

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Daniela Rocha Robortella

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE INFECÇÕES MALÁRICAS EM UMA
COMUNIDADE INDÍGENA YANOMAMI DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Belo Horizonte

2020

Daniela Rocha Robortella

**AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DE INFECÇÕES MALÁRICAS EM UMA
COMUNIDADE INDÍGENA YANOMAMI DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientação: Dr^a. Luzia Helena Carvalho

Belo Horizonte

2020

043 Robortella, Daniela Rocha.
Avaliação prospectiva de infecções maláricas em uma comunidade indígena Yanomami da Amazônia brasileira [manuscrito] / Daniela Rocha Robortella. - 2020.

138 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Dra. Luzia Helena Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Malária. 3. População Indígena. 4. Patologia Molecular. I. Carvalho, Luzia Helena. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89

**ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO****Daniela Rocha Robortella**

304/2020/02

entrada

1º/2016

2016702898

Às **nove horas** do dia **25 de maio** do ano de **2020**, reuniu-se, por videoconferência, sal <https://zoom.us/j/3828533989>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “**Avaliação prospectiva d infecções maláricas em uma comunidade indígena Yanomami da Amazônia Brasileira**, área d concentração: **Protozoologia**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Luzia Helena Carvalho**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao (a candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiv defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Luzia Helena Carvalho	IRR/FIOCRUZ/BH	APROVADA
Dra. Karin Kirchgatter	USP	APROVADA
Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz	IRR/FIOCRUZ/BH	APROVADA
Dra. Lilian Lacerda Bueno	UFMG	APROVADA
Dr. Pedro Augusto Carvalho Costa	UFMG	APROVADA

Expedição do resultado final.

CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Ajustar referencias bibliográficas e pequenas correções no texto

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mai havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos o membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2020.**Dra. Luzia Helena Carvalho****Dra. Karin Kirchgatter****Dr. Pedro Augusto Carvalho Costa****Dra. Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz**

 Rafaella Fortini Grenfell e Queiroz
 Pesquisadora em Saúde Pública
 CIADIC: 1107201
Dra. Lilian Lacerda Bueno

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária, do Instituto René Rachou da Fiocruz Minas, com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*Ao povo Yanomami, a quem dedico esta conquista e toda a
minha admiração.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, por me dar forças, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao povo Yanomami, por serem o maior incentivo ao desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade de compartilhar parte desta cultura maravilhosa.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia, pela minha formação e, em especial, à Coordenação do Programa e as funcionárias do Departamento de Parasitologia -- Sibele Abreu e Sumara Ferreira -- pela ajuda e disposição de sempre.

Às agências de fomento, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho. Em especial, ao CNPq pela concessão da minha bolsa de doutorado e às demais agências CAPES e FAPEMIG.

À Dra. Luzia, pela oportunidade e confiança. Muito obrigada por acreditar na minha capacidade e por me auxiliar em cada passo do meu amadurecimento profissional.

Aos colaboradores deste trabalho, em especial à Dra. Joseli de Oliveira-Ferreira, pela disponibilidade de sempre, além do cuidado na coleta e envio das amostras.

À Dra. Cristiana, Dra. Taís e Dra. Flora, pela disposição, sempre por perto para me auxiliar. Vocês foram fundamentais para esta conquista.

Aos demais professores do curso, pelos ensinamentos, os quais me motivaram a trilhar os caminhos da Parasitologia.

À plataforma de PCR em Tempo Real do IRR (Fernanda, Pedro, Sandra, Viviane e Taís) pelo fornecimento da infraestrutura necessária à realização dos meus experimentos e pelo cuidado de sempre.

À todos os integrantes do Laboratório de Malária que foram super importantes nesta jornada; em especial aos amigos queridos (Gabriela, Luiz, Danielle, Denise, Marina e Mika) que são muito mais que colegas de profissão. Muito obrigada pelo carinho e apoio diário.

À Lara por todo aprendizado e aos meus eternos ICs, Luiz e Raianna, pela colaboração nos experimentos.

Aos amigos mais que especiais (Daniel, Camilla, Barbara, Jéssica, Letícia e Michelle) pelos inúmeros momentos de distração, tornando minha caminhada mais agradável, compartilhando momentos de felicidades e aflições. Tenho certeza que independente da nossa trajetória a gente é para sempre. Muito obrigada por tudo.

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida; mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes, vocês estiveram presentes para me encorajar e orientar. À Tati, minha querida irmã, maior laço neste mundo, você é minha inspiração. Às

minhas avós (as mais lindas), obrigada pelo carinho e dedicação. Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu amor, Antônio. Obrigada por ser meu ponto de equilíbrio e estar sempre ao meu lado.

A Gertrudes, a mais fiel das companheiras. Obrigada por todas as madrugadas em claro ao meu lado.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que
ensina”.*
Cora Coralina

RESUMO

Nas Américas, o número de casos de malária voltou a aumentar após uma década de redução significativa na incidência da doença. Fatores políticos, socioeconômicos e ambientais associados à transmissão da malária têm contribuído para este aumento, particularmente, na região de fronteira entre o Brasil e a Venezuela. Neste cenário, faz-se necessário direcionar as medidas de controle para as populações vulneráveis que vivem em áreas de risco. As comunidades indígenas da Amazônia encontram-se constantemente expostas a diversas doenças infecciosas, incluindo a malária. Nestes grupos semi-isolados, os dados oficiais de malária são subestimados devido à baixa sensibilidade dos métodos diagnósticos de rotina e da dificuldade do acesso, como é o caso, por exemplo, de comunidades indígenas de etnia Yanomami. No presente estudo, avaliou-se prospectivamente as infecções maláricas – microscópicas e submicroscópicas -- em quatro aldeias ianomâmis da comunidade Marari, a qual se situa no extremo norte da Amazônia Brasileira, próximo à fronteira com a Venezuela. A população estudada contemplou 981 indivíduos, com mediana de idade de 14 anos (IQR 6-33 anos; idade mínima de 1 ano e máxima de 79). A abordagem metodológica envolveu três cortes transversais com intervalos de dois meses, sendo estes realizados durante a estação seca (setembro/novembro de 2014) e no início da estação chuvosa (janeiro de 2015). Para o diagnóstico molecular, diferentes protocolos de PCR em tempo real foram utilizados -- baseados em alvos ribossomais e não ribossomais dos plasmódios -- a fim de aumentar a sensibilidade na detecção de co-infecções e infecções submicroscópicas. Em conjunto, os resultados permitiram demonstrar que: (i) a frequência de infecções maláricas foi similar entre os sexos (masculino e feminino), provavelmente, refletindo os hábitos sociais e culturais das populações expostas; (ii) ao longo do estudo, 75% a 80% de todas as infecções maláricas foram submicroscópicas; conseqüentemente, (iii) as infecções com altas parasitemias (positividade pela microscopia) foram detectadas apenas em crianças e adolescentes (<16 anos), sendo os adultos caracterizados por infecções de baixa densidade parasitária, detectadas apenas por protocolos moleculares. Esse perfil de redução da parasitemia com aumento da idade sugere imunidade adquirida induzida por exposição contínua a transmissão; (iv) a prevalência de infecção malárica diferiu, significativamente, entre as aldeias estudadas (variando entre 1% e 19%), demonstrando uma heterogeneidade na transmissão local; (v) o *Plasmodium vivax* foi a espécie predominantemente encontrada no estudo, seguido por *P. malariae* e, em menor extensão, o *P. falciparum*; (vi) a circulação da espécie “*P. vivax like*” (*P. simium*) foi descartada na região; finalmente, (vii) a avaliação consecutiva de parasitos circulantes na população estudada (detecção de parasitos e/ou DNA) permitiu demonstrar que a infecção malárica persistiu apenas em 8% dos indivíduos previamente positivos para a malária, sendo a maioria crianças com mediana de idade de 3 anos. Em resumo, os resultados aqui apresentados comprovam que os métodos moleculares são mais apropriados para a identificação de infecções maláricas nas aldeias ianomâmis estudadas, que foram caracterizadas por transmissão heterogênea, predominância de infecções de baixa densidade parasitária, circulação de várias espécies de plasmódios e maior suscetibilidade em crianças (mediana de idade 3 anos). Estes resultados são importantes para o delineamento e implementação de medidas de vigilância e controle que visam a eliminação da malária nas populações ameríndias da Amazônia.

Palavras-chave: Malária submicroscópica; Yanomami; diagnóstico molecular.

ABSTRACT

A recent increase in malaria case incidence occurred in the Americas as a result of sociopolitical, ecological and economic factors, particularly, in the Brazilian-Venezuelan border. In this scenario, it seems critical to target vulnerable populations in risk areas. In Amazon region, indigenous forest-dwelling communities suffer from a high burden of infectious diseases, including malaria. In these areas, official malaria data are underestimated due to the low sensitivity of routine diagnostic methods and the difficulty of access semi-isolated groups, as is the case of Yanomami ethnic group. In the current study, we prospectively surveyed for microscopic and submicroscopic malaria infections in four Yanomami villages of the Marari community in the northern-most region of the Brazilian Amazon, close to the border with Venezuela. The studied population involved 981 individuals, with a median age of 14 years (IQR 6-33 years; range 1-79 years). The methodological approach involved three cross sectional surveys at two months intervals, which were carried out during dry season (September/November, 2014) and at the beginning of the rainy season (January, 2015). Different real-time PCR protocols -- ribosomal and non-ribosomal plasmodial targets -- were used to increase sensitivity in detection of submicroscopic and mixed malarial infection. Taken together, the results demonstrated that: (i) the frequency of malaria infection was similar between genders (male and female), probably reflecting social and cultural habits of exposed-populations; (ii) regardless the cross-sectional survey, roughly 75% to 80% of all malaria infections were submicroscopic; consequently, (iii) high densities parasite infections (microscopically-detectable) were detected only in children and adolescents (>16 years), with adults characterized by low densities infections detected by PCR-based protocols. This profile of age-associated malaria suggests acquired immunity induced by successive malaria infections; (iv) the prevalence of malaria infection differed significantly between villages (from 1% to 19%), demonstrating a marked heterogeneity at micro-scales; (v) *Plasmodium vivax* was the most commonly detected malaria parasite species, followed by *P. malariae* and much less frequently *P. falciparum*; (vi) the circulation of “*P. vivax* like” malaria (*P. simium*) in the studied area was discarded; finally, (vii) consecutive blood samples showed that malaria infection (detection of parasite and/or DNA plasmodial) persisted only in 8% of the previously malaria-positive individuals, with most of them young children (median age of 3 years). Overall, our results show that molecular tools are more sensitive for the identification of malaria infection among the Yanomami community studied, which was characterized by heterogeneous transmission, a predominance of low-density infections, circulation of multiple malaria parasite species and a higher susceptibility of young children. Our findings are important for the design and implementation of the new strategic interventions that will be required for the control and elimination of malaria in Amazon amerindians populations.

Keywords: Submicroscopic malaria; Yanomami; molecular diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em áreas de risco) por país, 2018.....	19
Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico do <i>P. vivax</i> no hospedeiro humano e no mosquito vetor.....	28
Figura 3. Mapa da fronteira Brasil (<i>Brazil</i>) - Venezuela representando a área do estudo.....	43
Figura 4. Casos de malária confirmados microscopicamente na comunidade indígena Yanomami (Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil).....	44
Figura 5. Residência Yanomami típica (<i>shabono</i>), da comunidade de Taibrapa-I, evidenciando a formação circular e a praça central.....	47
Figura 6. Visão interna do <i>shabono</i> da comunidade de Taibrapa-I, onde pode-se observar as estruturas em palha e madeira, assim como a ausência de repartições internas.....	48
Figura 7. Fluxograma referente ao desenho experimental do estudo.....	54
Figura 8. Chances de risco (<i>Odds Ratio, OR</i>) para a infecção malárica por aldeia ianomâmi na linha de base do estudo, setembro/2014.....	63
Figura 9. Infecção malárica detectada por diagnóstico parasitológico convencional (gota espessa) e diagnóstico molecular (protocolos de PCR), estratificada de acordo com a faixa etária (anos), na linha de base do estudo, setembro/2014.....	64
Figura 10. Prevalência de malária de acordo com o sexo (masculino e feminino) em função da faixa etária (anos), na linha de base do estudo, setembro/2014.....	64
Figura 11. Gráficos de radar ilustrando a prevalência de malária por aldeia durante o período de quatro meses de acompanhamento do estudo.....	67
Figura 12. Prevalência de infecção malárica submicroscópica e microscópica, de acordo com o corte transversal (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo).....	68
Figura 13. Prevalência de infecção malárica de acordo com as espécies de plasmódios (<i>P. vivax, P. falciparum, P. malariae</i> e infecções mistas), durante todo o período do estudo (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo)...	69
Figura 14. Positividade espécie-específica a malária, estratificada de acordo com a faixa etária (anos), durante todo o período do estudo (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo).....	70
Figura 15. Gel de agarose ilustrando as bandas correspondentes ao <i>P. vivax</i> (244pb) e <i>P. simium</i> (118/126pb), obtidas por Nested-PCR/RFLP após digestão com enzima de restrição <i>HpyCH4III</i>	71
Figura 16. Dados demograficos, epidemiológicos e parasitológicos de 143 indivíduos que apresentaram positividade para malária em algum momento do estudo.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos iniciadores para a amplificação do gene do sistema sanguíneo ABO em ensaio de PCR em tempo real (ABO-qPCR).....	52
Tabela 2. Resumo dos iniciadores para amplificação do gene <i>18S SSU rRNA</i> em ensaio de PCR em tempo real (R-qPCR).....	56
Tabela 3. Resumo dos iniciadores para a amplificação de alvos não ribossomais em ensaio de PCR em tempo real (NR-qPCR).....	57
Tabela 4. Resumo dos iniciadores para amplificação do gene <i>18S SSU rRNA</i> em ensaio de Nested-PCR.....	58
Tabela 5. Resumo dos iniciadores para amplificação do gene mitocondrial em ensaio de Nested-PCR/RFLP.....	59
Tabela 6. Dados demográficos da linha de base do estudo (setembro/2014), em função da aldeia estudada, Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil.....	61
Tabela 7. Prevalência de malária na linha de base do estudo (setembro/2014), em função da aldeia estudada, Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil.....	62
Tabela 8. Dados referentes a positividade espécie-específica das amostras coletadas na linha de base do estudo (setembro/2014), em função da aldeia estudada, Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil.....	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AI** – Aldeia Yanomami intitulada Alapusi
- C/Ah** – Aldeia Yanomami intitulada Castanha/Ahima
- CD** – *Cluster differentiation*
- CONEP** – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- Ct** – *Cycle threshold*
- DIP** – Doenças infecto-parasitárias
- DNA** – Acido Desoxirribonucleico
- dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
- DSEI** – Distrito Sanitário Especial Indígena
- DSEI-Y** – Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami
- FTA** – *Whatman® FTA® Card Technology (Sigma-Aldrich)*
- G** – Aldeia Yanomami intitulada Gasolina
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IOC** – Instituto Oswaldo Cruz
- IQR** – Intervalo interquartil
- IRR** – Instituto René Rachou
- MS** – Ministério da Saúde
- n** – Número de indivíduos
- NR** – Não ribossomal
- OMS** – Organização Mundial de Saúde
- OR** – *Odds Ratio*
- pb** – Pares de base
- PCR** – Reação em cadeia da polimerase
- Pf** – *Plasmodium falciparum*
- Pm** – *Plasmodium malariae*
- PNCM** – Programa Nacional de Controle da Malária
- Ps** – *Plasmodium simium*
- Pv** – *Plasmodium vivax*
- R** – Ribossomal
- RDT** – *Rapid Diagnostic Test*
- RFLP** - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
- RNA** – Ácido Ribonucleico

SasiSUS - Subsistema de Atenção à Saúde Indígena

SESAI – Secretaria Especial de Saúde Indígena

SIVEP – Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica do Ministério de Saúde

SNP – *Single nucleotide polymorphism*

SSU rRNA – Subunidade menor do RNA ribossomal

SUS – Sistema Único de Saúde

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

T (I-II) – Aldeia Yanomami intitulada Taibrapa (I ou II)

T_m – Temperatura de *melting* (dissociação)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Malária no mundo.....	18
1.2 Malária no Brasil.....	20
1.2.1 Desafios no controle e eliminação da malária no Brasil.....	23
1.3 Ciclo biológico dos plasmódios humanos.....	25
1.4 Diagnóstico laboratorial de malária.....	29
1.4.1 Diagnóstico parasitológico.....	29
1.4.2 Teste imunocromatográfico rápido.....	30
1.4.3 Diagnóstico molecular.....	32
1.5 Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y).....	35
1.5.1 Histórico da malária no Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y).....	37
2 JUSTIFICATIVA	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Área de estudo.....	42
4.2 População de estudo e cortes transversais	45
4.3 Coleta de sangue.....	48
4.4 Diagnóstico parasitológico de malária.....	49
4.5 Diagnóstico molecular de malária.....	49
4.5.1 Painel de controles.....	49
4.5.2 Extração de DNA a partir de sangue em <i>FTA</i>	50
4.5.3 PCR em tempo real para amplificação do sistema do grupo sanguíneo ABO (ABO-qPCR).....	51
4.5.4 Detecção das espécies de plasmódios por protocolos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase.....	52
4.5.4.1 PCR em tempo real para amplificação do gene <i>18S SSU rRNA</i> (R-qPCR).....	55
4.5.4.2 PCR em tempo real para amplificação de alvos não ribossomais do plasmódio (NR-qPCR).....	56
4.5.4.3 Nested-PCR para amplificação do gene <i>18S SSU rRNA</i>	57
4.5.4.4 Diagnóstico diferencial entre <i>P. vivax</i> e <i>P. simium</i> (Nested-PCR/RFLP).....	58
4.6 Análise dos dados.....	59
5 RESULTADOS	61
5.1 Infecções maláricas na linha de base do estudo.....	61
5.1.1 Características demográficas da população estudada.....	61
5.1.2 Infecções maláricas microscópicas e submicroscópicas.....	61
5.2 Dinâmica espacial e temporal da prevalência de malária na área de estudo.....	65
5.3 Investigação da circulação potencial de <i>P. simium</i>	70

5.4 Flutuação temporal da positividade nos indivíduos avaliados.....	72
6 DISCUSSÃO	75
6.1 Prevalência de malária nas aldeias ianomâmis.....	76
6.1.1 Fatores demográficos influenciando na positividade malárica.....	78
6.1.2 Espécies de plasmódios circulantes na área de estudo.....	79
6.1.3 Persistência da infecção malárica ao longo do estudo.....	82
6.2 Limitações do estudo.....	83
7 CONCLUSÃO	84
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	101
Anexo I.....	101
Anexo II.....	108
Anexo III.....	122
Anexo IV.....	124

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Plasmodium*, pertencentes ao filo Apicomplexa e transmitidos através da picada da fêmea de mosquitos anofelinos. Dentre as mais de cem espécies descritas, cinco estão mais frequentemente associadas a doença nos seres humanos, sendo *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Enquanto o *P. falciparum* e o *P. vivax* são as espécies mais relevantes do ponto de vista de saúde pública, o *P. malariae* é considerado amplamente subnotificado, particularmente, pela dificuldade de diferenciação com o *P. vivax* no diagnóstico de rotina (AUTINO *et al.*, 2012; LALREMRUATA *et al.*, 2015; MCKENZIE *et al.*, 2001; RECHT *et al.*, 2017). Por outro lado, o *P. ovale*, com distribuição restrita ao continente asiático e africano, tem sido pouco estudado apesar de evidências recentes sugerindo especiação simpátrica (*P. ovale wallikeri* e *P. ovale curtisi*) (GROGER *et al.*, 2017). De interesse, o *P. knowlesi*, apesar de ser parasito natural de primatas não humanos, tem causado infecções graves em humanos, principalmente no sudeste asiático (ONG *et al.*, 2009; WHITE, 2008).

No continente africano, responsável por 93% dos casos de malária no mundo, a doença é ocasionada, principalmente, pelo *P. falciparum*, cuja gravidade está associada a uma inflamação sistêmica e ao sequestro dos parasitos em capilares venosos, sendo o cérebro, os pulmões e os rins os principais órgãos acometidos (CARVALHO *et al.*, 2016; DASANNA *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2011; QUADT *et al.*, 2012). Já com relação ao *P. vivax*, espécie mais amplamente distribuída no mundo, as maiores taxas de prevalência se concentram fora do continente africano (GUERRA *et al.*, 2010). Apesar disto, evidências recentes sugerem que o *P. vivax* está presente em praticamente todos os países endêmicos da África, o que reforça uma mudança de paradigma em relação a distribuição mundial do *P. vivax*, bem como uma mudança na postura das políticas e práticas de controle (TWOHIG *et al.*, 2019). Embora a malária por *P. vivax* possua morbidade e letalidade menor que aquela associada ao *P. falciparum*, casos graves descritos por esta espécie têm sido relatados, recentemente, em diferentes partes do mundo (BAIRD, 2013; GENTON *et al.*, 2008), incluindo na Amazônia Brasileira (ALEXANDRE *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2010).

Com relação ao *P. malariae*, destaca-se o fato de que esta é a única espécie de plasmódio humano com ciclo intra-eritrocítico de 72 horas e a capacidade de induzir infecções de longa duração – geralmente assintomáticas – com níveis muito baixos de parasitos circulantes (BROUWER *et al.*, 2013; COLLINS & JEFFERY, 2007; RECHT *et al.*, 2017; SCURACCHIO *et al.*, 2011). A título de exemplo, Vinetz e colaboradores descreveram, em 1998, um relato de caso de uma infecção malárica assintomática por *P. malariae* mantida por mais de 40 anos e reativada décadas após a infecção inicial (VINETZ *et al.*, 1998). Até o momento, não é conhecido por que o *P. malariae* pode causar longos períodos de latência (GRANDE *et al.*, 2019); no entanto, as peculiaridades biológicas desta espécie representam um desafio para as medidas de controle. Além disso, o *P. malariae* apresenta um contexto epidemiológico complexo. Isto porque a espécie *P. brasilianum* – parasito de primatas não humanos, semelhante ao *P. malariae*, tanto em nível morfológico e imunológico, quanto genético – favorece a transmissão e a manutenção da malária em ambientes onde o habitat dos humanos e de primatas não humanos se sobrepõe (GRANDE *et al.*, 2019; RAYNER, 2015; TAZI & AYALA, 2011).

