the detection and quantitation of *Plasmodium knowlesi*. *Malar. J.* 2010; 9:344.
61. Reller ME, Chen WH, Dalton J, Lichay MA, Dumler JS. Multiplex 5' nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of Malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of Malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. *J Clin. Microbiol.* 2013; 51(9): 2931-2938.
62. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26:165–184.
63. Oddoux O, Debourgogne A, Kantele A, Kocken CH, Jokiranta TS, Vedy S, et al. Identification of the five human *Plasmodium* species including *P. knowlesi* by real-time Polymerase Chain Reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30:597–601.
64. Bronner U, Divis PC, Farnert A, Singh B. Swedish traveler with *Plasmodium knowlesi* Malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malar. J.* 2009; 8:15.
65. Hoosen A, Shaw MT. *Plasmodium knowlesi* in a traveller returning to New Zealand. *Travel Med Infect Dis.* 2011; 9(3):144-148.

66. Biernat B, Lass A, Pietkiewicz H, Szostakowska B, Wroczyńska A, Kuna A, et al. Investigations on the occurrence of *Plasmodium knowlesi* in travellers returning from the endemic areas of simian malaria. Int Marit Health. 2015; 66(3):168-172.