1.1 Malária no mundo

Considerada uma das principais doenças parasitárias de importância médica, a malária humana tem distribuição mundial (Figura 1), sendo mais prevalente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde as condições ambientais, socioeconômicas e políticas influenciam na transmissão.

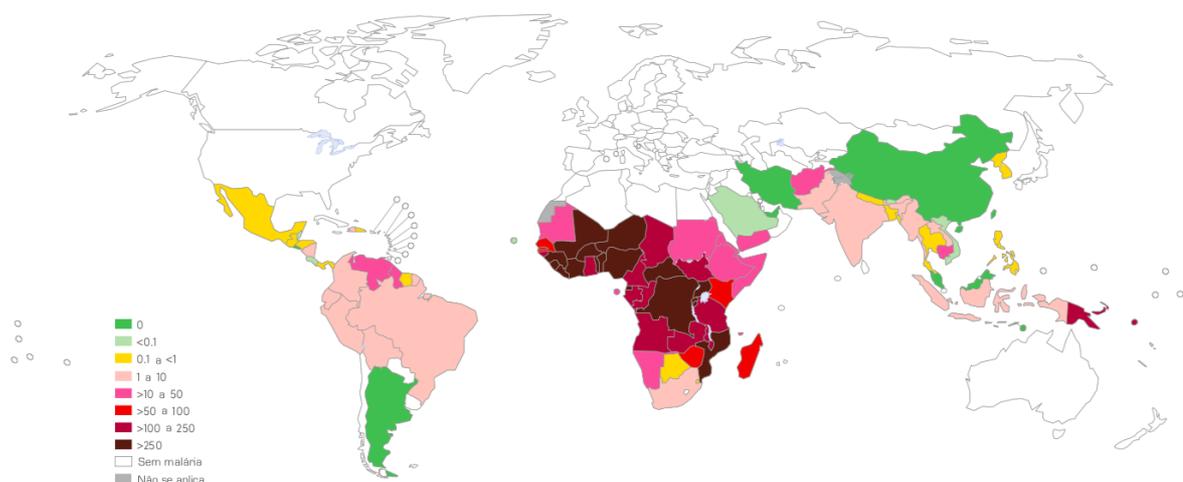


Figura 1. Mapa da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em áreas de risco) por país, 2018. Fonte: Adaptado de WHO, 2019.

Dados recentes referentes a distribuição global da malária indicam que foram registrados, aproximadamente, 228 milhões de casos no ano de 2018. Neste mesmo ano, 405 mil pessoas morreram em decorrência da doença (WHO, 2019). Estes números, embora ainda elevados, refletem uma redução significativa da incidência da doença na última década; por exemplo, de 2010 a 2014 o número global de casos da doença caiu em 13.5% e o de mortes em 21% (WHO, 2019). Esta redução foi consequência das medidas de controle adotadas nos últimos anos, que se basearam no diagnóstico e no tratamento oportuno dos pacientes (WHO, 2019). Neste sentido, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas foi um dos principais responsáveis pela redução da mortalidade causada por *P. falciparum* no continente africano.

Apesar do progresso geral, desde 2014 o número de casos de malária voltou a subir em algumas regiões do mundo, particularmente, na região Mediterrânea oriental (Somália, Sudão e Iêmen) e na América Latina (WHO, 2019). Nas Américas, o Brasil, a Colômbia e a Venezuela (República Bolivariana) juntos foram responsáveis por 84% de todos os casos notificados na região. De interesse, em 2016 a maioria dos casos importados de malária no Brasil e na Colômbia se originaram na Venezuela (GRILLET *et al.*, 2019). De fato, a atual crise humanitária, política e econômica que assola a Venezuela tem impactado diretamente na saúde da população local. Como resultado, entre 2016 e 2017, o país foi responsável pelo

maior aumento do número de casos de malária já registrado em todo o mundo (PAGE *et al.*, 2019). Vale ressaltar que doenças como a malária e a difteria – que já foram consideradas controladas no país – estão aumentando de forma contínua, inclusive em áreas onde estas doenças já haviam sido eliminadas (FRASER, 2017).

Sabendo que cerca de 4 bilhões de pessoas ainda vivem em áreas de risco de malária no mundo, muitos são os desafios que englobam o controle e a eliminação da doença em âmbito mundial. Neste sentido, a Assembleia Mundial da Saúde (*World Health Assembly*), liderada pela OMS, adotou, em 2015, a Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030 (*Global Technical Strategy for Malaria*). Dentre os principais objetivos do programa até o ano de 2030, destacam-se: (i) redução de pelo menos 90% na taxa de mortalidade global e na incidência de casos de malária, em comparação aos dados de 2015; (ii) eliminação da doença em pelo menos 35 países com transmissão ativa de malária no ano da implementação da Estratégia; e (iii) prevenção do restabelecimento da malária em todos os países classificados como livres de transmissão (*malaria-free*) (WHO, 2015).

Neste contexto, dentre os principais obstáculos para a redução definitiva do número de casos e sucesso na implementação da Estratégia Técnica Global para a Malária, incluem-se: (i) recursos financeiros descontínuos para o controle; (ii) conflitos políticos em zonas endêmicas; (iii) padrões climáticos anômalos; (iv) elevada resistência dos plasmódios aos antimaláricos disponíveis; e (v) resistência dos vetores aos inseticidas (WHO, 2017a).

1.2 Malária no Brasil

Tratando-se do domínio nacional, três são as principais espécies circulantes -- *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* -- sendo o *P. vivax* responsável por mais de 80% do número de casos notificados (SVS/MS, 2019).

Segundo dados da OMS, no ano de 2018 foram notificados, aproximadamente, 194 mil casos de malária, o que correspondeu a um aumento de 50% em comparação ao ano de 2016 (WHO, 2019). Acredita-se que este cenário esteja associado a crise econômica desencadeada no país, a qual motivou cortes no

orçamento governamental em setores relacionados ao programa de controle e vigilância de doenças infecto-parasitárias (DIP). A título de exemplo, o financiamento público para as ações de controle da malária no Brasil apresentou uma redução de 40% no ano de 2016 quando comparado ao ano de 2014 (GIBNEY, 2015; WHO, 2017a). Mais recentemente, a tríplice epidemia de dengue, zika e chikungunya contribuiu para a perda de importância da malária na administração pública, em âmbito federal, acarretando na fusão do tradicional departamento de controle e prevenção de malária com outros departamentos de DIPs do Ministério da Saúde (BENELLI & MEHLHORN, 2016). Tais medidas têm impactado negativamente no programa de malária, tanto na redução de recursos humanos disponíveis, quanto na disponibilidade de medicamentos e mosquiteiros impregnados com inseticidas.

Em âmbito nacional, aproximadamente 99% dos casos de malária derivam da região da Amazônia Legal, área que corresponde a 59% do território brasileiro e engloba a totalidade de nove estados (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins) (SNOW *et al.*, 2005). A presença de locais apropriados para a criação dos mosquitos vetores (grandes reservatórios de água, limpa, sombreada e sem correnteza), bem como as baixas condições socioeconômicas da população local, contribuem para a transmissão e manutenção da doença (WHO, 2017a). Além disso, a ocupação intensa e desordenada da população nas periferias das grandes cidades, associada ao crescente desmatamento, tem favorecido a criação de criadouros do mosquito vetor (MARQUES, 1987).

Com relação a região Amazônica, Arruda e colaboradores, em 1989, demonstraram que em populações isoladas, como é o caso das comunidades indígenas, primatas não humanos mantidos como animais de estimação podem atuar como reservatórios naturais para infecções humanas decorrentes do *P. malariae*/*P. brasilianum* (DE ARRUDA *et al.*, 1989). Trabalhos atuais, corroborando com estes achados, enfatizam que os protozoários *P. malariae* e *P. brasilianum* podem ser variantes de uma mesma espécie submetidas a um processo de especiação em diferentes hospedeiros, uma vez que não possuem diferenças morfológicas ou genéticas descritas entre si (GUIMARÃES *et al.*, 2012; TAZI & AYALA, 2011). Neste contexto, Lalremruata e colaboradores (2015) sugerem que o *P. malariae* e o *P. brasilianum* não são espécies distintas, mas sim a mesma espécie

de plasmódio, capaz de circular livremente entre humanos e primatas não humanos, assumindo, assim, um caráter antroponóico (LALREMRUATA *et al.*, 2015). Este perfil de transmissão também é observado em regiões extra Amazônicas, particularmente em regiões de Mata Atlântica (DEANE *et al.*, 1970; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Historicamente, casos de transmissão autóctone de malária vêm sendo relatados na Mata Atlântica, os quais são transmitidos, principalmente, pelo *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, com um padrão de transmissão diferente das áreas endêmicas brasileiras (FEACHEM, 2009). Mais recentemente, surtos têm sido descritos, particularmente, nas regiões serranas do Rio de Janeiro (BRASIL *et al.*, 2017). Neste cenário, os vetores têm como habitat natural as plantas da família das bromélias, e, por esta razão, os indivíduos com estreito contato com as florestas tropicais são os mais sujeitos à transmissão. As infecções decorrentes desta exposição encontram-se, frequentemente, associadas ao *P. simium*, parasito comumente encontrado em macacos do Novo Mundo. Embora o *P. simium* seja geneticamente e morfológicamente similar ao *P. vivax*, estudos recentes identificaram dois polimorfismos de base única (*single nucleotide polymorphisms - SNP*) que permitem distinguir estas espécies através de recursos moleculares (BRASIL *et al.*, 2017; DE ALVARENGA *et al.*, 2018).

Na região extra Amazônica, no ano de 2018, cerca de 70% dos casos de malária registrados foram importados de estados da região Amazônica Brasileira, de países da América do Sul e do continente Africano e Asiático; sendo os demais casos oriundos de infecções autóctones (PINA-COSTA *et al.*, 2014; RECHT *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2016). A título de exemplo, segundo a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, em 2018, cerca de 80% dos casos de malária notificados no estado foram importados de estados brasileiros da Amazônia Legal, como Rondônia e Amazonas; sendo os demais casos notificados (20%) provenientes de países endêmicos, principalmente, do continente africano (SVS/MS, 2019). Neste sentido, apesar de serem áreas consideradas não endêmicas, a região extra Amazônica detém elevada importância epidemiológica, uma vez que possui potencial para transmissão autóctone da doença, em função: (i) da presença de mosquitos vetores; (ii) do constante fluxo migratório dentro do país; e (iii) do atraso no diagnóstico e tratamento específico (LORENZ *et al.*, 2015). Historicamente surtos

de transmissão autóctone têm sido descritos em vários estados brasileiros (LORENZ *et al.*, 2015), incluindo Minas Gerais (CERAVOLO *et al.*, 2009; CHAVES *et al.*, 1995; FONTES *et al.*, 1991; LIMONGI *et al.*, 2008), Espírito Santo (BUERY *et al.*, 2018; CERUTTI *et al.*, 2007), Piauí (DO NASCIMENTO *et al.*, 2016) e Santa Catarina (MACHADO *et al.*, 2003).

Tem sido demonstrado que apenas 19% dos casos notificados de malária na região extra Amazônica são diagnosticados e tratados precocemente, isto é, nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas (PINA-COSTA *et al.*, 2014). Por outro lado, os mesmos estudos demonstram que na região Amazônica, 60% dos casos são tratados de forma oportuna. Em conjunto estes dados explicam a alta letalidade entre os casos de malária diagnosticados fora da área endêmica (LORENZ *et al.*, 2015; PINA-COSTA *et al.*, 2014; SIQUEIRA *et al.*, 2016). De fato, em 2013, o coeficiente de letalidade na região extra Amazônica foi aproximadamente 60 vezes superior ao registrado na região Amazônica (PINA-COSTA *et al.*, 2014). Logo, a falta de conhecimento sobre a doença, associada a experiência limitada dos profissionais de saúde com a abordagem diagnóstica e terapêutica, tem impactado diretamente no agravamento das infecções maláricas em regiões não endêmicas do Brasil.

1.2.1 Desafios no controle e eliminação da malária no Brasil

Objetivando o manejo eficaz do número de casos de malária no Brasil, faz-se necessário direcionar e intensificar as medidas de controle, estratificando áreas de risco e populações vulneráveis, como, por exemplo, as comunidades indígenas da Amazônia Brasileira, onde a redução do número de casos foi pouco expressiva na última década (LEANDRO-REGUILLO *et al.*, 2015). A título de exemplo, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS/MS), a doença aumentou cerca de 3% em algumas populações vulneráveis da Amazônia Brasileira, como, por exemplo, em áreas de garimpo. Neste mesmo período (2017-2018) foi relatado um aumento de 30% em reservas indígenas. Neste sentido, o governo brasileiro instituiu em 2003, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM), responsável por traçar metas para a eliminação do número de casos (SVS/MS, 2003). Com este intuito foram estabelecidos grupos de estratégias e adequações, dada a heterogeneidade da

situação epidemiológica dos municípios brasileiros, a fim de direcionar e intensificar estratégias de acordo com cada cenário (SANTELLI *et al.*, 2016).

Dentre as diretrizes do PNCM, destacam-se a detecção oportuna dos casos e o diagnóstico assertivo, seguido de tratamento imediato e acompanhamento dos pacientes. Associadas a estas intervenções, o PNCM enfatiza a importância do controle vetorial para a redução da transmissão, e o incentivo a Educação em Saúde (SANTELLI *et al.*, 2016). Assim, é de suma importância detectar infecções submicroscópicas e assintomáticas – mediante diagnóstico precoce – uma vez que indivíduos pauciparasitados constituem reservatórios potenciais da doença, mesmo sem as manifestações clínicas, podendo, desta forma, infectar mosquitos vetores e disseminar a doença (TAUIL, 2011).

Diferenças na dinâmica e biologia do *P. vivax* – espécie predominante no Brasil – incluindo sua habilidade em causar recaídas pela ativação de formas latentes no fígado (hipnozoítos) (KROTOSKI, 1989), influenciam na epidemiologia e no controle da malária, contribuindo para a persistência dos focos de transmissão. Neste sentido, achados recentes sugerem que a maior parte das infecções causadas pelo *P. vivax* são resultantes de recaídas e não da infecção pelo mosquito vetor (BETUELA *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2016), podendo caracterizar de 30 a 80% dos episódios maláricos dependendo da abordagem do estudo (KATSURAGAWA *et al.*, 2010; ROSS *et al.*, 2016; WHITE *et al.*, 2018).

Além das recaídas, outros fatores podem contribuir para a maior plasticidade do *P. vivax*, incluindo: (i) grande potencial para a transmissão, com circulação precoce de gametócitos a partir da primeira geração de formas sanguíneas (HOWES *et al.*, 2016; JOSLING & LLINÁS, 2015); (ii) elevada frequência de infecções com baixas parasitemias, geralmente não detectadas pelo diagnóstico de rotina; contribui para isto a invasão exclusiva de reticulócitos -- correspondente a cerca de 1% do número total de eritrócitos do sangue -- (ADAMS & MUELLER, 2017; HOWES *et al.*, 2016; MAYOR & ALANO, 2015); (iii) imunidade adquirida precocemente, mesmo após poucas picadas infectantes (RECHT *et al.*, 2017), o que pode resultar em infecções assintomáticas. Em conjunto, todos estes fatores favorecem a manutenção da transmissão em diferentes situações epidemiológicas.

Com relação ao *P. malariae*, os dados oficiais sugerem que este agente etiológico seja pouco prevalente no Brasil (MCKENZIE *et al.*, 2001). Contudo, estudos com limites de detecção otimizados correlacionam a presença deste parasito em várias regiões endêmicas de malária no mundo, incluindo no território brasileiro (AUTINO *et al.*, 2012; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010; RECHT *et al.*, 2017). De relevância, estudos anteriores demonstraram que, em regiões de populações nativas da Amazônia, o *P. malariae* encontra-se presente em altas frequências (DE ARRUDA *et al.*, 1989; DE BARROS *et al.*, 2007; METZGER *et al.*, 2008). Portanto, novos estudos são necessários para determinar a real prevalência do *P. malariae* em tribos indígenas Amazônicas, bem como para conhecer o impacto desta infecção sobre a saúde destas populações.

1.3 Ciclo biológico dos plasmódios humanos

O ciclo biológico dos plasmódios humanos integra uma série de interações específicas entre os diferentes estágios evolutivos do parasito e suas respectivas células hospedeiras, responsáveis pelo sucesso da infecção e transmissão da doença, conforme demonstrado na Figura 2 (representativa do ciclo do *P. vivax*).

Os plasmódios possuem um ciclo heteroxênico, necessitando, obrigatoriamente, de um hospedeiro vertebrado (homem), no qual ocorre a fase assexuada, e outro invertebrado (mosquito), responsável pela fase sexuada da doença (MUELLER *et al.*, 2009).

A forma infectante ao hospedeiro vertebrado é o esporozoíto, inoculado através da proboscíde da fêmea do vetor anofelino, durante o repasto sanguíneo. Os esporozoítos não atingem a circulação sanguínea logo que são introduzidos pelo vetor, podendo permanecer por horas ou dias na derme e, inclusive, iniciar o seu desenvolvimento em regiões como as células da epiderme, derme ou associados aos folículos pilosos (AMINO *et al.*, 2006; MOTA & RODRIGUEZ, 2004; SINNIS & ZAVALA, 2012). Embora estas formas não possuam importância para a continuação do ciclo, estes parasitos podem iniciar a resposta imune, induzindo a destruição de grande parte dos parasitos (SINNIS & ZAVALA, 2012). Os esporozoítos que conseguem escapar da resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro,

atingem a circulação sanguínea e migram para o fígado, dando continuidade ao ciclo pré-eritrocítico.

A partir daí, algumas vias têm sido sugeridas para a invasão do parasito no parênquima hepático: (i) direta entre as células endoteliais dos capilares sinusóides; e (ii) por intermédio das células de Kupffer (AMINO *et al.*, 2006; YAMAUCHI *et al.*, 2007). Logo, os parasitos passam a migrar através de vários hepatócitos antes de se desenvolverem em um hepatócito específico (MOTA *et al.*, 2001). Acredita-se que esta migração transcelular seja fundamental para a ativação de componentes presentes nas organelas apicais, tornando-os aptos a se desenvolver dentro do vacúolo parasitóforo dos hepatócitos (MOTA & RODRIGUEZ, 2004).

Uma vez estabelecidos nos hepatócitos, os esporozoítos iniciam um processo de maturação e divisão celular, denominado esquizogonia tecidual (o qual varia de seis a 12 dias, dependendo da espécie de *Plasmodium*), sendo o desenvolvimento dos parasitos completamente dependente do vacúolo parasitóforo (STURM *et al.*, 2006; SVS/MS, 2009). Neste processo são formados os esquizontes hepáticos, repletos de merozoítos teciduais. Durante esta etapa, a infecção não possui cunho sintomático.

No caso do *P. vivax* e *P. ovale*, os esporozoítos podem se desenvolver em formas latentes no interior dos hepatócitos (hipnozoítos), os quais são responsáveis pelas recaídas da doença meses ou até anos após a infecção inicial, sendo o processo de reativação ainda desconhecido (KROTOSKI, 1989; KROTOSKI, 1985; SILVINO *et al.*, 2016).

Após a esquizogonia, os esquizontes maduros liberam os merozoítos teciduais, gradativamente, por intermédio do brotamento de vesículas, denominadas merossomas (STURM *et al.*, 2006). Os merozoítos, recém liberados, atingem a circulação sanguínea e invadem os eritrócitos, iniciando o segundo ciclo de reprodução assexuada (eritrocítico).

A invasão dos merozoítos aos eritrócitos ocorre mediante interações específicas entre a membrana do parasito e receptores específicos da superfície das células, variando de acordo com a espécie infectante (COWMAN *et al.*, 2017). Vale ressaltar que o ciclo eritrocítico é responsável pelos sintomas clínicos clássicos da doença, incluindo febre intermitente, calafrios, dores de cabeça, vômito, entre outros

(PHILLIPS *et al.*, 2017; WHITE *et al.*, 2014).

Dentro dos eritrócitos, os merozoítos se diferenciam em trofozoítos jovens, maduros e esquizontes, com consequente formação de novos merozoítos que invadirão outros eritrócitos após um período que varia de 48 a 72 horas, conforme a espécie de *Plasmodium*, reiniciando o ciclo sanguíneo (MIDEO *et al.*, 2013). Esta fase eritrocítica é correspondente ao período onde é possível realizar o diagnóstico parasitológico, uma vez que os parasitos e seus produtos podem ser detectados na corrente sanguínea (WHITE *et al.*, 2014).

Em geral, após sucessivas replicações assexuadas nos eritrócitos, alguns merozoítos se diferenciam em estágios sexuados infectantes para a fêmea do mosquito vetor (gametócitos masculinos e femininos). Estas formas são ingeridas pelo anofelino durante um novo repasto sanguíneo, iniciando o ciclo sexuado (esporogônico). O aparecimento dos gametócitos no sangue periférico acontece em tempos distintos, que variam de acordo com a espécie. No *P. falciparum*, os gametócitos aparecem cerca de oito a dez dias após o início do ciclo sanguíneo, enquanto no *P. vivax* esse aparecimento é precoce (em torno de três dias) (HOWES *et al.*, 2016; JOSLING & LLINÁS, 2015).

Recentemente, foi demonstrado que o sequestro dos parasitos da malária humana não é um fenômeno exclusivo do *P. falciparum*, podendo ocorrer também com o *P. vivax*, particularmente, no pulmão (ANSTEY *et al.*, 2007), baço e medula óssea (MALLERE *et al.*, 2015; MAYOR & ALANO, 2015). Sendo assim, as formas sanguíneas do *P. vivax* parecem invadir, preferencialmente, os reticulócitos imaturos (CD71⁺) que predominam na medula óssea e não na circulação periférica (MAYOR & ALANO, 2015). Estes achados sugerem que o *P. vivax* pode migrar do sangue para a medula óssea e vice-versa. Já com relação ao *P. falciparum*, espécie de plasmódio historicamente associada ao sequestro em capilares profundos (BELACHEW, 2018; NEVEU & LAVAZEC, 2019; WAHLGREN *et al.*, 2017), tanto os esquizontes quando os gametócitos imaturos podem ser encontrados na medula óssea -- onde finalizam o processo de maturação -- sendo apenas o estágio final do gametócito desta espécie, encontrado na circulação sanguínea periférica (MALLERE *et al.*, 2015; MAYOR & ALANO, 2015). Estas diferenças na biologia dos parasitos influenciam não só na patogenia, mas também, na capacidade de infectar com sucesso os mosquitos vetores.

Já o ciclo no mosquito vetor se inicia com a exflagelação do microgametócito, formando oito microgametas, e a diferenciação do gametócito feminino em macrogameta, os quais se fecundam e originam o zigoto (GUTTERY *et al.*, 2012; MEIS *et al.*, 1992). Posteriormente, o zigoto se torna alongado e móvel sendo denominado oocineto, o qual atravessa a membrana do intestino e se aloja entre o intestino médio e a lâmina basal do hospedeiro invertebrado, se tornando sésil (oocisto) (BATON & RANFORD-CARTWRIGHT, 2004; VLACHOU *et al.*, 2006; ZIELER & DVORAK, 2000). Em cada oocisto são ativadas as maquinarias de replicação do DNA e de síntese protéica, gerando milhares de novos esporozoítos. Finalmente, os esporozoítos são liberados na hemolinfa e migram pela cavidade torácica do mosquito, sendo, parte deles, estabelecidos no interior das glândulas salivares. Uma vez instalados, tornam-se aptos para inocular as formas infectantes no hospedeiro vertebrado em um próximo repasto sanguíneo.

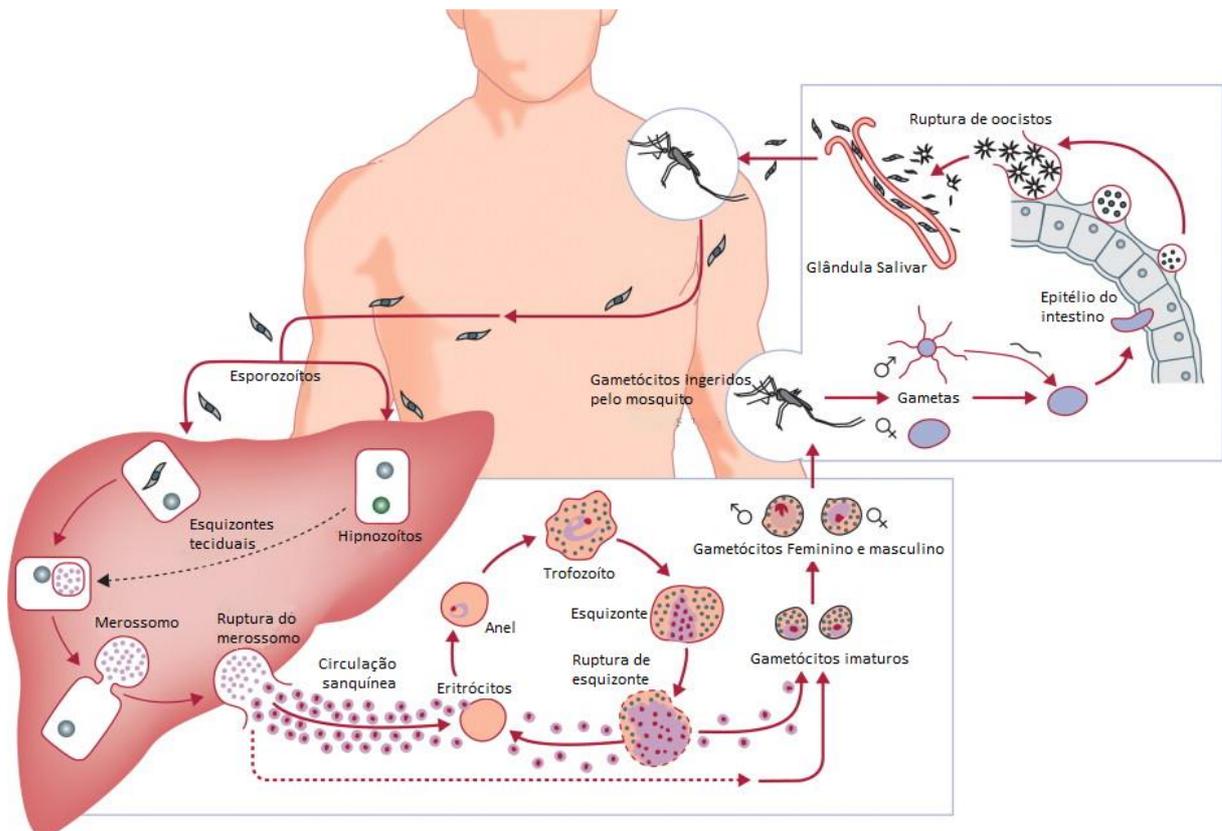


Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico do *P. vivax* no hospedeiro humano e no mosquito vetor. Fonte: Modificado de (MUELLER *et al.*, 2009).

1.4 Diagnóstico laboratorial de malária

O desenvolvimento de um método de diagnóstico para malária que seja eficiente, rápido e de fácil execução tem motivado pesquisas em todo o mundo; isto é relevante, já que o tratamento adequado da doença está diretamente relacionado à identificação precoce e correta da espécie de plasmódio. Desta forma, é ideal que o método de detecção atenda alguns parâmetros, como por exemplo: (i) elevada sensibilidade, especificidade e acurácia; (ii) relação custo benefício adequada; e (iii) fácil manuseio e execução em condições de campo. No caso da malária, os métodos atualmente disponíveis não atendem estas exigências, sendo necessário o desenvolvimento de novos métodos e abordagens diagnósticas. Isto é relevante uma vez que o diagnóstico oportuno é um dos pilares dos atuais programas de prevenção e controle da malária em âmbito mundial (WHO, 2019). Apesar desta relevância, o diagnóstico individual de rotina continua sendo realizado com técnicas pouco sensíveis (diagnóstico parasitológico), sendo os protocolos mais sensíveis utilizados, principalmente, para a prática de inquéritos epidemiológicos (CHIODINI, 2014; HÄNSCHEID, 1999).

1.4.1 Diagnóstico parasitológico

O diagnóstico de rotina para a malária humana é baseado na detecção direta do parasito no sangue, possibilitando, assim, a identificação das espécies e dos estágios biológicos dos plasmódios (ERDMAN & KAIN, 2008). Estabelecido como método de referência, a técnica parasitológica de rotina consiste na análise pela microscopia ótica de gotas espessas coradas com Giemsa (GONZALES, 2016). Em virtude do baixo custo associado ao ensaio, bem como da capacidade de semiquantificação da densidade parasitária e do monitoramento da resposta quimioterápica, este diagnóstico continua sendo o método de referência na maior parte dos países endêmicos para a doença. Contudo, apesar de ocupar posição de destaque dentre as outras metodologias, estudos têm demonstrado que o exame microscópico possui diversas limitações, incluindo sensibilidade reduzida em casos

de indivíduos com baixas parasitemias (AMARAL *et al.*, 2019; KAMAU *et al.*, 2011; TADESSE *et al.*, 2017). Além da exigência de material adequado para leitura e interpretação dos resultados, a técnica requer microscopistas experientes, microscópios ópticos apropriados e energia elétrica (BAILEY *et al.*, 2013).

Estudos prévios demonstram, ainda, que mesmo em diagnósticos realizados por microscopistas capacitados, há ocorrência de erros ou resultados inconclusivos, causados, principalmente, pela semelhança morfológica entre as espécies, baixo número de parasitos circulantes, ou ainda, infecções mistas, o que dificulta a precisão no diagnóstico (HÄNSCHEID, 2003; PROUX *et al.*, 2011).

Apesar das limitações do exame microscópico de rotina, algumas metodologias têm buscado aprimorar este protocolo, particularmente, visando facilitar a interpretação dos resultados. Neste campo de investigação destaca-se a importância da telemedicina, que busca compartilhar informações entre operadores localizados em regiões distintas, dispensando a atuação de um microscopista experiente no local do exame para interpretação dos resultados (MODY *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2019). Outra inovação nesta área é a possibilidade de usar a microscopia em locais “*point-of-care*”; neste caso específico, tem sido proposto a confecção de microscópios a partir de mídia 2D com abordagem baseada nos princípios do origami (CYBULSKI *et al.*, 2014; SHAILAJA *et al.*, 2019). Além de ser um instrumento leve e portátil, o fato de dispensar a utilização de eletricidade e/ou bateria, associado ao baixo custo, torna essa ferramenta ideal para o diagnóstico em áreas isoladas.

Considerando que as novas tecnologias não aumentam substancialmente a sensibilidade do ensaio parasitológico (em torno 20-50 parasitos por microlitro de sangue) (BAIRD *et al.*, 2016), tem-se incentivado a busca por novos métodos diagnósticos, a fim de aprimorar e otimizar o diagnóstico da malária em casos de baixas parasitemias (submicroscópicas).

1.4.2 Teste imunocromatográfico rápido

O desenvolvimento dos ensaios para a detecção de antígenos e/ou

anticorpos, “point-of-care” (*Rapid Diagnostic Tests – RDT’s*), têm revolucionado o diagnóstico de doenças parasitárias como é o caso da malária (CUNNINGHAM *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2015). Diversos *RDT’s* foram desenvolvidos para o diagnóstico da malária humana, sendo estes ensaios baseados na captura de antígenos circulantes das formas sanguíneas dos plasmódios (WHO, 2016a). A maioria das metodologias atualmente disponíveis realizam o ensaio diferencial e qualitativo entre HRP2 (proteína rica em histidina), específica do *P. falciparum* e pLDH (enzima lactato desidrogenase do *Plasmodium*). O princípio desta técnica é baseado em imunocromatografia em membrana de nitrocelulose e consiste na captura de antígenos circulantes do parasito por meio de anticorpos monoclonais, sendo a presença do antígeno indicada por uma alteração de coloração na fita (WHO, 2016a).

Esta técnica não requer treinamento especializado ou equipamento específico para a interpretação dos resultados, além de ser de fácil manuseio e transporte (ROSANAS-URGELL *et al.*, 2010). Logo, tem sido amplamente utilizada em regiões de difícil acesso, locais sem energia elétrica, diagnóstico diferencial em casos suspeitos e em pacientes hospitalizados, para confirmação diagnóstica, principalmente fora da área endêmica (ERDMAN & KAIN, 2008; MURRAY & BENNETT, 2009; WONGSRICHANALAI *et al.*, 2007).

Apesar de ser considerada uma técnica simples e acessível, a maior limitação dos testes rápidos tem sido a baixa sensibilidade – inferior a do diagnóstico parasitológico – pois permite detectar entre 100 a 200 parasitos por microlitro de sangue (BAIRD *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a eficiência e o desempenho do ensaio variam de acordo com o tipo de antígeno utilizado, o método de estocagem e a qualidade do kit (COSTA *et al.*, 2019; RANADIVE *et al.*, 2017). Neste sentido, publicações recentes indicam um número substancial de isolados de *P. falciparum*, na região Amazônica e em algumas localidades da África e Ásia, com deleções ou variações no gene *Pfhrp2*, comprometendo a expressão do antígeno da proteína HRP2 e ameaçando a viabilidade dos *RDT’s* que se baseiam na detecção deste gene do parasito (AGABA *et al.*, 2019; KOJOM & SINGH, 2020; MUSSA *et al.*, 2019).

1.4.3 Diagnóstico molecular

Considerando que indivíduos com parasitemias subpatentes podem atuar como reservatórios dos parasitos da malária, e, conseqüentemente, contribuir para a transmissão da doença (SLATER *et al.*, 2019), faz-se necessária a utilização de ferramentas diagnósticas mais sensíveis para a correta identificação destas infecções. Neste sentido, os protocolos que se baseiam na amplificação de ácidos nucleicos dos parasitos têm grande potencial na detecção de casos submicroscópicos (OKELL *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2019).

As técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) possuem como princípio básico a amplificação do material genético presente em uma amostra através de um processo cíclico orientado por enzimas específicas (polimerases) capazes de gerar milhares de cópias idênticas ao DNA molde (LORENZ, 2012). Atualmente, esta metodologia vem sendo utilizada como ferramenta auxiliar aos métodos diagnósticos de malária, bem como em estudos epidemiológicos e em triagens de bancos de sangue.

A maioria dos protocolos atualmente disponíveis são baseados na detecção de sequências gênero e espécie-específicas inseridas na região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal 18S dos plasmódios (*18S SSU rRNA*) (MANGOLD *et al.*, 2005; ROUGEMONT *et al.*, 2004; SNOUNOU *et al.*, 1993). Sabe-se que o gene *18S SSU rRNA* é um bom alvo para a diferenciação de plasmódios, pois apresenta regiões polimórficas flanqueadas por regiões conservadas, facilitando o desenho dos iniciadores (DAS *et al.*, 1995; LAL *et al.*, 1989; SNOUNOU *et al.*, 1993). Entretanto, o baixo número de sequências não idênticas deste gene no genoma dos plasmódios (quatro a oito cópias) acabam comprometendo a sensibilidade e a reprodutibilidade da técnica, conforme demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa em malária (AMARAL *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2014).

Atualmente, o aumento da disponibilidade de dados genômicos de vários isolados de campo tem favorecido a descoberta de novos alvos moleculares, tais como: (i) sequências mitocondriais, como, por exemplo, o *cox3* (LLOYD *et al.*, 2018); (ii) genes nucleares (*varATS* do *P. falciparum*) (HOFMANN *et al.*, 2015; LLOYD *et al.*, 2018); e (iii) regiões repetitivas associadas ao telômero (*TARE-2* do *P.*

falciparum) (HOFMANN *et al.*, 2015). Estes alvos, por serem repetitivos e conservados no genoma dos parasitos, conferem potencial para detectar infecções com baixas parasitemias.

Na busca de alvos alternativos para o diagnóstico molecular de malária, Demas e colaboradores (2011) descreveram alvos não ribossomais localizados em regiões subteloméricas no genoma de *P. vivax* e *P. falciparum* (Pvr47 e Pfr364, respectivamente), ainda sem funções conhecidas. A sequência Pfr364 está presente em 41 cópias no genoma do *P. falciparum*, cada uma delas localizada na região de repetição subtelomérica SB2. Já a sequência Pvr47, se encontra em 14 cópias no genoma de *P. vivax*, sendo dois membros dessa família localizados próximos as famílias de genes hipervariáveis (*vir*), enquanto um terceiro se encontra próximo à proteína transmembrana subtelomérica (Pvstp1). Resultados iniciais utilizando estes alvos em ensaios de PCR convencional comprovaram maior sensibilidade do Pvr47/Pfr364 quando comparado aos alvos ribossomais (DEMAS *et al.*, 2011).

Com a finalidade de aumentar a sensibilidade dos ensaios moleculares, algumas variações da PCR convencional foram descritas. Dentre essas, destacam-se: (i) Nested-PCR, protocolo molecular de referência para o diagnóstico de malária, que compreende dois passos de amplificação (gênero e espécie), aumentando assim, a sensibilidade na detecção do DNA plasmodial (LIU *et al.*, 1998; SNOUNOU *et al.*, 1993); (ii) PCR em tempo real (qPCR), considerada uma evolução dos ensaios de PCR convencionais; esta técnica permite detectar o DNA alvo na fase exponencial de amplificação, além de possibilitar a análise quantitativa de ácidos nucléicos, demonstrando, em geral, maior sensibilidade e especificidade, dispensando a manipulação pós amplificação -- fator este que reduz o risco de contaminação da técnica -- (AMARAL *et al.*, 2019; HOFMANN *et al.*, 2015; HOFMANN *et al.*, 2018; KUBISTA *et al.*, 2006; MANGOLD *et al.*, 2005; ROUGEMONT *et al.*, 2004); (iii) PCR digital (ddPCR), que consiste em uma técnica de amplificação fundamentada nos princípios de particionamento da amostra, em que a reação, contendo todos os componentes necessários para a PCR, é fracionada em milhares de nano gotas imersas em óleo (com cerca de 1 nanolitro). Esta metodologia permite a quantificação absoluta do ácido nucleico -- com altos níveis de sensibilidade -- sem a necessidade de curva padrão (KOEPLI *et al.*, 2016; POMARI *et al.*, 2019; SRISUTHAM *et al.*, 2017).

Visando viabilizar as técnicas moleculares para situações de campo, outros protocolos moleculares têm sido descritos. Neste sentido, a amplificação isotérmica conhecida como LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) parece ser promissora. Neste protocolo, busca-se a amplificação através da utilização de um conjunto de iniciadores e DNA polimerase com atividade de desacoplamento de fitas (WONG *et al.*, 2017). Embora o desenho dos iniciadores seja complexo, o protocolo de LAMP é de baixo custo e rápido, podendo o resultado ser avaliado visualmente por turbidez ou fluorescência, o que facilita sua aplicabilidade como “*point-of-care*” (HASHIMOTO *et al.*, 2018; PONCE *et al.*, 2017). Entretanto, apesar de suas vantagens, alguns protocolos recentemente descritos para o diagnóstico de malária têm apresentado resultados duvidosos, falso-positivos e baixa sensibilidade (WONG *et al.*, 2017). Outra perspectiva futura para o campo é utilizar a chamada “*plataforma lab-on-chip*”, que se fundamenta na utilização de chips descartáveis contendo todos os reagentes necessários para a amplificação do material genético. Vale ressaltar que este sistema é analisado em equipamentos de PCR em tempo real portáteis e independentes de eletricidade (MALPARTIDA-CARDENAS *et al.*, 2019; TAYLOR *et al.*, 2014); apesar da importância desta metodologia, a sua aplicabilidade ainda não é imediata.

Além das metodologias descritas anteriormente, outra aplicação importante dos protocolos moleculares é para estudos envolvendo especiação simpátrica, como é o caso do *P. ovale* na Ásia e África (JOSTE *et al.*, 2018; ZAW & LIN, 2017), e do *P. vivax/P. simium* no Brasil. Com este intuito, Alvarenga e colaboradores (2018) desenvolveram um ensaio capaz de distinguir amostras do *P. vivax* e do *P. simium*, utilizando a Nested-PCR seguida de digestão enzimática, dispensando a reação de sequenciamento de nucleotídeos. Essa metodologia baseia-se no fato de que todas as sequências do genoma mitocondrial disponíveis do *P. simium* diferem das sequências do *P. vivax* por apenas dois polimorfismos de base única (SNPs) (DE ALVARENGA *et al.*, 2018). Logo, este protocolo pode ser empregado como triagem de casos de malária em cenários nos quais hospedeiros (primatas humanos e não-humanos) compartilham o mesmo habitat, como é o caso da Mata Atlântica.

Embora a implementação dos métodos baseados em ferramentas moleculares para o diagnóstico de rotina da malária continue sendo um desafio -- em decorrência do alto custo da técnica, da necessidade de capacitação de

profissionais e de equipamentos específicos -- os protocolos baseados na PCR têm se mostrado importante ferramenta para a detecção de infecções submicroscópicas (HOFMANN *et al.*, 2015; OKELL *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2019). Logo, as técnicas moleculares desempenham um papel fundamental na avaliação da real prevalência de malária em regiões endêmicas, particularmente, em locais onde mais de uma espécie de plasmódio esteja circulando; já que as densidades parasitárias podem ser variáveis e depender da imunidade naturalmente adquirida, como é o caso das populações indígenas isoladas da Amazônia.

1.5 Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y)

Em 2010, o censo demográfico realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstrou que a população indígena brasileira correspondia a, aproximadamente, 820 mil pessoas. Estes grupos ameríndios concentram-se, preferencialmente, na Amazônia Legal e preservam ampla diversidade linguística e cultural. Embora estima-se que cerca de 38% da população considerada indígena viva em áreas urbanas, a grande maioria (62%) reside em áreas rurais, dentre as quais muitas são de difícil acesso na floresta Amazônica; dentre essas, 58% situam-se em terras indígenas demarcadas.

A partir de 1999, a população indígena brasileira foi organizada em unidades de responsabilidade sanitária federal (Lei Nº 9.836 de 24 de setembro de 1999) -- denominadas Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEI) -- ficando a execução da atenção a saúde indígena sob a responsabilidade da Secretaria Especial de Saúde Indígena (Sesai), comprometida a coordenar e executar a Política Nacional de Atenção à Saúde dos Povos Indígenas e todo o processo de gestão do Subsistema de Atenção à Saúde Indígena (SasiSUS) no Sistema Único de Saúde (SUS).

Cada DSEI é dividido estrategicamente de acordo com critérios territoriais e não, necessariamente, por estados, tendo como base a ocupação geográfica das comunidades indígenas; sendo o DSEI dos grupos indígenas ianomâmis (DSEI-Y) um dos 34 DSEI criados no Brasil (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2006).

O território Yanomami -- considerado a terra indígena com maior número de habitantes -- reflete uma população estimada de cerca de 25.000 indígenas, os quais estão estruturados em aproximadamente 300 aldeias, contemplando uma dimensão territorial de 192.000km² (em ambos os lados da fronteira Brasil-Venezuela), abrangendo o extremo norte de Roraima e Amazonas, próximo a divisa com a Venezuela (CARTER & MENDIS, 2002; SÁNCHEZ-RIBAS *et al.*, 2017). Estes indivíduos mantêm modos tradicionais de subsistência e integram uma sociedade formada, basicamente, por caçadores, coletores e agricultores, o que os torna altamente dependentes dos recursos naturais (SÁNCHEZ-RIBAS, 2015).

Os grupos indígenas ianomâmis são geralmente organizados em casas plurifamiliares, denominadas *shabonos* (LASERSON *et al.*, 1999; METZGER *et al.*, 2008; VERHAGEN *et al.*, 2013). Estes sistemas consistem em grandes estruturas circulares que convergem em praças centrais destinadas as atividades diárias. Estas construções são feitas, sobretudo, de madeira, barro, palha e folha de palmeira. Dentro dos *shabonos*, cada família organiza-se ao redor de uma fogueira (onde os alimentos são preparados e cozidos durante o dia), não havendo paredes ou estruturas internas que divergem uma família da outra (LASERSON *et al.*, 1999; METZGER *et al.*, 2008; VERHAGEN *et al.*, 2013; LEANDRO-REGUILLO *et al.*, 2015).

A mobilidade é uma característica muito relevante na cultura deste povo seminômade. Os deslocamentos durante longos períodos são praticados na busca de residências alternativas, ou, ainda, para visitar comunidades vizinhas. Esta rotatividade entre o *shabono* principal e a segunda residência garante o uso dos recursos naturais de maneira equilibrada, uma vez que uma área se recupera enquanto a outra é explorada (SÁNCHEZ-RIBAS, 2015). Vale ressaltar que o acesso é extremamente limitado nessas regiões, devido, principalmente, a remota localização territorial e a dependência sazonal do transporte fluvial, associado ao alto custo do transporte aéreo (SÁNCHEZ-RIBAS *et al.*, 2017). Neste sentido, a mobilidade dos povos ianomâmis, particularmente, entre habitantes da Amazônia Brasileira e Venezuelana pode levar a modificações do perfil genético dos parasitos circulantes (MARCANO *et al.*, 2004; MONDOLFI *et al.*, 2019; RECHT *et al.*, 2017). Este fator, associado à crescente invasão de terras indígenas pela prática ilegal de garimpo e extração de madeira, pode influenciar no perfil de transmissão da malária,

na aplicabilidade de intervenções de controle e na adesão ao tratamento (GRENFELL *et al.*, 2008; MATO, 1998; SHANKS, 2016).

De fato, condição determinante na instabilidade da saúde da população indígena tem sido a presença de garimpeiros e madeireiros em terras ianomâmis, atuando de forma alarmante e expansiva. Além da destruição do meio ambiente e dos conflitos armados, a invasão em terras indígenas tem levado a mudança culturais deletérias para as comunidades, as quais resultaram em níveis alarmantes de alcoolismo e suicídios (OLIVEIRA & LOTUFO NETO, 2003). As invasões têm propiciado, ainda, aumento no risco e exposição à doenças, como, a infecção por HIV (BONALUME, 1991), sífilis (RUSSELL *et al.*, 2019), tuberculose (PITHAN *et al.*, 1991) e exposição a níveis tóxicos de mercúrio nos rios e solos (VEGA *et al.*, 2018).

1.5.1 Histórico da malária no Distrito Sanitário Especial Indígena Yanomami (DSEI-Y)

Em meados de 1960, os ianomâmis residentes no Brasil viviam praticamente isolados. Por tal motivo, até a década de 1980, a malária causada por *P. vivax* e *P. falciparum* era restrita às áreas periféricas da reserva Yanomami e a transmissão ocorria em razão do contato pontual com grupos não indígenas, em fazendas ou sítios. Tendo em vista o caráter zoonótico da transmissão do *P. malariae/P. brasilianum* em reservas indígenas Amazônicas, acredita-se que seja histórica a transmissão autóctone deste parasito nestas áreas (DE ARRUDA, 1985; DE ARRUDA *et al.*, 1989).

A partir de 1987, houve uma invasão abrupta nas localidades indígenas por garimpeiros clandestinos em busca de ouro (PITHAN *et al.*, 1991), resultando na transmissão autóctone da malária causada por *P. vivax* e *P. falciparum* (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2006). A partir deste episódio e, em virtude da receptividade e vulnerabilidade da área à malária, a infecção mediante *P. vivax* e *P. falciparum*, se disseminou com rapidez, atingindo, inclusive, as aldeias mais isoladas e sem recursos. Neste sentido, durante a década de 1990, a transmissão de malária se manteve em altos níveis nas comunidades indígenas.

No entanto, entre os anos de 2000 e 2002, o DSEI-Y instituiu ações de controle, como, busca ativa, tratamento precoce e atividades de controle vetorial (borrifações e nebulizações espaciais de inseticidas), as quais reduziram, significativamente, a transmissão da malária entre os ianomâmis, especialmente no estado de Roraima (SÁNCHEZ-RIBAS, 2015). Após este período de êxito, houve um relativo abandono na vigilância e controle da malária na região. Esta ausência de ações do poder público, associada ao aumento das atividades garimpeiras, tem contribuído para um novo aumento na incidência da malária, principalmente, nas aldeias do estado do Amazonas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2006). De acordo com Mondolfi e colaboradores (2019), a crescente vulnerabilidade das comunidades indígenas, acrescido ao atual cenário político socioambiental, comprometem o futuro dos índios brasileiros, que, encontram-se em um processo de etnocídio progressivo (MONDOLFI *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA

A situação atual de saúde dos índios ianomâmis encontra-se comprometida, sendo frequentes as doenças infecciosas, não infecciosas e crônicas, o que tem resultado em elevadas taxas de mortalidade nas tribos (GRENFELL *et al.*, 2008). Associa-se a isto: (i) a localização territorial remota, o que dificulta a prestação e manutenção de cuidados de saúde e medidas preventivas; (ii) os aspectos socioculturais; e (iii) a escassez de estudos epidemiológicos relativos as doenças infecto-parasitárias, como é o caso da malária.

Neste contexto, as comunidades ameríndias representam um grande desafio para as estratégias de vigilância e controle de malária que visam a redução definitiva do número de casos da doença na região Amazônica (LEANDRO-REGUILLO *et al.*, 2015). Sendo assim, torna-se essencial conhecer o risco potencial de malária entre os povos ianomâmis. Estudos desta natureza podem permitir estratificar áreas e populações de risco em função dos níveis de transmissão, aspectos socioeconômicos, políticos e ambientais.

Recentemente foi demonstrado que as infecções submicroscópicas podem ser altamente prevalentes em áreas de baixa transmissão, fazendo-se necessário detectar potenciais reservatórios da doença (HOFMANN *et al.*, 2015; MCCREESH *et al.*, 2018; OKELL *et al.*, 2012; SLATER *et al.*, 2019). Neste cenário, faz-se necessário investigar e caracterizar a malária submicroscópica em populações indígenas Brasileiras, utilizando, para isto, métodos diagnósticos adequados (LASERSON *et al.*, 1999; MARCANO *et al.*, 2004). Para tal fim, os protocolos moleculares são consideravelmente mais sensíveis do que o diagnóstico parasitológico de rotina ou do que os ensaios imunocromatográficos rápidos (HOFMANN *et al.*, 2018; OKELL *et al.*, 2011).

Na Amazônia Brasileira, o *P. vivax* é a espécie predominante seguida do *P. falciparum*. Apesar disto, dentre as três espécies de plasmódios humanos circulantes no país, o *P. malariae* se encontra, frequentemente, subnotificado. No entanto, estima-se que este parasito possa ter ampla distribuição geográfica nas áreas indígenas, sendo a subnotificação associada a falhas no diagnóstico parasitológico de rotina, que não é capaz de diferenciar esta espécie do *P. vivax*

(CAMARGO-AYALA *et al.*, 2016; LADEIA-ANDRADE *et al.*, 2009; METZGER *et al.*, 2008; NIÑO *et al.*, 2016; RECHT *et al.*, 2017; ROVIRA-VALLBONA *et al.*, 2017). A infecção por *P. malariae* é particularmente relevante em populações isoladas -- como os ameríndios da Amazônia Brasileira -- onde o contato com primatas não-humanos favorece a manutenção do cenário zoonótico; isto porque o *P. malariae* é morfológica e geneticamente similar ao *P. brasilianum*, parasito de primatas não-humanos neotropicais (DE ARRUDA, 1985; DE ARRUDA *et al.*, 1989; LALREMRUATA *et al.*, 2015). Por outro lado, a infecção pelo *P. falciparum* em áreas indígenas é indicativa de invasão ilegal nas reservas, o que pode levar a surtos de malária com grande mortalidade nas aldeias (SHANKS, 2016). Baseado nestes achados, o presente estudo teve como objetivo avaliar, prospectivamente, a prevalência das infecções maláricas em aldeias indígenas ianomâmis. Ênfase foi dada as infecções submicroscópicas causadas por *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Para tal fim, a abordagem experimental envolveu protocolos moleculares baseados em diferentes alvos plasmodiais -- ribossomais e não ribossomais --, visando, com isto, aumentar a sensibilidade na detecção de infecções submicroscópicas e co-infecções. O delineamento do estudo de campo envolveu três cortes transversais, com intervalos de dois meses. Espera-se, assim, contribuir para fornecer dados sobre a real situação malárica nas populações indígenas ianomâmis, que tem sido sub-representada nas estatísticas oficiais de malária no Brasil. Os resultados aqui obtidos poderão, ainda, auxiliar no direcionamento e monitoração de medidas de controle de malária na região Amazônica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar prospectivamente as infecções maláricas em uma comunidade de etnia Yanomami da Amazônia Brasileira, com ênfase nas infecções submicroscópicas causadas pelos *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estimar a prevalência da infecção malárica, através de protocolos moleculares que utilizam alvos ribossomais e não ribossomais dos plasmódios, em indivíduos provenientes da comunidade ianomâmi do Pólo Base Marari, localizada ao norte do estado do Amazonas;

3.2.2 Identificar os fatores demográficos e epidemiológicos associados a infecção malárica nas aldeias ianomâmis;

3.2.3 Em casos de infecção por *P. vivax*, investigar a possível circulação do *P. simium* – parasito “*P. vivax-like*” associado a transmissão zoonótica de malária na região extra Amazônica --.

4 METODOLOGIA

4.1 Área de estudo

A assistência sanitária na terra indígena Yanomami é operacionalizada através de Unidades Básicas de Saúde, denominadas Pólos Base de Saúde, os quais abrangem um conjunto de aldeias. Cada Pólo Base é integrado por equipes responsáveis por prestar assistência e realizar a capacitação e a supervisão dos Agentes Indígenas de Saúde. Os Pólos Base são definidos a partir do agrupamento de aldeias próximas geograficamente e com laços de convivência sociocultural. Atualmente, 37 Pólos Base encontram-se estruturados em terras ianomâmis, contando com a atuação de uma Equipe Multidisciplinar de Saúde Indígena, composta por médico, enfermeiro, dentista, auxiliar de enfermagem e agentes comunitários (DGESI/SESAI, 2018).

Os dados epidemiológicos de malária são gerados na sede do DSEI-Y, em Boa Vista (Roraima), a partir de fichas de atividade dos microscopistas e relatórios de campo. Com base nestes dados ocorre o delineamento dos sistemas de informação em saúde e abastecimento do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica do Ministério de Saúde (SIVEP-Malária).

O presente estudo foi realizado em um Pólo Base Yanomami -- Marari -- localizado na parte mais ao norte do estado do Amazonas (730 km de Manaus), próximo a fronteira com a Venezuela (Figura 3). Esta comunidade está localizada na área de Floresta Tropical de planície Amazônica (139 metros acima do nível do mar), sendo drenada por rios de primeira a terceira ordem e cercada por altas montanhas (Figura 3).

O Pólo Base Marari presta assistência médica a seis aldeias: Taibrapa-I/II, Gasolina, Alapusi, Castanha e Ahima; sendo a comunidade de Ahima referente à Sede do Pólo Base Marari (Marari *Health Unit*) (Figura 3). Neste estudo, optamos por agrupar as comunidade de Castanha e Ahima (Castanha/Ahima), tendo em vista a proximidade geográfica e a crescente rotatividade entre as famílias das

respectivas aldeias. Devido aos hábitos seminômades dos ianomâmis, Taibrapa-I possui uma residência alternativa (Taibrapa-II).

Vale ressaltar que, como a maioria das comunidades ianomâmis, as aldeias deste Pólo Base estão localizadas em áreas remotas da floresta Amazônica, sendo o acesso realizado por pequenas aeronaves que partem da sede do DSEI-Y, em Boa Vista (LALREMRUATA *et al.*, 2015; VEGA *et al.*, 2018). Com relação à comunicação, esta é realizada, primordialmente, por intermédio da radiofonia.

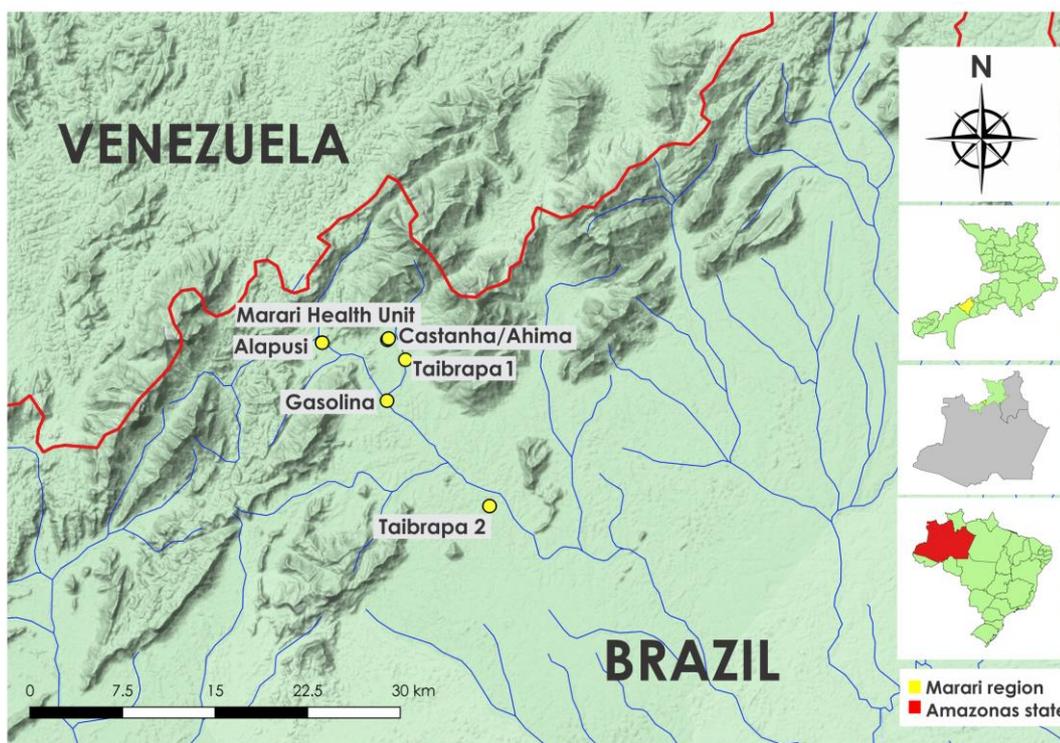


Figura 3. Mapa da fronteira Brasil (Brazil) - Venezuela representando a área do estudo. O Pólo Base Marari (*Marari region*), área amarela à direita, está localizado no norte da Amazônia Brasileira, estado do Amazonas (*Amazonas state*), vermelho à direita. As cinco aldeias -- Alapusi, Castanha/Ahima (Sede do Pólo Base, *Marari Health Unit*), Taibrapa (I e II) e Gasolina -- estão destacadas em pontos amarelos com os principais rios próximos às comunidades delimitados em azul. Fonte: Camada de relevo (Google Terrain), camada hidrográfica (Agência Nacional de Águas - ANA).

De acordo com os dados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica em malária no Brasil (SIVEP-Malária), no decorrer dos anos 2013 a 2016, foram notificados no Pólo Base Marari, 3826 casos de malária, sendo 3129 (82%) atribuídos ao *P. vivax* e 697 (18%) ao *P. falciparum* (Figura 4A). Mais

especificamente, com relação ao período do estudo, foram registrados em 2014, 1435 casos de malária, sendo 1120 (78%) em decorrência da infecção por *P. vivax* e 315 (22%) mediante infecção por *P. falciparum*. Já com relação ao ano de 2015, observou-se uma redução geral na incidência da doença, sendo 771 casos registrados dos quais 708 (92%) foram *P. vivax* e 63 (8%) *P. falciparum* positivos (Figura 4B).

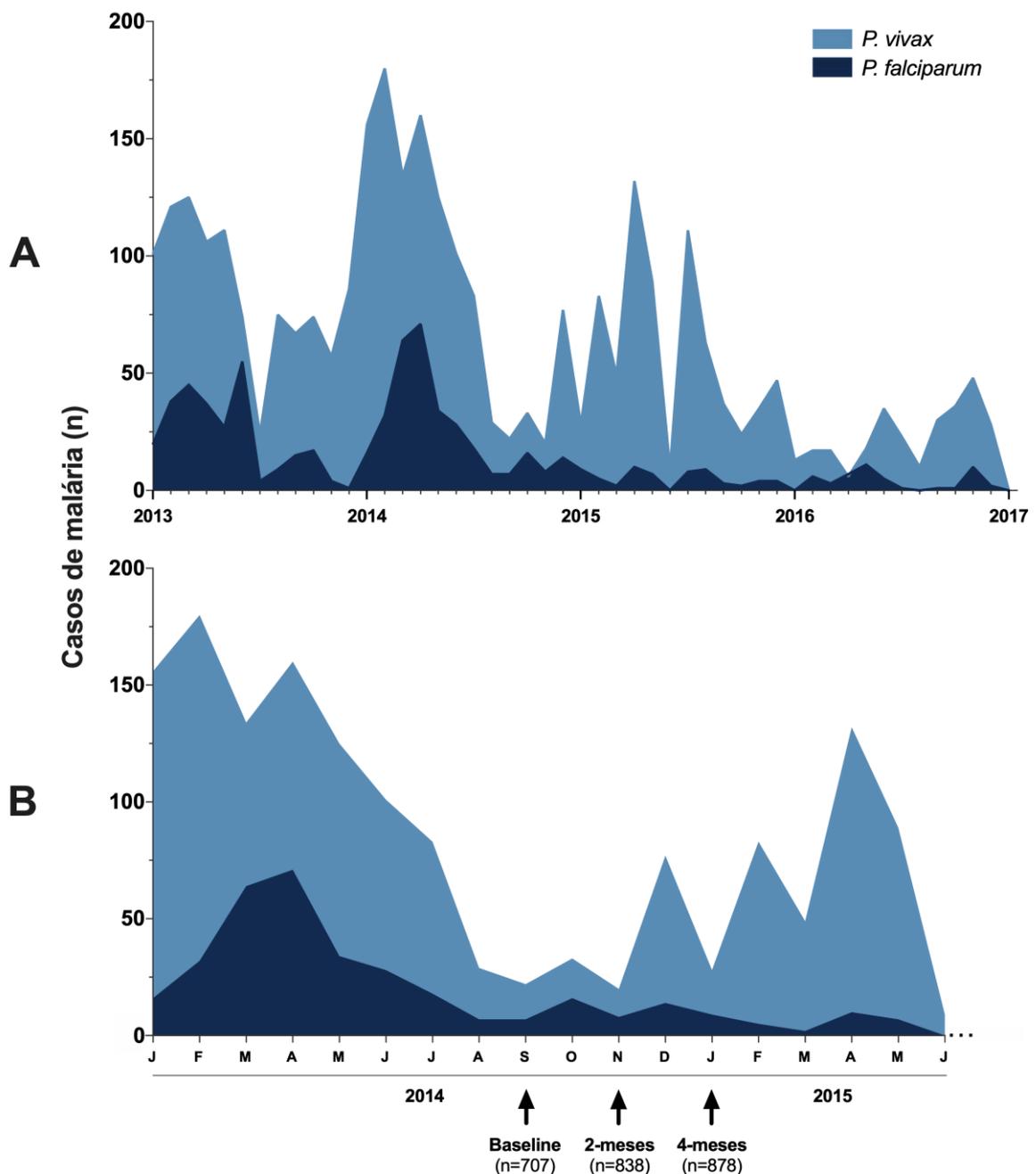


Figura 4. Casos de malária confirmados microscopicamente na comunidade indígena Yanomami (Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil). (A) Casos diagnosticados no período de 2013-

2016. (B) Casos diagnosticados durante o período do estudo, 2014-2015. O desenho do estudo incluiu três cortes transversais, sendo o primeiro realizado em setembro de 2014 (linha de base), o segundo em novembro de 2014 (2 meses depois) e o terceiro em janeiro de 2015 (4 meses após a linha de base). As infecções por *P. vivax* estão representadas em azul claro e, por *P. falciparum*, em azul escuro. Fonte: Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica (SIVEP-Malária), Ministério da Saúde.

Embora poucos estudos até o momento tenham relatado detalhadamente os padrões de transmissão da malária no Pólo Base Marari, trabalhos recentes, publicados por colaboradores do nosso estudo, demonstraram que dentre 2.014 vetores coletados (sendo eles primordialmente das espécies *Anopheles nuneztovari* s.l., *An. darlingi* e *An. oswaldoi* s.l.), apenas exemplares de *An. darlingi* encontravam-se infectados, com uma taxa de positividade que variou de 1,5-2% nas aldeias de Taibrapa-II (2%), Gasolina (1,52%) e Alapusi (1,63%) (SÁNCHEZ-RIBAS, 2015; SÁNCHEZ-RIBAS *et al.*, 2017). Vale ressaltar que todos os vetores contemplados no estudo foram coletados no ambiente peridomiciliar, no período de 18:00 as 3:00 e encontravam-se infectados com *P. vivax*.

4.2 População de estudo e cortes transversais

A população contemplada faz parte de um projeto de pesquisa em rede, coordenado pela Dr^a. Joseli de Oliveira-Ferreira do Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fiocruz Rio, que visa avaliar a prevalência de doenças parasitárias e virais entre povos ianomâmis, com ênfase em malária, oncocercose, tracoma, toxoplasmose, hepatite e enteroparasitoses. O projeto propõe identificar os agravos mais prevalentes para futuras intervenções, visando a melhoria na saúde da população local e a implantação de medidas de controle integradas.

O desenho experimental detalhado deste estudo foi previamente descrito na tese de doutorado do Dr. Jordi Sánchez Ribas (2015), colaborador deste projeto. Todos os aspectos éticos e metodológicos relacionados à pesquisa de populações vulneráveis foram aprovados pelos respectivos órgãos competentes, incluindo a

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, protocolo #16907) (Anexo I), que regulamenta estudos envolvendo populações indígenas brasileiras e o comitê de Ética do IRR (Protocolo CEP IRR N°358.698/2013). Vale ressaltar que toda a parte de campo, incluindo entrevistas e coleta de sangue em *FTA*, foi realizada pela equipe da Dr^a. Joseli de Oliveira-Ferreira (IOC/Fiocruz), com o auxílio de um intérprete bilíngue que explicou aos líderes e/ou representantes indígenas o objetivo do estudo e os procedimentos a serem realizados, sendo a participação voluntária. Além disso, foi solicitado consentimento por escrito para a impressão digital de cada participante adulto e/ou responsável (no caso de crianças e adolescentes menores de idade).

Em linhas gerais, o desenho experimental do estudo envolveu uma coorte aberta de base populacional prospectiva, tendo sido realizados três cortes transversais, em intervalos de dois meses. A primeira coleta foi realizada em setembro de 2014 (linha de base), a segunda em novembro de 2014 (2 meses depois) e a terceira em janeiro de 2015 (4 meses após o linha de base); sendo dois cortes transversais realizados na estação seca (setembro e novembro/2014) e o último, no início da estação chuvosa (janeiro/2015). Ao longo do período de estudo, aproximadamente, 30 casos confirmados microscopicamente para cada 1.000 habitantes foram registrados oficialmente na área (SIVEP-Malária); sendo 27 casos para cada 1.000 habitantes em setembro de 2014, 26 e 34 casos para novembro de 2014 e janeiro de 2015, respectivamente.

No momento da coleta, as informações de idade, sexo e localidade foram registradas para cada participante. No total, 981 ianomâmis semi-isolados foram incluídos no estudo, com 707 (72%) recrutados na linha de base, 838 (85,4%) durante a segunda coleta e 878 (89,5%) na terceira (Figura 4B). Durante o período de acompanhamento, o número mínimo e máximo de participantes por aldeia variou de 197 a 235 (Taibrapa I/II), 174 a 231 (Gasolina), 122 a 154 (Alapusi) e 214 a 282 (Castanha/Ahima). Um total de 859 (87,5%) indivíduos participaram de pelo menos dois cortes, sendo que 583 destes (59,4%) estavam presentes em todo o estudo.

Vale ressaltar que durante a coleta realizada na linha de base, os residentes de Taibrapa encontravam-se em Taibrapa-II. No entanto, nas coletas posteriores, realizadas 2 e 4 meses após a coleta inicial, estes indivíduos situavam-se em Taibrapa-I (Figura 5 e 6), aldeia geograficamente próxima da Sede do Pólo Base

(Figura 3).

No presente estudo, a infecção malárica foi definida como a ocorrência de qualquer infecção confirmada laboratorialmente (com ou sem sintomas), de acordo com o guia de terminologias e conceitos maláricos proposto pela OMS (WHO, 2016b); visto que a sintomatologia clínica dos indivíduos não foi avaliada. Neste sentido, infecções submicroscópicas implicam infecções maláricas de baixa densidade (abaixo do limite de detecção da microscopia), conforme estabelecido no relatório proposto pelo Grupo de Revisão de Evidência da OMS sobre infecções maláricas de baixa densidade (WHO, 2017b).



Figura 5. Residência Yanomami típica (*shabono*), da comunidade de Taibrapa-I, evidenciando a formação circular e a praça central. Fonte: SÁNCHEZ-RIBAS, 2015.



Figura 6. Visão interna do *shabono* da comunidade de Taibrapa-I, onde pode-se observar as estruturas em palha e madeira, assim como a ausência de repartições internas. Fonte: SÁNCHEZ-RIBAS, 2015.

4.3 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas através de punção digital, sendo o sangue acondicionado em *FTA Card Technology (Sigma-Aldrich)*. Após a coleta, o *FTA* seco foi armazenado em saco plástico, envolto em papel alumínio com sílica e enviado ao Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária do IRR/Fiocruz Minas, onde foi estocado (temperatura ambiente) até a extração (item 4.5.2, Extração de DNA a partir de sangue em *FTA*). O sangue coletado em *FTA* correspondeu ao excesso (20-30 microlitros), resultante da perfusão da polpa digital realizada para confecção de lâminas destinadas ao ensaio microscópico para o diagnóstico parasitológico de malária.

4.4 Diagnóstico parasitológico de malária

As amostras de sangue coletadas foram submetidas a diagnóstico microscópico utilizando a técnica de gota espessa corada com solução de Giemsa, conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (SVS/MS, 2009). As lâminas foram preparadas e examinadas nas unidades de saúde do Pólo Base Marari por microscopistas especializados, de acordo com as diretrizes instituídas pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS). Salienta-se que os pacientes positivos para a infecção malárica foram tratados imediatamente de acordo com protocolo já bem estabelecido pelo MS (Guia de Tratamento da Malária no Brasil) (SVS/MS, 2010).

4.5 Diagnóstico molecular de malária

4.5.1 Painel de controles

Todos os ensaios de PCR foram realizados na presença de controles positivos e negativos. Como controles negativos foram utilizadas amostras de indivíduos de área livre de transmissão, sabidamente negativos para malária. Além disto, em cada ensaio foi utilizado um controle negativo da reação, isto é, todos os reagentes na ausência de DNA, sendo este substituído por água para Biologia Molecular.

Como controles positivos foram utilizadas amostras do Biorrepositório do Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária do IRR/Fiocruz Minas: (i) DNA de *P. falciparum* proveniente de isolados de referência mantidos em cultivo contínuo estabelecido no Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia da Malária; (ii) DNA de indivíduos sabidamente infectados por *P. vivax*, precisamente da região de Porto Velho (RO), com parasitemias variadas, confirmadas pela microscopia ótica e por ensaios moleculares; (iii) DNA plasmidial de referência do MR4 (Banco Internacional de Reagentes de Referência de Malária-ATCC, USA), especificamente o plasmídeo MRA-179 – contendo o gene codificante da subunidade menor do RNA ribossomal 18S (*18S SSU rRNA*) do *P. malariae/P. brasilianum* --; (iv) amostras bem

caracterizadas de indivíduos infectados com *P. malariae*, gentilmente cedida pela Dr^a. Karin Kirchgatter (Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo).

4.5.2 Extração de DNA a partir de sangue em *FTA*

Para as amostras de sangue total seco estocado em *FTA*, o DNA genômico dos indivíduos foi extraído através de kit -- *QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Gentra Systems, Minneapolis, USA)* --, de acordo com instruções do fabricante. Ressalva-se que este procedimento já demonstrou grande eficiência na extração de DNA para este tipo de estocagem (AMARAL *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2014; LALREMRUATA *et al.*, 2015).

Os círculos de *FTA* contendo sangue (aproximadamente 30µL de sangue) foram cortados e colocados em microtubos (*ependorf*) de 1,5mL. Posteriormente, adicionou-se 180µL de tampão de lise celular ao tubo, sendo este incubado a 85°C durante 10 minutos. Em seguida, foram acrescentados 20µL de proteinase K (20mg/ml), sendo esta mistura homogeneizada por 30 segundos em agitador (vórtex) e, imediatamente, incubada a 56°C, durante o intervalo de uma hora. Logo após, foram adicionados 200µL de tampão de lise, sendo os tubos posteriormente homogeneizados por 30 segundos em agitador (vórtex) e prontamente incubados a 70°C, por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200µL de etanol P.A (Merck), sendo o produto homogeneizado. Todo o material (\pm 500µL de eluato) foi adicionado em coluna *QIAamp spin* (associadas ao tubo de coleta de 2mL). Os tubos foram então centrifugados a 800xg, no intervalo de 1 minuto, a 25°C. Em seguida, os recipientes contendo o filtrado foram descartados e as colunas foram colocadas em um novo tubo de 2mL. Posteriormente, foram adicionados 500µL de tampão para a lavagem do DNA e o material foi centrifugado a 800xg, no decorrer de 1 minuto, a 25°C. Assim, a coluna foi introduzida em um novo tubo de 2mL e o tubo contendo o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500µL de tampão para uma segunda lavagem do material, sendo os tubos centrifugados a 1500xg, durante 4 minutos, a 25°C. Cada coluna foi colocada em novos microtubos do tipo *ependorf* 1,5mL e os tubos contendo o filtrado foram descartados. Finalmente, foram acrescentados 150µL de água para fins de Biologia Molecular, a fim de eluir o

material. Em seguida o complexo foi incubado a temperatura ambiente, por 5 minutos e centrifugado a 800xg, durante 1 minuto, a 25°C. Ao final, as colunas foram descartadas e o DNA foi armazenado a -20°C até seu uso.

4.5.3 PCR em tempo real para amplificação do sistema do grupo sanguíneo ABO (ABO-qPCR)

Como forma de averiguar se as extrações de DNA foram realizadas com sucesso e se o material genético obtido foi de qualidade satisfatória para as técnicas moleculares, 10% das amostras de cada ensaio de extração foram submetidas a um ensaio de PCR em tempo real. Esta técnica possui como alvo o gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO. O protocolo inicialmente descrito por Olsson e colaboradores (1998) foi modificado, visando a adaptação para PCR em tempo real (OLSSON *et al.*, 1998). Neste contexto, alterou-se a concentração dos iniciadores, o volume final da reação, a temperatura de anelamento e a ciclagem, com a finalidade de otimizar a execução da técnica.

O ensaio incorpora iniciadores dirigidos contra sequências do éxon 7 do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO (Tabela 1). A reação dispõe das seguintes condições: 0,5µM de cada um dos iniciadores (IDT), 5µl de *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* e 1µl de DNA, resultando em um volume final de 10µl. As reações foram padronizadas de acordo com as seguintes condições de amplificação: 95°C iniciais durante 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, consistindo em 95°C por 30 segundos, 68°C em um intervalo de 30 segundos e 72°C durante um minuto final. A amplificação foi imediatamente seguida por um programa de dissociação consistindo em: 95°C durante 15 segundos, 60°C por 20 segundos e 95°C ao longo de 15 segundos. Posteriormente, as curvas de dissociação foram observadas através da avaliação da fluorescência por temperatura.

Tabela 1. Resumo dos iniciadores para a amplificação do gene do sistema sanguíneo ABO em ensaio de PCR em tempo real (ABO-qPCR).

Alvo	Iniciadores*	5'-3'	T _m °C**
ABO	516S (<i>forward</i>) 926AS (<i>reverse</i>)	GCTGGAGGTGCGCGCTAC TACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC	87.5 - 88.5°C

*Olsson *et al.*, 1998.

**Temperatura de melting.

4.5.4 Detecção das espécies de plasmódios por protocolos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase

A Figura 7 ilustra o fluxograma geral utilizado neste estudo para o processamento das amostras. Resumidamente, visando o controle de qualidade do DNA total extraído em *FTA*, 10% das amostras recém processadas foram amplificadas para um gene constitutivo do hospedeiro vertebrado (item 4.5.3). Neste sentido, todas as amostras avaliadas para esta técnica amplificaram o gene alvo (sistema sanguíneo ABO), assegurando a integridade do DNA extraído (dados não demonstrados).

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade da detecção para a infecção malárica, cada amostra foi submetida a pelo menos dois ensaios moleculares visando a amplificação de diferentes alvos plasmodiais -- ribossomais e não ribossomais --, sendo eles: (i) a região codificadora da subunidade menor do RNA ribossomal 18S dos plasmódios (*18S SSU rRNA*) (SNOUNOU *et al.*, 1993); e (ii) as sequências Pvr47 e Pfr364, localizados em regiões subteloméricas do genoma de *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente (DEMAS *et al.*, 2011). Vale ressaltar que o ensaio molecular baseado em alvos não ribossomais, padronizado e validado pelo nosso grupo de pesquisa em malária, -- com amostras de indivíduos de área endêmica com malária clínica e subclínica -- demonstrou ótimo desempenho para a detecção de infecções submicroscópicas e co-infecções por *P. vivax* e *P. falciparum* (Anexo II).

Em caso de discordância entre os protocolos de PCR, as amostras foram submetidas a um ensaio molecular adicional baseado na amplificação ribossomal (COSTA *et al.*, 2014; SNOUNOU *et al.*, 1993). Em relação a positividade por

espécie, se nenhum consenso foi obtido pelos protocolos moleculares previamente descritos, as amostras foram identificadas apenas em nível de gênero (*Plasmodium*). Vale ressaltar que a determinação das co-infecções foi realizada mediante a concordância de pelo menos dois ensaios moleculares.

As técnicas de PCR em tempo real contempladas nos itens 4.5.3 e 4.5.4.1 foram realizadas no equipamento *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Já o ensaio descrito no item 4.5.4.2 utilizou o termociclador *ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)*; ambas as reações foram feitas em placas de 96 poços vedadas com selos ópticos e realizadas na Plataforma de PCR em Tempo Real do IRR/Fiocruz Minas.

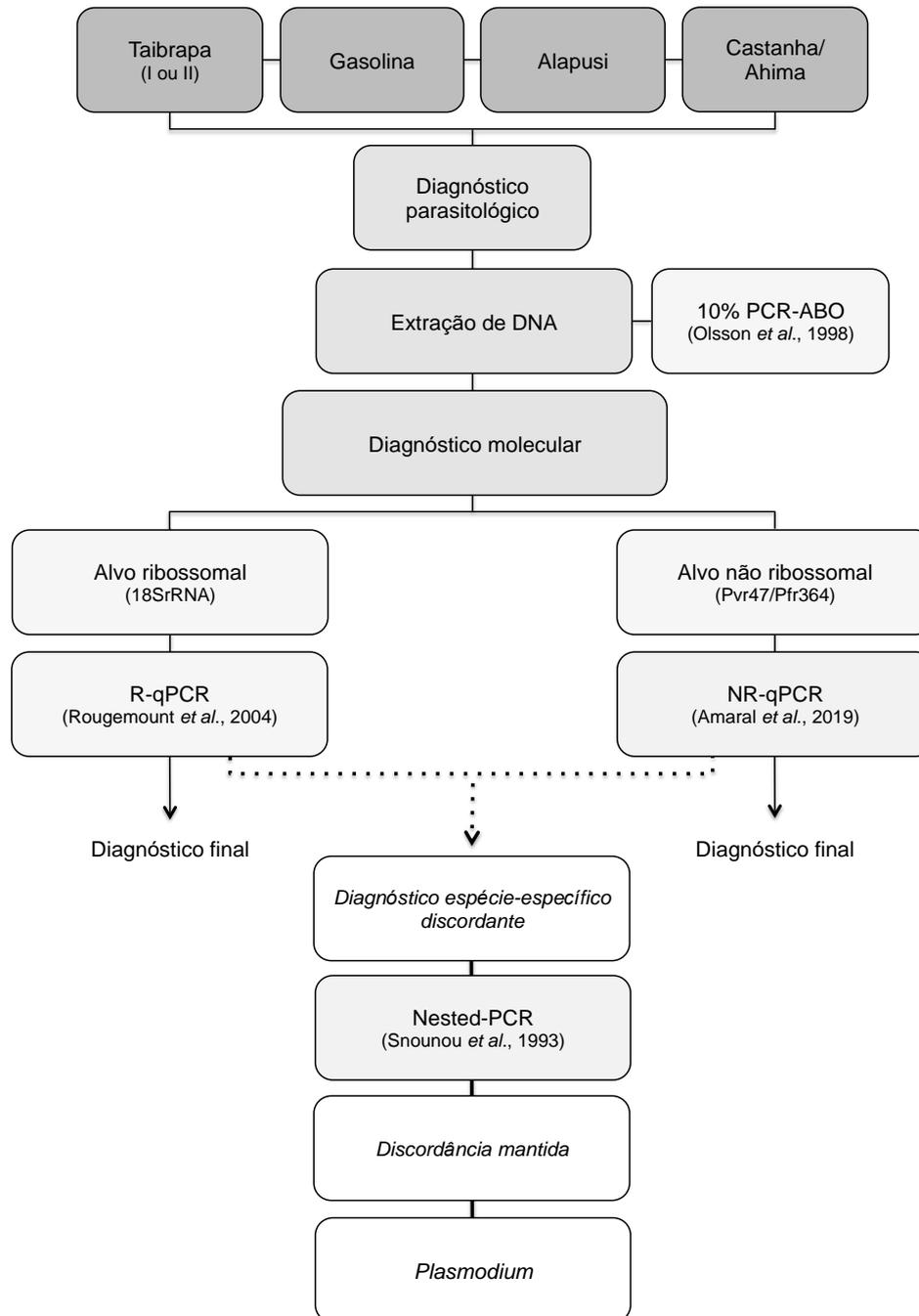


Figura 7. Fluxograma referente ao desenho experimental do estudo. As amostras coletadas nas cinco aldeias ianomâmis do Pólo Base Marari (Taibrapa I ou II), Gasolina, Alapusi e Castanha/Ahima foram submetidas a diagnóstico parasitológico realizado durante o trabalho de campo. Independente dos resultados obtidos por microscopia óptica, todas as amostras coletadas foram enviadas ao Laboratório BMIM (IRR/Fiocruz Minas) e submetidas a extração de DNA, sendo que, em uma amostragem de 10% de cada ensaio de extração foram realizados ensaios de PCR em tempo real visando a amplificação do gene constitutivo do grupo sanguíneo ABO (ABO-qPCR). O diagnóstico molecular foi realizado para alvos ribossomais (R-qPCR) e não ribossomais (NR-qPCR) dos plasmódios. Apenas as amostras com diagnóstico espécie-específico discordante foram submetidas a um ensaio molecular adicional baseado em alvos ribossomais do plasmódio (Nested-PCR); após três

protocolos de PCR, aquelas amostras que continuaram discordantes em relação ao diagnóstico de espécie foram identificadas apenas em nível de gênero (*Plasmodium*).

4.5.4.1 PCR em tempo real para amplificação do gene *18S SSU rRNA* (R-qPCR)

Uma vez realizada a extração do DNA genômico das amostras previamente coletadas e, comprovada a integridade mediante processamento molecular (item 4.5.3), todas as amostras foram submetidas a diagnóstico espécie-específico utilizando alvos ribossomais (*18S SSU rRNA*) dos plasmódios, conforme descrito por Rougemont e colaboradores (2004), com modificações (Figura 7).

Neste ensaio, as espécies de plasmódio presentes foram distinguidas via iniciadores senso (plasm1) e anti-senso (plasm2) conservados, associados a sondas espécie-específicas, sendo estas *vivprobe*, *falciprobe* e *malprobe*, capazes de detectar *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, respectivamente, conforme listado na Tabela 2.

Este protocolo foi padronizado a partir do original, descrito por Rougemont e colaboradores (2004), com otimizações visando a redução do volume final da reação e a utilização em *singleplex* – sendo o mix para cada espécie conduzido separadamente --. Resumidamente, o ensaio foi direcionado em um volume final de 12,5µL, distribuídos entre 2µL de DNA e 6,25µL de *TaqMan* Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), com as concentrações dos iniciadores (IDT) e sondas (*Applied Biosystems*) inicialmente estabelecidas por Rougemont e colaboradores (2004); sendo 200nM para o par de iniciadores e 80nM para as respectivas sondas. Para o ensaio molecular foi acertada a seguinte ciclagem: 50°C durante 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 95°C no intervalo de 15 segundos e 60°C por 1 minuto resultando em uma constante final de 45 ciclos. A amostra foi considerada positiva pela identificação do *cycle threshold* (*Ct*), sendo 40 ciclos o limiar estabelecido para a positividade da amostra.

Tabela 2. Resumo dos iniciadores para amplificação do gene 18S SSU rRNA em ensaio de PCR em tempo real (R-qPCR).

Alvo	Iniciadores/sondas*	5'-3'
<i>Plasmodium sp.</i>	Plasmo1 (<i>forward</i>) Plasmo2 (<i>reverse</i>)	GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA AACCCAAAGACTTTGATTCTCATAA
<i>P. vivax</i>	Viv-probe (sonda)	<u>vic</u> AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT <u>MGBNFQ</u>
<i>P. falciparum</i>	Falc-probe (sonda)	<u>FAM</u> AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT <u>MGBNFQ</u>
<i>P. malariae</i>	Mal-probe (sonda)	<u>FAM</u> CTATCTAAAAGAAACACTCAT <u>MGBNFQ</u>

*Rougemont *et al.*, 2004.

4.5.4.2 PCR em tempo real para amplificação de alvos não ribossomais do plasmódio (NR-qPCR)

Conforme esquematizado na Figura 7, todas as amostras coletadas foram submetidas a amplificação mediante alvos não ribossomais utilizando protocolo recém padronizado por nosso grupo de pesquisa em malária (Anexo II). Este ensaio se baseia em sequências descritas por Demas e colaboradores (2011) para a detecção dos alvos Pvr47 e Pfr364, presentes em *P. vivax* e *P. falciparum*, respectivamente. Ressalva-se que este protocolo propõe condições distintas para cada par de iniciador e sondas, sendo o resumo dos iniciadores demonstrados na Tabela 3.

A fim de assegurar a amplificação do *P. vivax* (Pvr47) foram utilizadas as seguintes concentrações: 50nM (*forward*), 900nM (*reverse*) (IDT) e 250nM (sonda) (*Applied Biosystems*). Já para a amplificação do *P. falciparum* (Pfr364) empregou-se: 900nM (*forward*), 300nM (*reverse*) (IDT) e 150nM (sonda) (*Applied Biosystems*) (Tabela 3). O ensaio foi conduzido em um volume final de 10µL, sendo 2µL de DNA e 5µL de *TaqMan* Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*). Com relação a ciclagem, os seguintes parâmetros foram estabelecidos: 50°C por 2 minutos, 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 52°C no intervalo de 1 minuto e 60°C no decorrer de 1 minuto final. A aquisição da fluorescência foi realizada no final de cada etapa de extensão, sendo os valores do Ct de 37 e 38 (Ct≤37 ou Ct≤38), utilizados para definir positividade para *P. vivax* e *P.*

falciparum, respectivamente.

Tabela 3. Resumo dos iniciadores para a amplificação de alvos não ribossomais em ensaio de PCR em tempo real (NR-qPCR).

Alvo	Iniciadores/sondas*	5'-3'
<i>P. vivax</i>	Pvr47 (<i>forward</i>)	TCCGCAGCTCACAAATGTTC
	Pvr47 (<i>reverse</i>)	ACATGGGGATTCTAAGCCAATTTA
	Pvr47 (<i>sonda</i>)	<u>HEX</u> TCCGCGAGGGCTGCAA
<i>P. falciparum</i>	Pfr364 (<i>forward</i>)	ACTCGCAATAACGCTGCAT
	Pfr364 (<i>reverse</i>)	TTCCCTGCCCAAAAACGG
	Pfr364 (<i>sonda</i>)	<u>FAM</u> GGTGCCGGG GGTTCCTACGC

*Anexo II.

4.5.4.3 Nested-PCR para amplificação do gene *18S SSU rRNA*

Amostras com resultados discordantes nos diagnósticos previamente descritos (item 4.5.4.1 e item 4.5.4.2) foram submetidas a Nested-PCR com o intuito de assegurar um resultado consenso. A técnica, descrita por Snounou e colaboradores (1993), dispõe de algumas modificações com o intuito de otimização do ensaio. Neste sentido, utilizou-se os iniciadores rPLU5 e rPLU6 para a reação gênero específica, sendo os pares de iniciadores rVIV1-rVIV2, rFAL1-rFAL2 e rMAL1-rMAL2 posteriormente utilizados para o reconhecimento espécie-específico de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*, respectivamente (Tabela 4).

As concentrações dos reagentes utilizados para as reações de amplificação foram 0,25µM de cada iniciador (IDT), 10µl de PCR Master Mix (Promega) e 0,8µl de amostra de DNA, totalizando 20µl de produto final. As amplificações foram realizadas em termociclador *PTC-100TM* versão 7.0, *MJ Research*. As condições do ensaio para a primeira reação consistiram em: 95°C por 5 minutos, 58°C por 2 minutos e 72°C durante 2 minutos; seguida por amplificação com 24 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 2 minutos e 72°C no decorrer de 2 minutos. Ainda uma etapa final consistiu em 58°C por 2 minutos e 72°C ao longo de 5 minutos. Para a segunda reação, as condições de amplificação foram mantidas, distinguindo apenas o número de ciclos, acrescido para um total de 29 ciclos.

Os fragmentos obtidos foram visualizados por intermédio de eletroforese em gel de agarose a 2% (*Agargen*), com adição de solução de brometo de etídio (*Invitrogen*). As amostras foram misturadas em tampão de amostra *Orange 5x* (Alaranjado VETEC e *Ficoll Sigma*) e a corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal (*Bio-Rad*).

Tabela 4. Resumo dos iniciadores para amplificação do gene 18S SSU rRNA em ensaio de Nested-PCR.

Alvo	Iniciador*	5'-3'	Amplicon
<i>Plasmodium sp.</i>	rPLU5 (<i>forward</i>)	CCTGTTGTTGCCTTAACTTC	1,2Kb
	rPLU6 (<i>reverse</i>)	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	
<i>P. vivax</i>	rVIV1 (<i>forward</i>)	CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC	120pb
	rVIV2 (<i>reverse</i>)	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	
<i>P. falciparum</i>	rFAL1 (<i>forward</i>)	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT	205pb
	rFAL2 (<i>reverse</i>)	ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	
<i>P. malariae</i>	rMAL1 (<i>forward</i>)	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC	144pb
	rMAL2 (<i>reverse</i>)	AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA	

*Snounou *et al.*, 1993.

4.5.4.4 Diagnóstico diferencial entre *P. vivax* e *P. simium* (Nested-PCR/RFLP)

A fim de diferenciar infecções decorrentes das espécies *P. vivax* e *P. simium* (malária de primatas não-humanos), todas as amostras previamente identificadas como decorrentes da infecção por *P. vivax* foram submetidas a Nested-PCR/RFLP, conforme protocolo recentemente descrito por Alvarenga e colaboradores (2018); sendo os iniciadores descritos na Tabela 5.

Resumidamente, a técnica de Nested-PCR/RFLP permite a amplificação gênica específica de uma região do genoma mitocondrial dos plasmódios (Cox1). A primeira reação consistiu em volume final de 20µL, contendo 0,5µM de cada iniciador (IDT), 1µL de DNA, 0,2µL de *Taq Polimerase* (*Invitrogen*), 0,2mM de cada deoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP's) e 1,5mM de MgCl₂. Os ensaios de PCR foram realizados em um termociclador (*Veriti 96 wells, Applied Biosystems*) com os seguintes parâmetros: 94°C por 2 minutos seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 54°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos, seguido por uma

incubação de 72°C por 2 minutos finais. Para a segunda reação, 1µL do produto primário foi utilizado como molde. Demais parâmetros foram mantidos, alterando-se apenas o alvo dos iniciadores. Posteriormente, os fragmentos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% (*Agargen*), com adição de brometo de etídio (*Invitrogen*) em um sistema horizontal (*Bio-Rad*).

Após a amplificação, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *HpyCH4III* (*New England Biolabs, Ipswich, MA, USA*) – capaz de reconhecer um *SNP* característico de *P. simium* –, gerando um perfil com dois fragmentos distintos (118pb e 126pb). Na ausência de digestão do produto, apenas um fragmento de 244pb foi visualizado – sendo este perfil característico de *P. vivax* –. A digestão previamente descrita foi realizada em 10µL, contendo 0,25µL da enzima (5U/µL), 1µL do tampão da enzima e 5 µL do produto da PCR. O sistema foi incubado a 37°C por 3 horas. Toda a reação de digestão, bem como a quantidade equivalente de DNA não digerido, foram aplicadas e visualizadas em eletroforese em gel de agarose 3%.

Tabela 5. Resumo dos iniciadores para amplificação do gene mitocondrial em ensaio de Nested-PCR/RFLP.

Alvo	Iniciador*	5'-3'	Amplicon
<i>Plasmodium sp.</i>	PsimOUT (<i>forward</i>)	CAGGTGGTGTTTTAATGTTATTATCAG	566pb
	PsimIN (<i>reverse</i>)	ATGTAAACAATCCAATAATTGCACC	
	PsimED (<i>forward</i>)	ATCCTACATTTGCTGGAGATCCTA	244pb
	PsimED (<i>reverse</i>)	GCTCTTGATCTACTTCTAAACCTGTAG	

*Alvarenga *et al.*, 2018.

4.6 Análise dos dados

Dados demográficos, epidemiológicos e parasitológicos foram inseridos em um banco de dados criado com o software *Epi Info™* (*Atlanta, GA, USA*). Para fins estatísticos, foram consideradas as seguintes variáveis: sexo, idade, local de residência (aldeia de origem), infecção malárica no momento da linha de base e durante os quatro meses de acompanhamento do estudo. As proporções foram comparadas usando tabelas de contingência 2x2 com testes qui-quadrado,

ajustadas pela correção de continuidade de Yates ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. A força de associação entre as variáveis foi avaliada aqui por meio da razão de chances (*Odds Ratio*, *OR*). O limiar de significância estatística estabelecido foi $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95% para todos os testes de hipóteses. Todas as análises foram realizadas utilizando o *GraphPad InStat*, versão 3 (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*).

5 RESULTADOS

5.1 Infecções maláricas na linha de base do estudo

5.1.1 Características demográficas da população estudada

Na linha de base do estudo, conduzida em setembro de 2014, 707 indivíduos do Pólo Base Marari foram avaliados. A proporção entre homens e mulheres foi similar na comunidade, que se caracterizou por uma população predominantemente jovem, com mediana de idade de 14 anos (IQR 6-33 anos). Apesar disto, houve uma grande variação entre a idade mínima e a máxima, que foi de 1 (um) a 79 anos (Tabela 6). Embora o número de habitantes por aldeia tenha variado (122 a 214), o perfil com predominância de jovens de ambos os sexos se manteve em todas as aldeias estudadas (Tabela 6).

Tabela 6. Dados demográficos da linha de base do estudo (setembro/2014), em função da aldeia estudada, Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil.

	Aldeias				Total (n=707)
	Taibrapa-II* (n=197)	Gasolina (n=174)	Alapusi (n=122)	Castanha/Ahima** (n=214)	
Sexo					
Masculino:Feminino	1:1.05	1:0.74	1:0.79	1:1.39	1:1
Idade (anos)					
Mediana (IQR)	15 (6-35)	12 (5-30)	13 (6.25-31)	15 (8.33-25)	14 (6-33)
Varição	1-76	1-69	1-76	1-79	1-79

IQR, intervalo interquartil.

*Na linha de base do estudo, os habitantes de Taibrapa estavam temporariamente na residência alternativa intitulada Taibrapa-II.

**Sede do Pólo Base Marari (*Marari Health Unit*).

5.1.2 Infecções maláricas microscópicas e submicroscópicas

Visando aumentar a sensibilidade na detecção de possíveis infecções mistas e com baixas parasitemias, as amostras foram submetidas a protocolos moleculares baseados em diferentes alvos plasmódiais -- ribossomais e não ribossomais -- (Figura 7).

A frequência de infecções maláricas detectadas pelo diagnóstico parasitológico – método de referência – na linha de base do estudo, foi de 1.55% (11 de 707), variando de 0.46 a 2.3% entre as aldeias (Tabela 7). Considerando a detecção por protocolos moleculares, a proporção de positivos foi significativamente maior (42 de 707; 5.95%), o que correspondeu a um aumento na prevalência de cerca de quatro vezes. Observou-se diferenças estatisticamente significativas entre as aldeias (teste exato de Fisher, $p < 0.05$), indicando que a malária não é homogeneamente distribuída na área de estudo; de fato, a positividade variou de 1.4% (Castanha/Ahima) a 12.2% (Taibrapa-II) (Tabela 7). De relevância, os protocolos moleculares detectaram grande parte das amostras previamente identificadas pela gota espessa (com exceção de 1 amostra na aldeia de Gasolina, detectada apenas pelo método parasitológico).

Tabela 7. Prevalência de malária na linha de base do estudo (setembro/2014), em função da aldeia estudada, Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil.

	Aldeias				Total (n=707)
	Taibrapa-II* (n=197)	Gasolina (n=174)	Alapusi (n=122)	Castanha/Ahima** (n=214)	
Positivos (%)					
Gota espessa***	4 (2.0)	4 (2.3)	2 (1.6)	1 (0.46)	11 (1.55) [§]
Protocolos de PCR	24 (12.2)	11 (6.3)	4 (3.3)	3 (1.4)	42 (5.95) [£]
Total	24 (12.2) ^a	12 (6.9) ^{ac}	4 (3.3) ^{bc}	3 (1.4) ^b	43 (6.1)

PCR = reação em cadeia da polimerase.

*Na linha de base do estudo, os habitantes de Taibrapa estavam temporariamente na residência alternativa intitulada Taibrapa-II.

**Sede do Pólo Base Marari (*Marari Health Unit*).

***Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a positividade referente ao diagnóstico parasitológico (Teste Qui-quadrado, $p=0.4614$).

^{§,£}Diferentes símbolos indicam diferenças estatisticamente significativas entre a gota espessa e os protocolos de PCR (Teste exato de Fisher, $p < 0.05$).

^{a,b,c}Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas na positividade entre as aldeias (Teste exato de Fisher, $p < 0.05$).

Neste sentido, a probabilidade de se adquirir malária foi estatisticamente maior em Taibrapa-II (OR=9.8, IC 95% 3.05-31.11, $p<0,0001$) e Gasolina (OR=5.2, IC 95% 1.64-17.49, $p=0.0068$), quando comparadas com Castanha/Ahima, a aldeia com a menor frequência de casos, sendo, portanto, utilizada como referência. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para a aldeia de Alapusi (OR=2.4, IC 95% 0.63-9.56, $p=0.2608$) (Figura 8).

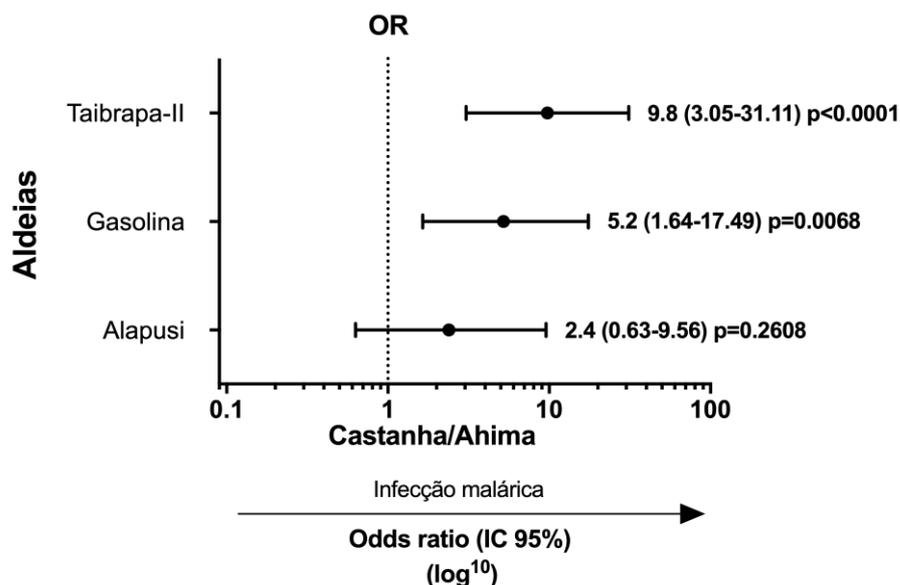


Figura 8. Chances de risco (Odds Ratio, OR) para a infecção malárica por aldeia ianomâmi na linha de base do estudo, setembro/2014. Para o cálculo do risco relativo a aldeia com menor número de infecções maláricas foi considerada como referência (Castanha/Ahima, OR=1). No recrutamento inicial, os habitantes de Taibrapa estavam localizados em sua residência alternativa intitulada Taibrapa-II. O OR bruto foi obtido usando tabelas de contingência 2x2 com intervalo de confiança de 95% (IC), $p<0,05$. A infecção malárica foi confirmada por gota espessa e/ou ensaios moleculares.

Os dados demonstraram, ainda, que a idade foi um fator determinante no diagnóstico parasitológico da população estudada. De fato, a prevalência de malária microscópica diminuiu em função da idade, sendo positiva apenas em crianças e adolescentes (0-15 anos) (Figura 9). Por outro lado, os ensaios moleculares foram capazes de detectar infecções maláricas em todos os grupos etários (<5 até >51 anos) (Figura 9).

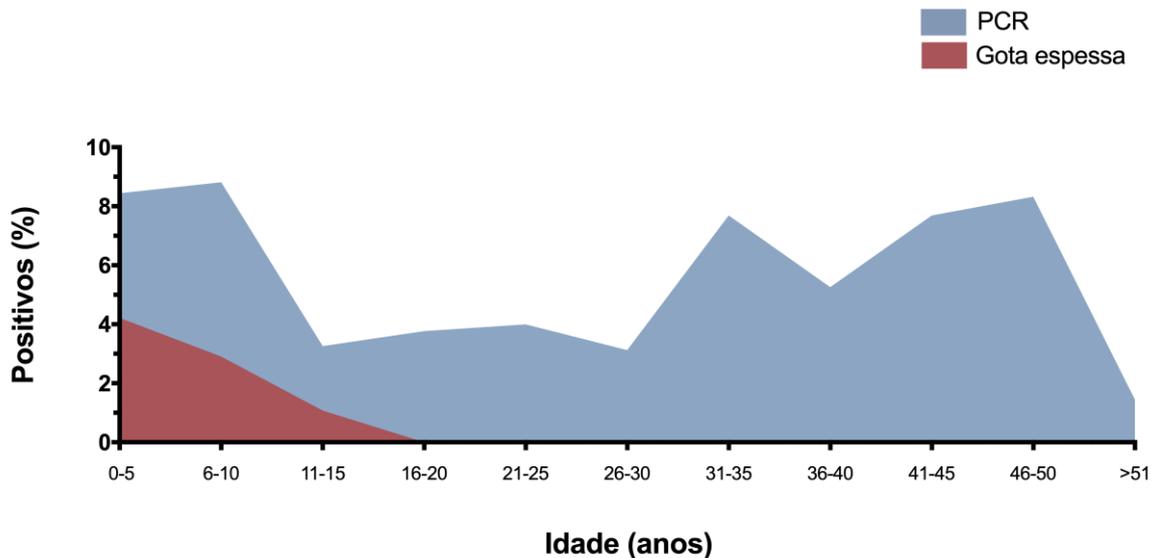


Figura 9. Infecção malárica detectada por diagnóstico parasitológico convencional (gota espessa) e diagnóstico molecular (protocolos de PCR), estratificada de acordo com a faixa etária (anos), na linha de base do estudo, setembro/2014.

Independente do método de detecção, a prevalência de malária foi similar entre os sexos (masculino e feminino), não havendo diferenças estatisticamente significativas na comparação entre grupos etários (teste exato de Fisher, $p > 0.05$) (Figura 10).

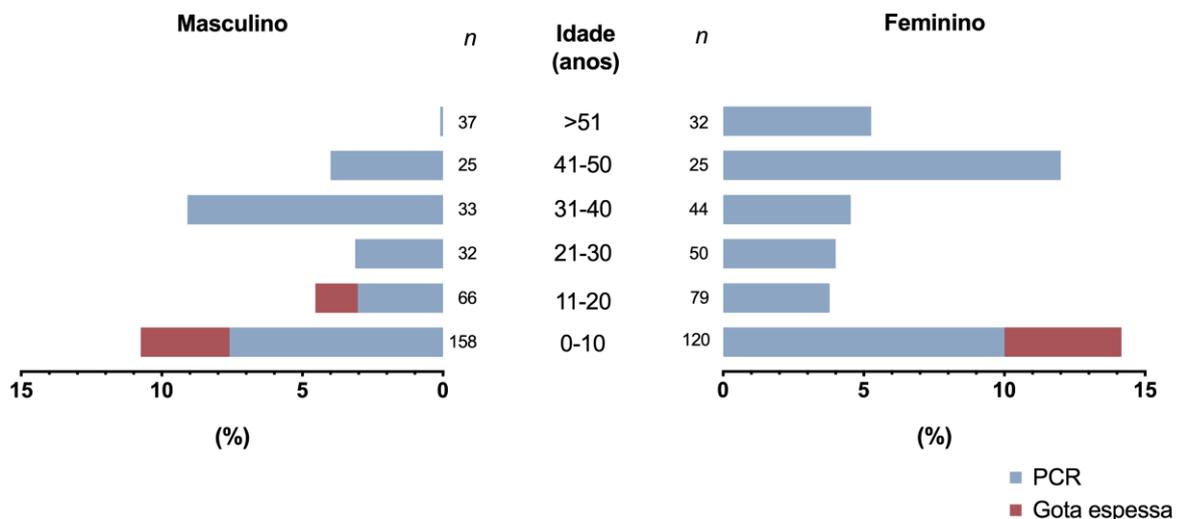


Figura 10. Prevalência de malária de acordo com o sexo (masculino e feminino) em função da faixa etária (anos), na linha de base do estudo, setembro/2014. Casos de malária foram definidos pela positividade mediante diagnóstico parasitológico convencional (gota espessa) e por diagnóstico molecular (protocolos de PCR). O número (n) de indivíduos em cada faixa etária foi representado nas respectivas barras.

Na linha de base do estudo, uma proporção similar de infecções por *P. vivax* (35%) e *P. malariae* (33%) foi obtida, seguida de *P. falciparum* (16%) e co-infecções (9%) (Tabela 8). De relevância, as infecções decorrentes do *P. malariae* foram praticamente restritas a aldeia Taibrapa-II (12 de 14), sugerindo uma transmissão localizada na área.

Dentre as 43 infecções identificadas, quatro foram resultantes de co-infecções – duas por *P. vivax/P. malariae* e duas por *P. falciparum/P. malariae* –, o que demonstra a prevalência do *P. malariae* em simpatria com outras espécies de plasmódios. Em três amostras PCR-positivas, as inconsistências no diagnóstico espécie-específico permitiram que as amostras fossem classificadas como positivas apenas em nível de gênero (*Plasmodium*) (Tabela 8).

Tabela 8. Dados referentes a positividade espécie-específica das amostras coletadas na linha de base do estudo (setembro/2014), em função da aldeia estudada, Pólo Base Marari, Amazonas, Brasil.

	Aldeias				Total (n=43)
	Taibrapa-II* (n=24)	Gasolina (n=12)	Alapusi (n=4)	Castanha/Ahima** (n=3)	
<i>P. vivax</i>	4 (16.7)	6 (50.0)	3 (75.0)	2 (66.7)	15 (34.9)
<i>P. malariae</i>	12 (50.0)	1 (8.3)	0	1 (33.3)	14 (32.5)
<i>P. falciparum</i>	3 (12.5)	3 (25.0)	1 (25.0)	0	7 (16.3)
<i>Plasmodium</i> ***	2 (8.3)	1 (8.3)	0	0	3 (7.0)
Co-infecções****	3 (12.5)	1 (8.3)	0	0	4 (9.3)

*Na linha de base do estudo, os habitantes de Taibrapa estavam temporariamente na residência alternativa intitulada Taibrapa-II.

**Sede do Pólo Base Marari (Marari Health Unit).

***Positividade apenas para gênero (sem consenso na identificação específica).

*****P. vivax/P. malariae* (n=2), *P. falciparum/P. malariae* (n=2).

5.2 Dinâmica espacial e temporal da prevalência de malária na área de estudo

Visto que a maioria das infecções maláricas entre as comunidades ianomânis foram submicroscópicas, avaliou-se a dinâmica das infecções dentro de um curto intervalo de tempo (2 e 4 meses após a linha de base do estudo) (Figura 4). Durante estes cortes-transversais sucessivos, os habitantes de Taibrapa se localizavam em uma aldeia alternativa dentro do Pólo Base Marari (Taibrapa-II para Taibrapa-I) (Figura 3).

Conforme ilustrado na Figura 11, o número de infecções maláricas variou espacial e temporalmente durante o período de acompanhamento do estudo. Mais especificamente, durante o segundo corte-transversal, o número de casos diminuiu significativamente em relação a linha de base, sendo seguido por posterior aumento. Considerando a variação intra-aldeias, pode-se observar que, ao longo do estudo, houve uma diminuição significativa de casos em Taibrapa (~12% para 4%), acompanhado por um aumento no número de ocorrências em Alapusi (~3% para 15%) (Figura 11). Estes resultados foram independentes dos níveis de parasitos circulantes (gota espessa e PCR). Já com relação à prevalência de infecções microscópicas ao longo do período de acompanhamento do estudo, ocorreu variação de 0.7 a 2%, enquanto a positividade por ensaios moleculares (PCR) se manteve entre 3.6 e 8.7% (Figura 11).

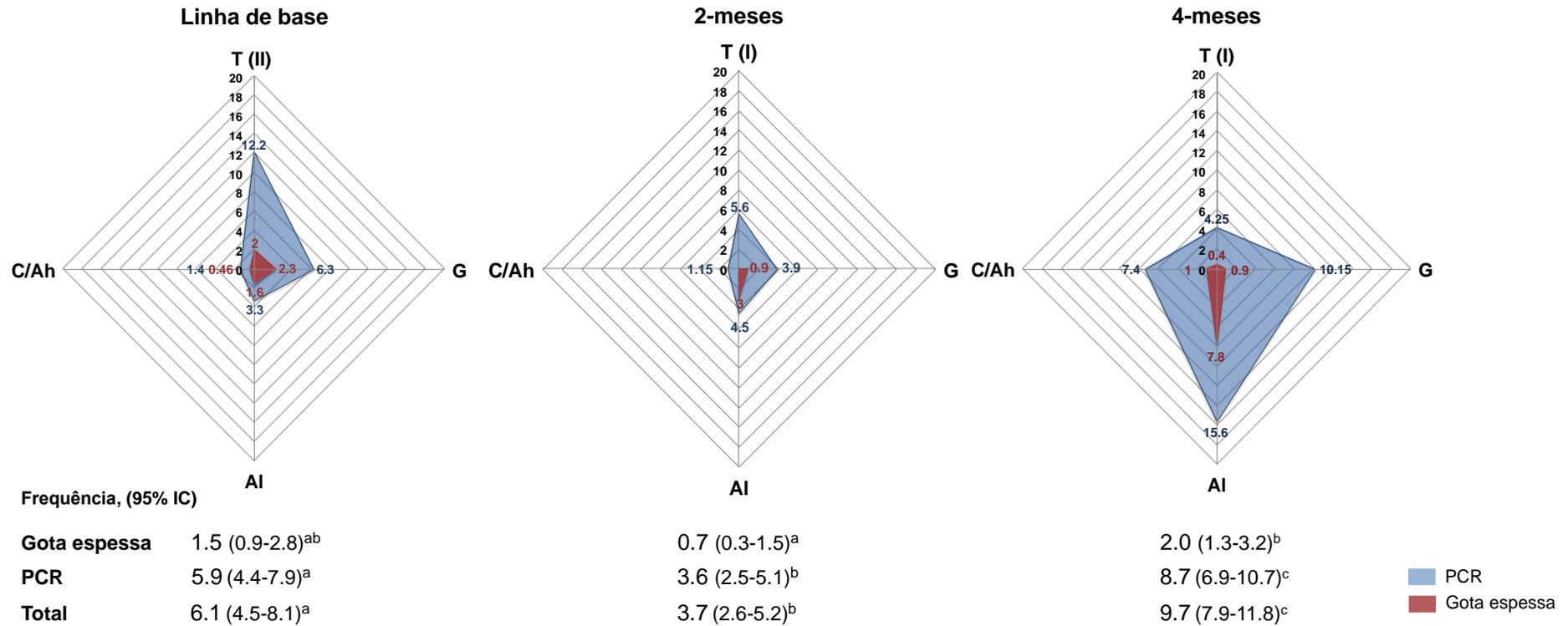


Figura 11. Gráficos de radar ilustrando a prevalência de malária por aldeia durante o período de quatro meses de acompanhamento do estudo. Três cortes transversais foram realizados conforme descrito na legenda da Figura 4 (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo). Em cada gráfico, os dados foram esquematizados de acordo com a porcentagem de indivíduos positivos por diagnóstico parasitológico convencional (gota espessa) ou ensaios moleculares (PCR). As aldeias ianomâmis foram representadas como Taibrapa (T-I ou T-II, de acordo com a residência ocupada durante o período da coleta), Gasolina (G), Alapusi (AI) e Castanha/Ahima (C/Ah). A porcentagem geral de indivíduos positivos e seus intervalos de confiança de 95% para cada corte foram demonstrados abaixo de seus respectivos gráficos, com diferentes letras (^{a-c}) indicando diferenças estatisticamente significativas entre os intervalos de coleta (Teste exato de Fisher, $p < 0,05$).

Embora a prevalência de malária tenha variado entre as aldeias, todos os cortes transversais foram caracterizados por predomínio de infecções submicroscópicas, identificadas, apenas, por ensaios moleculares (Figura 12). De fato, a proporção entre as infecções submicroscópicas para microscópicas variou de três a quatro vezes durante os cortes transversais avaliados.

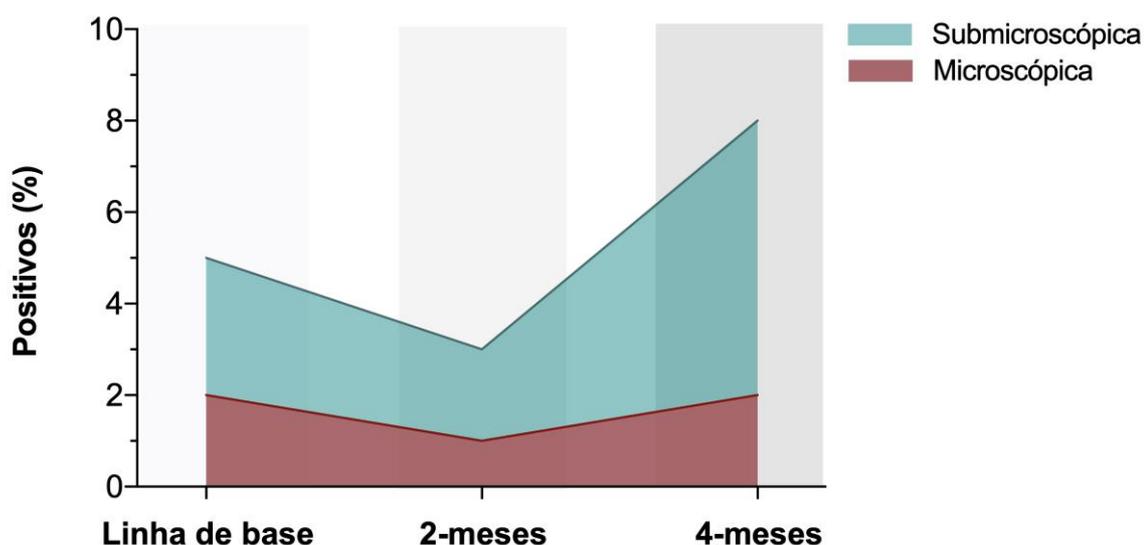


Figura 12. Prevalência de infecção malárica submicroscópica e microscópica, de acordo com o corte transversal (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo). As infecções submicroscópicas foram determinadas por protocolos moleculares e as infecções microscópicas por diagnóstico parasitológico convencional (gota espessa).

A prevalência das três espécies de plasmódios detectadas no estudo (*P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*) variaram durante o período de acompanhamento (Figura 13 e Figura 14). Embora a frequência de *P. vivax* (35%) e *P. malariae* (33%) tenha sido semelhante durante o primeiro corte-transversal, as infecções por *P. vivax* predominaram durante a segunda (66%) e terceira (69%) coleta (Figura 13). Uma diminuição na prevalência das infecções por *P. malariae* no segundo momento do estudo – que ocorreu, concomitantemente, com a migração dos residentes de Taibrapa para sua residência alternativa (Taibrapa-I) – resultou, temporariamente, em um aumento na proporção de infecções por *P. falciparum* (22%) em comparação com infecções decorrentes da presença do *P. malariae* (7%) (Figura 13).

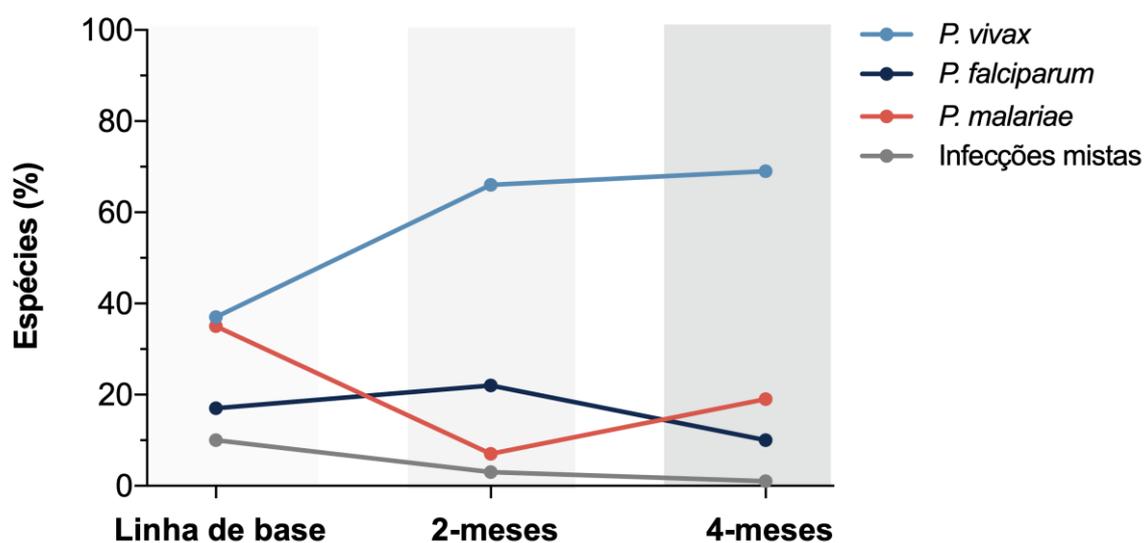


Figura 13. Prevalência de infecção malárica de acordo com as espécies de plasmódios (*P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae* e infecções mistas), durante todo o período do estudo (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo).

Ao longo do estudo, a positividade microscópica mediante diagnóstico parasitológico a partir de gota espessa, continuou restrita a crianças e adolescentes (0-15 anos), enquanto os ensaios moleculares detectaram indivíduos positivos em todas as faixas etárias (Figura 14). Na área estudada, a positividade por espécie ao longo do tempo confirmou a detecção exclusiva do *P. malariae* por protocolos moleculares.

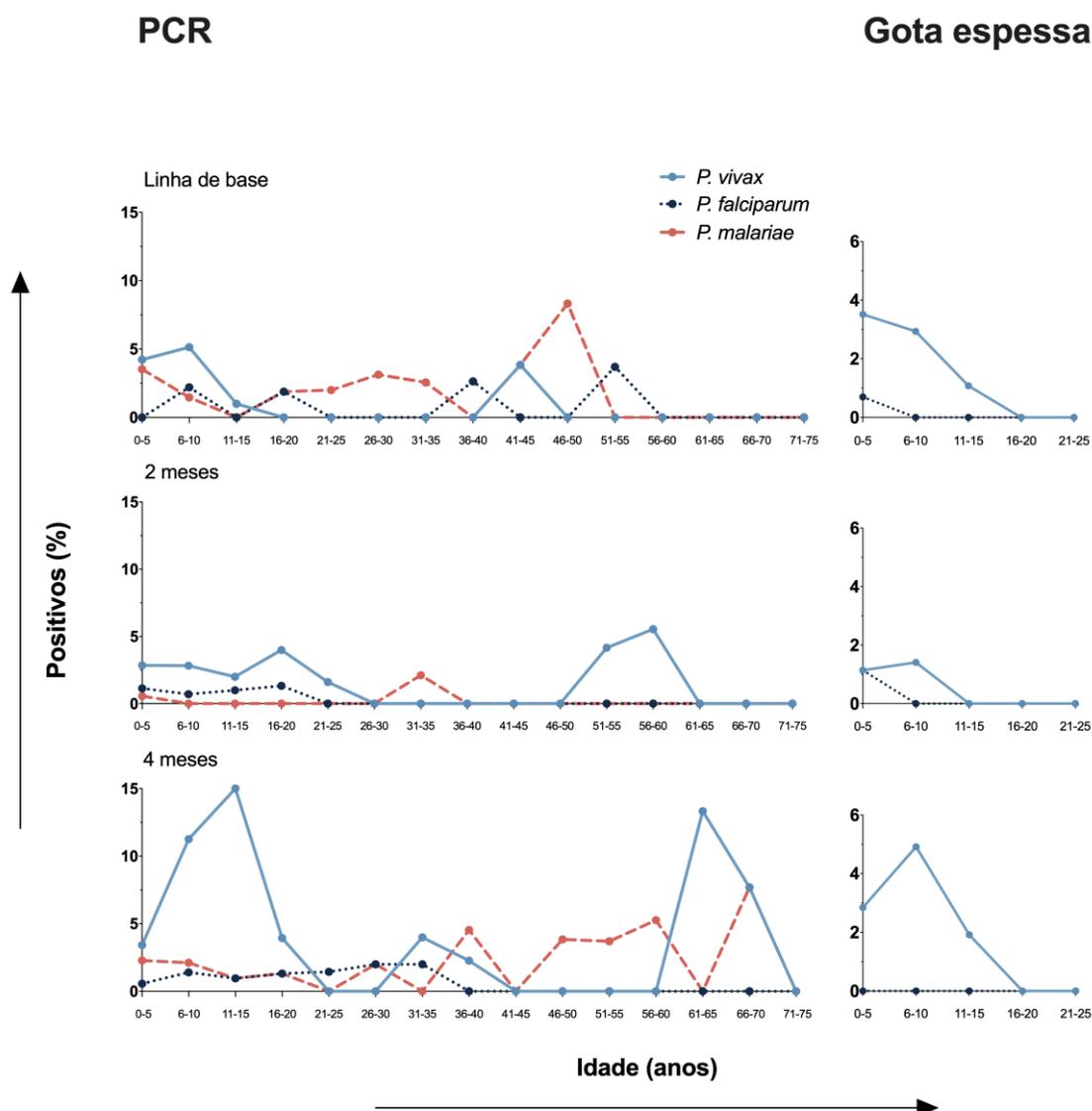


Figura 14. Positividade espécie-específica a malária, estratificada de acordo com a faixa etária (anos), durante todo o período do estudo (linha de base, 2 e 4 meses após o início do estudo). As infecções mediante *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* foram determinadas por gota espessa e/ou protocolos de PCR.

5.3 Investigação da circulação potencial de *P. simium*

Considerando que as amplificações de alvos ribossomais e não ribossomais dos plasmódios por ensaios moleculares não permitem diferenciar infecções humanas causadas pelo *P. vivax* daquelas causadas pelo *P. simium*, fez-se necessário utilizar um protocolo molecular adicional. Para tal, todas as amostras positivas para o *P. vivax* foram submetidas ao ensaio de Nested-PCR/RFLP descrito por Alvarenga e colaboradores (2018) (item 4.5.4.4), que visa a diferenciação

genética entre estas espécies a partir do reconhecimento de polimorfismos de base única (*SNPs*) do genoma mitocondrial destes parasitos, (3535, T> C).

Como ilustrado na Figura 15, o controle positivo de *P. vivax* (*Pv*) não foi digerido pela enzima de restrição específica para o *SNP* de *P. simium* (*HpyCH4III*), o que resultou em um fragmento único de cerca de 244pb. Por outro lado, após tratamento enzimático, a amostra controle de *P. simium* (*Ps*) resultou em dois fragmentos de tamanhos aproximados (118 e 126pb) – os quais se sobrepõem no gel de agarose 3% –. Em conjunto, os resultados demonstraram que todas as amostras de *P. vivax* processadas não apresentaram o *SNP* característico de *P. simium*, não sendo, portanto digeridas pela enzima de restrição. A Figura 15 exemplifica uma amostragem de 16 amostras de *P. vivax*, com a banda esperada de 244pb.

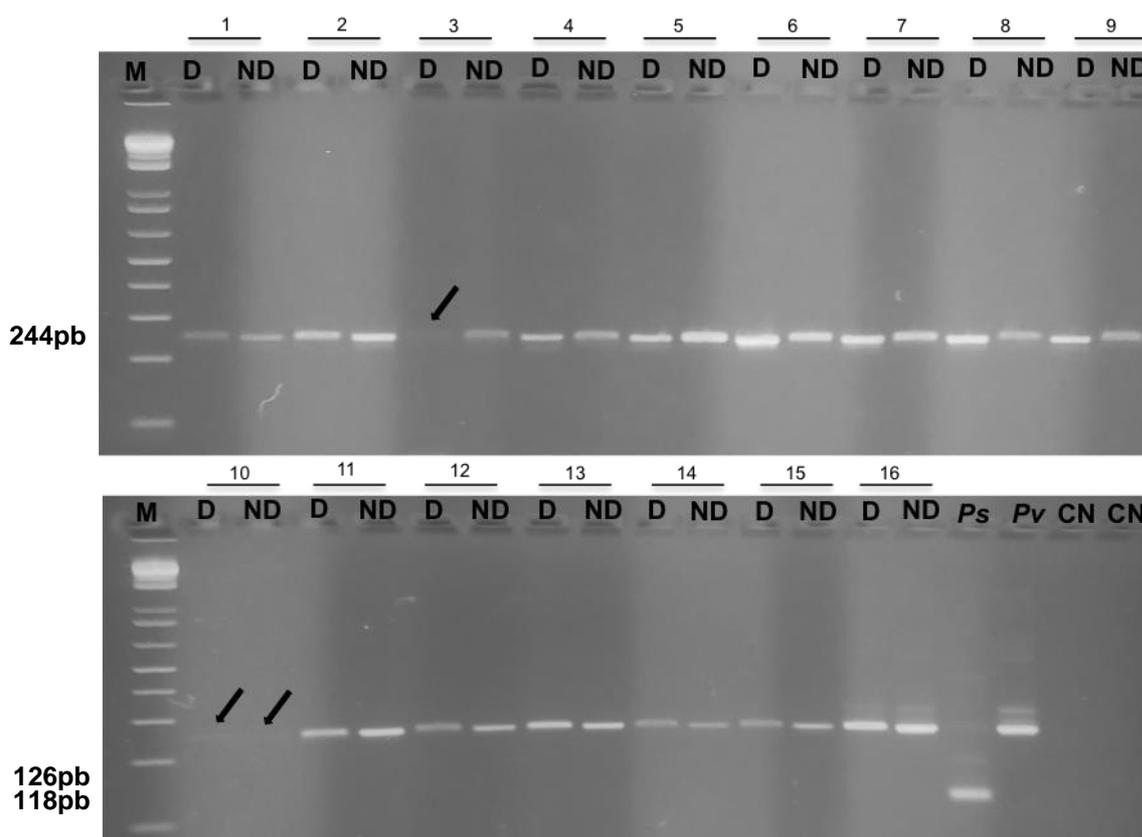


Figura 15. Gel de agarose ilustrando as bandas correspondentes ao *P. vivax* (244pb) e *P. simium* (118/126pb), obtidas por Nested-PCR/RFLP após digestão com enzima de restrição *HpyCH4III*. As amostras previamente positivas para o *P. vivax* (1 a 16) foram aplicadas no gel de agarose 3%, conforme demonstrado, sendo o produto digerido (D) aplicado juntamente com o produto não digerido (ND) para cada uma das respectivas amostras, sendo (M) o marcador de peso molecular (1Kb). Como controles positivos foram utilizadas amostras de *P. simium* (*Ps*; com um perfil

de digestão de 118pb e 126pb, com bandas sobrepostas) e *P. vivax* (*Pv*; com perfil não digerido, correspondendo a banda única de 244pb). Como controle negativo foram utilizados todos os reagentes na ausência de DNA. As setas indicam a presença de bandas, embora de intensidade mais baixa.

5.4 Flutuação temporal da positividade nos indivíduos avaliados

O próximo passo foi avaliar a persistência das infecções maláricas, bem como as variações nos níveis dos parasitos circulantes, nos indivíduos estudados (Figura 16). Entre os 859 indivíduos com amostras consecutivas, 143 (16.6%) foram positivos para a malária em algum momento do estudo. Dentre estes, apenas 12 (8.4%) – crianças com mediana de idade de 3 anos – mantiveram infecção malárica detectável em amostras adicionais (Figura 16A), sendo a maioria das infecções identificadas apenas por protocolos moleculares.

Em relação aos indivíduos que obtiveram apenas uma amostra positiva nos diferentes meses de acompanhamento do estudo: 35 (24,5%) foram identificados na linha de base do estudo, 22 (15.4%) no segundo corte transversal e 74 (51.7%) no terceiro momento (Figura 16B-D). A mediana de idade dos indivíduos com uma única amostra positiva variou de 9 a 11 anos, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre estes grupos e o de crianças que obtiveram amostras positivas consecutivas (3 vs 9-11 anos; teste de Kruskal-Wallis $p > 0.05$).

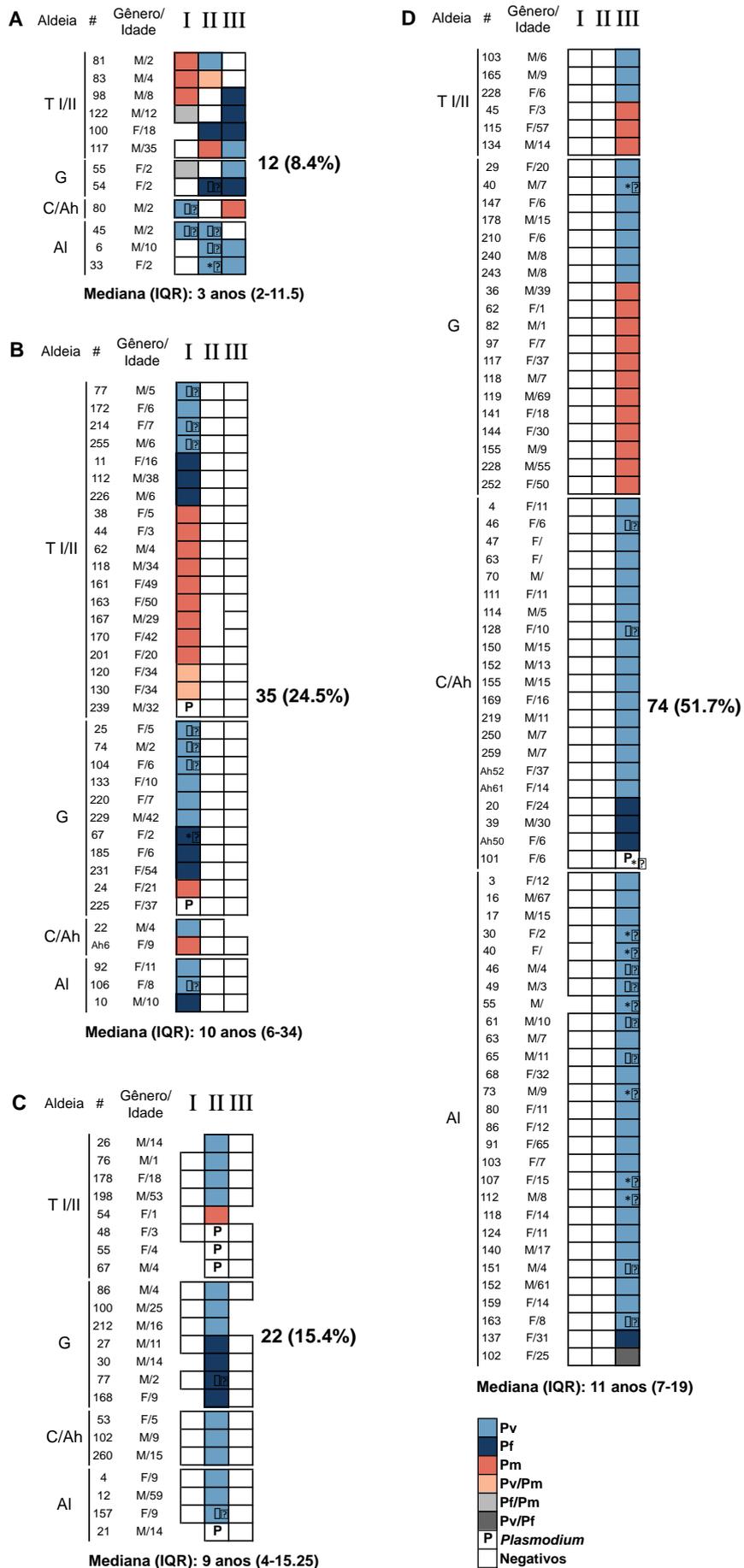


Figura 16. Dados demograficos, epidemiológicos e parasitológicos de 143 indivíduos que

apresentaram positividade para malária em algum momento do estudo. Os indivíduos foram agrupados de acordo com o perfil de positividade para malária em cada um dos três cortes transversais (colunas I, II e III, respectivamente), sendo: **(A)** indivíduos positivos em pelo menos dois cortes transversais (n=12); **(B)** indivíduos positivos apenas na linha de base (I; n=35); **(C)** no segundo corte transversal (II, n=22) ou **(D)** no terceiro corte transversal (III; n=74). A positividade por espécie foi representada por diferentes cores, conforme indicado na legenda: *P. vivax* (Pv) azul claro; *P. falciparum* (Pf) azul escuro; *P. malariae* (Pm) laranja; e co-infecções em cores variando do laranja claro ao cinza. O ponto (•) dentro de cada quadrado indica positividade tanto por gota espessa quanto por PCR, enquanto os asteriscos (*) indicam positividade somente por gota espessa. Os indivíduos foram codificados (#) sendo as variáveis demográficas (idade, sexo) e epidemiológicas (aldeia, Taibrapa (T I/II), Gasolina (G), Castanha/Ahima (C/Ah) e Alapusi (Al)), incluídas na figura.

6. DISCUSSÃO

No Brasil, o número de casos de malária voltou a aumentar nos últimos anos, colocando em risco populações vulneráveis, como é o caso das comunidades indígenas da Amazônia Brasileira (LEANDRO-REGUILLO *et al.*, 2015; MONDOLFI *et al.*, 2019). Nestas áreas, a invasão crescente de garimpeiros e madeireiros em terras demarcadas representa um alto risco para a saúde das comunidades locais, uma vez que influencia, diretamente: (i) na transmissão de doenças infecciosas como a malária (GRENFELL *et al.*, 2008; MATO, 1998; SHANKS, 2016), HIV/AIDS (BONALUME, 1991), sífilis (RUSSELL *et al.*, 2019) e tuberculose (PITHAN *et al.*, 1991); (ii) na contaminação da água e do solo com metal pesado (MONDOLFI *et al.*, 2019; VEGA *et al.*, 2018); e (iii) na sustentabilidade ambiental e alimentar das populações nativas (WALKER *et al.*, 2020). Estes fatores, associados ao acesso limitado em áreas remotas da floresta Amazônica, representam um grande desafio para as estratégias de controle e vigilância da malária. Além disso, a desigualdade de acesso aos poucos serviços locais de saúde tem resultado na subnotificação de morbidade e mortalidade por malária na região (GRENFELL *et al.*, 2008).

No contexto de eliminação da malária em grupos vulneráveis, ressalta-se a importância da detecção de indivíduos com baixas parasitemias que não são identificados no diagnóstico de rotina (ALVES *et al.*, 2005). Embora não exista um consenso sobre a contribuição das infecções submicroscópicas para a manutenção da transmissão da malária, descobertas recentes indicam que tais infecções podem: (i) contribuir, consideravelmente, para os reservatórios infecciosos; (ii) ser de longa duração, se mantendo durante períodos consideráveis; e (iii) exigir diagnóstico sensível em áreas com níveis baixos de transmissão (ALMEIDA *et al.*, 2018; SLATER *et al.*, 2019). Em suma, faz-se necessário identificar indivíduos que integram este cenário, a fim de interromper o ciclo de transmissão e mensurar a real prevalência da doença nas áreas sobre vigilância epidemiológica.

Com o objetivo de identificar infecções maláricas com baixas densidades parasitárias na população estudada, o presente estudo utilizou diferentes protocolos moleculares, incluindo aqueles baseados na detecção de alvos ribossomais dos plasmódios (*18S SSU rRNA*) (SNOUNOU *et al.*, 1993) e alvos multi-cópias

baseados em sequências não ribossomais do *P. vivax* e do *P. falciparum* (DEMAS *et al.*, 2011).

6.1 Prevalência de malária nas aldeias ianomâmis

Os resultados aqui demonstrados permitiram comprovar a baixa sensibilidade do exame parasitológico de rotina – gota espessa corada com Giemsa – na área estudada. Atualmente, já existe um consenso acerca das limitações do método parasitológico convencional, particularmente, em populações com baixas parasitemias (HÄNSCHEID, 2003; PROUX *et al.*, 2011). De fato, os resultados demonstram que, na linha de base do estudo, enquanto a gota espessa identificou uma positividade de 1.5%, a frequência de positivos pelos protocolos moleculares foi de cerca de 6%, o que correspondeu a um aumento de quatro vezes na prevalência da infecção. De relevância, o diagnóstico parasitológico não identificou nenhum caso de *P. malariae* nas amostras estudadas, sendo que as infecções submicroscópicas por este parasito foram encontradas em frequências significativas em todos os meses de acompanhamento do estudo.

O presente trabalho envolveu busca ativa de casos de malária, isto é, a pesquisa por parasitos circulantes e DNA plasmodial foi realizada em toda a população estudada independente da presença de sintomas relacionados à doença; isto permitiu identificar um número significativo de infecções submicroscópicas. De fato, durante os quatro meses de acompanhamento do estudo, enquanto o diagnóstico parasitológico identificou taxas de positividade variando de 0.7% (novembro/2014) a 2.0% (janeiro/2015), os protocolos moleculares foram capazes de identificar taxas que variaram de 3.6% (novembro/2014) a 8.65% (janeiro/2015). Isto reforça a importância de se empregar métodos de diagnósticos mais sensíveis em populações nativas caracterizadas por baixas densidades parasitárias.

A partir dos dados demonstrados foi possível constatar que nas comunidades indígenas semi-isoladas do Pólo Base Marari, aproximadamente, 75 a 80% de todas as infecções maláricas foram submicroscópicas, com a proporção de infecções submicroscópicas para microscópicas permanecendo estável ao longo dos cortes

transversais. Os poucos dados disponíveis sobre a prevalência de infecções maláricas entre comunidades indígenas da Amazônia relatam altas taxas de infecções submicroscópicas, particularmente, na Venezuela, para a qual a maioria dos dados hoje encontram-se disponíveis (LALREMRUATA *et al.*, 2015; LASERSON *et al.*, 1999; MARCANO *et al.*, 2004; METZGER *et al.*, 2008; METZGER *et al.*, 2009).

A prevalência de malária diferiu consideravelmente entre as aldeias do Pólo Base Marari (Taibrapa I/II, Gasolina, Alapusi e Castanha/Ahima), sugerindo heterogeneidade local na transmissão da malária. Além disto, o número de casos dentro de uma mesma aldeia variou ao longo do tempo. É possível que esta variação na prevalência da malária intra e inter-aldeia seja consequência da grande variabilidade nos habitats naturais de criação de mosquitos anofelinos. Em um trabalho anterior, conduzido por colaboradores deste estudo (Dr. Jordi Sánchez-Ribas, IOC/Fiocruz Rio), uma grande variedade de microhabitats larvais foi descrita e caracterizada nestas comunidades ianomâmis, incluindo: (i) criadores associados a lagos conectados a rios locais; (ii) “piscinas” temporárias formadas a partir da água de chuva e áreas inundadas; (iii) córregos; e (iv) pequenos riachos e rios (SÁNCHEZ-RIBAS *et al.*, 2015). Como consequência, diferentes habitats larvais, com características intrínsecas distintas, podem resultar em alta heterogeneidade na densidade larval e nas espécies de *Anopheles* circulantes nas comunidades (SÁNCHEZ-RIBAS *et al.*, 2017). Além disso, os hábitos seminômades dos ianomâmis fazem com que eles sejam expostos a diferentes tipos de criadouros ao longo do ano. Este foi o caso, por exemplo, dos habitantes de Taibrapa que durante o estudo migraram para uma residência alternativa localizada há cerca de 15 quilômetros da aldeia original (de Taibrapa-II para Taibrapa-I). Como consequência, em um curto intervalo de tempo (2 meses entre a 1ª e a 2ª coleta), foi possível detectar uma diminuição significativa na incidência de malária entre os habitantes de Taibrapa. Estes achados podem contribuir para orientar e implementar medidas de vigilância e controle na região; uma vez que indicam a necessidade de conhecer a transmissão da doença em microrregiões, levando-se em consideração as variações temporais.

6.1.1 Fatores demográficos influenciando na positividade malárica

Com relação à positividade de infecções maláricas de acordo com o sexo, observou-se uma prevalência semelhante de infecções entre homens e mulheres. Este resultado não foi completamente inesperado, uma vez que nestas aldeias ianomânis – nas quais a transmissão predomina no peridomicílio –, os hábitos socioculturais e o comportamento seminômade dos grupos familiares podem resultar em níveis de exposição semelhante para ambos os sexos (LASERSON *et al.*, 1994; LASERSON *et al.*, 1999). Em indígenas semi-isolados, já foi demonstrado que as atividades culturais realizadas em família, nas proximidades de suas habitações, como é o caso, por exemplo, da prática do banho, podem facilitar a exposição ao mosquito vetor (SÁ *et al.*, 2005). Além disso, o tipo de habitação dos ianomânis facilita a exposição similar entre homens e mulheres. Mais especificamente, os habitantes de cada aldeia residem em casas comunitárias (*shabonos*, com aproximadamente 200 pessoas), temporárias e sem divisões internas, construídas em clareiras na floresta. Assim, a exposição ao mosquito vetor parece ser igualmente favorecida para todos os habitantes.

Os dados demonstraram, ainda, que na população estudada a idade do indivíduo foi um fator determinante na positividade pelo exame parasitológico convencional. De fato, o número de casos detectados pela gota espessa diminuiu em função da idade. Esta correlação inversa entre o exame parasitológico e o aumento da idade foi observada durante todos os meses de acompanhamento do estudo. Sendo assim, o método parasitológico convencional foi capaz de diagnosticar malária, exclusivamente, em crianças e adolescentes (<16 anos). Considerando-se que o diagnóstico parasitológico convencional – pela sua baixa sensibilidade – identifica, preferencialmente, as altas parasitemias (PAYNE, 1988), pode-se assumir que, em comunidades indígenas Amazônicas, as crianças e adolescentes são mais susceptíveis a infecção malárica. Embora o estudo não tenha sido delineado para investigar morbidade da malária na população, estes achados são consistentes com trabalhos anteriores que relatam casos graves de malária em comunidades ianomânis, geralmente, associados à crianças menores de 10 anos (MARCANO *et al.*, 2004). Neste sentido, estudos atuais sobre o estado de saúde das populações indígenas na América Latina têm confirmado um cenário

desfavorável para crianças e adolescentes, com elevado grau de morbidade e mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias (TAVARES & FERREIRA, 2019). Por outro lado, o predomínio de infecções de baixas cargas parasitárias em adultos (positividade apenas por protocolos moleculares), sugerem uma imunidade naturalmente adquirida. De fato, já está bem estabelecido que a exposição sucessiva e contínua à malária em áreas endêmicas pode resultar em infecções com baixas cargas parasitárias e, geralmente, assintomáticas (FÄRNERT *et al.*, 2015; MARCANO *et al.*, 2004; MARSH & KINYANJUI, 2006). Assim, os dados aqui apresentados estão de acordo com aqueles conduzidos em populações constantemente expostas à malária, onde as maiores parasitemias ocorrem nas faixas etárias mais jovens (COURA *et al.*, 2006; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

Apesar dos dados aqui apresentados sugerirem imunidade adquirida na população estudada, limitações do desenho experimental não permitiram investigar sintomas clínicos associados às infecções maláricas. Apesar disto, dados de resposta de anticorpos contra antígenos de formas sanguíneas dos parasitos, particularmente, contra o *P. vivax*, sugerem imunidade adquirida. Mais especificamente, a resposta de anticorpos IgG contra diferentes antígenos de *P. vivax* (PvDBPII Sal-1 e DEKnull2) aumentou em função da idade (Anexo III). Embora esta resposta de anticorpos “per se” não indique proteção clínica, pode-se especular que indivíduos com baixas parasitemias e altos títulos de anticorpos, contra múltiplos antígenos do parasito, possam estar assintomáticos.

6.1.2 Espécies de plasmódios circulantes na área de estudo

O estudo de base populacional com cortes transversais consecutivos confirmou o *P. vivax* como a espécie predominante na área de estudo, tanto nas infecções microscópicas quanto em submicroscópicas. Devido às peculiaridades biológicas desta espécie, que inclui formas latentes no fígado (hipnozoítos), o *P. vivax* pode ser capaz de persistir nas populações expostas e ser reativado após períodos variáveis de tempo (KROTOSKI, 1989; KROTOSKI, 1985). Além disso, as tentativas de cura radical com primaquina – antimalárico utilizado para eliminar os hipnozoítos – apresentam limitações nestas comunidades. Isto porque o tratamento

com primaquina requer, no mínimo, sete dias de tratamento consecutivo, sendo frequente o abandono em populações isoladas. Portanto, os resultados aqui apresentados são consistentes com a predominância histórica desta espécie de plasmódio em tribos indígenas (GRENFELL *et al.*, 2008; LASERSON *et al.*, 1999; MARCANO *et al.*, 2004).

Considerando, ainda, a possibilidade de co-circulação de espécies de plasmódios consideradas “*P. vivax-like*” na área estudada, fez-se necessário diferenciar as infecções por *P. vivax* daquelas possivelmente decorrentes da presença do *P. simium*. Embora o *P. simium* – parasito comumente encontrado em primatas não humanos do Novo mundo e geneticamente similar ao *P. vivax* – tenha sido, frequentemente, reportado em áreas de Mata Atlântica, a infecção por este parasito nunca foi investigada em áreas ianomâmis da Amazônia Brasileira. Assim, todas as amostras positivas para o *P. vivax* foram submetidas a ensaio molecular capaz de diferenciar as duas espécies – *P. vivax* e *P. simium* – (DE ALVARENGA *et al.*, 2018). Neste sentido, os resultados aqui obtidos excluíram a possibilidade de infecção por *P. simium* nos indivíduos estudados, confirmando que a circulação desta espécie está, possivelmente, restrita à Mata Atlântica (ARAÚJO *et al.*, 2013; DE ALVARENGA *et al.*, 2018; DEANE, 1992; FIGUEIREDO *et al.*, 2017).

Em relação ao *P. malariae*, os protocolos moleculares confirmaram que esta espécie é prevalente na área de estudo, embora a sua frequência tenha variado entre as aldeias e, também, ao longo da coorte. Estes achados são consistentes com outros estudos que investigaram infecções maláricas em territórios indígenas ianomâmis e relataram a circulação do *P. malariae* em populações isoladas, particularmente, na Amazônia Venezuelana (LALREMRUATA *et al.*, 2015; MARCANO *et al.*, 2004; METZGER *et al.*, 2008).

Os resultados confirmam, ainda, que o diagnóstico parasitológico é inadequado para identificar o *P. malariae*, principalmente, em áreas onde sua prevalência possa estar elevada, como é o caso de áreas indígenas onde crianças e adultos podem permanecer infectados por períodos indeterminados. Isto porque o exame de gota espessa corada com Giemsa não permite diferenciar morfologicamente o *P. malariae* do *P. vivax*, dificultando o diagnóstico específico (RECHT *et al.*, 2017).

O *Plasmodium malariae* é uma espécie comumente descrita em simpatria com outras espécies de plasmódios (MUELLER *et al.*, 2007). Apesar disso, no presente estudo as co-infecções ocorreram em baixas frequências. Entretanto, a maioria das infecções detectadas foram em associação com o *P. malariae* (5 de 6). A ocorrência de infecções humanas por *P. malariae*, em áreas isoladas e remotas da floresta Amazônica, é consistente com a perspectiva de que os primatas não humanos atuam como reservatórios da infecção malárica nestas regiões (DE ARRUDA *et al.*, 1989; ARAÚJO *et al.*, 2013; COLLINS & JEFFERY, 2007). De fato, a diversidade genética descrita no Brasil entre o *P. malariae* e o *P. brasilianum* em hospedeiros humanos, primatas não humanos e nos mosquitos vetores (GUIMARÃES *et al.*, 2012), reforça a teoria de manutenção de uma única espécie circulante (LALREMURATA *et al.*, 2015); de interesse, a maior diversidade genética do *P. brasilianum* quando comparado ao *P. malariae* sugere uma transferência recente de hospedeiros, provavelmente, no sentido dos símios para os homens (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Nestas tribos indígenas, os humanos e os símios estão em contato estreito, já que estes animais são mantidos como animais de estimação nas aldeias. Nestas circunstâncias, tem sido proposto que na América Latina esses parasitos são capazes de circular livremente entre os diferentes hospedeiros (primatas humanos e não humanos).

As peculiaridades biológicas do *P. malariae*, como a capacidade de persistir no homem por longos períodos de tempo, representam um desafio para as medidas de controle. Isto porque, a transmissão transfusional de *P. malariae* a partir de doadores assintomáticos têm sido frequente (ALHO *et al.*, 2017; BROUWER *et al.*, 2013; MARTÍN-DÁVILA *et al.*, 2018), incluindo casos fatais (KIRCHGATTER *et al.*, 2005). Além disso, como o *P. malariae* pode estar associado a complicações renais, incluindo lesão renal aguda e glomerulopatias (DA SILVA JUNIOR *et al.*, 2017), os achados aqui encontrados indicam que os efeitos da infecção de longa duração por esta espécie em tribos indígenas da Amazônia devem ser sistematicamente investigados. Assim, considera-se que a infecção por *P. malariae* representa uma importante área para futuros estudos, particularmente, visando entender o potencial patogênico das infecções crônicas em crianças ianomâmis.

Embora o *P. falciparum* tenha sido menos prevalente do que o *P. malariae* na área estudada, os resultados apontam para a presença deste parasito em todas as

aldeias; incluindo infecções em crianças menores de 5 anos. Isto é relevante, visto que o *P. falciparum* é altamente patogênico e tem sido relatado em comunidades indígenas ianomâmis em frequências maiores que em outros grupos étnicos da região Amazônica (METZGER *et al.*, 2009). Associado a este agravante, encontram-se as operações ilegais de garimpo e extração de madeira, as quais favorecem a reintrodução periódica deste parasito em reservas florestais do território indígena Yanomami (SHANKS, 2016). Logo, estudos futuros são necessários para avaliar o real impacto da exposição destas comunidades indígenas ao *P. falciparum*, principalmente, na saúde de crianças ianomâmis, as quais encontram-se expostas a diversas comorbidades (infecciosas e não infecciosas) e a taxas alarmantes de subnutrição (COIMBRA *et al.*, 2013; TAVARES & FERREIRA, 2019).

6.1.3 Persistência da infecção malárica ao longo do estudo

Os quatro meses de acompanhamento do estudo forneceram uma excelente oportunidade para explorar a persistência dos parasitos circulantes nas infecções maláricas microscópicas e submicroscópicas. Nessas aldeias indígenas semi-isoladas, foi possível observar que, apenas 8% do total de indivíduos positivos para malária permaneceram com parasitos detectáveis em avaliações subsequentes, sendo, a maioria destes, crianças muito jovens (mediana de idade de 3 anos). Este resultado pode indicar que as infecções maláricas são de curta duração e/ou que a imunidade adquirida mantém os níveis de parasitos circulantes subpatentes (BOUSEMA *et al.*, 2014). Embora os dados aqui apresentados não permitam descartar nenhuma destas hipóteses, os resultados sugerem que a densidade parasitária em indivíduos infectados não é um parâmetro estático, podendo flutuar e, eventualmente, ficar abaixo do limite de detecção dos ensaios moleculares (NGUYEN *et al.*, 2018). Embora a genotipagem dos parasitos não tenha sido realizada, tem sido sugerido que a imunidade clínica controla a transmissão, principalmente, limitando o desenvolvimento dos estágios sanguíneos no ciclo biológico dos plasmódios (FELGER *et al.*, 2012). Neste sentido, fazem-se necessários estudos futuros em áreas indígenas ianomâmis a fim de: (i) avaliar as infecções maláricas individuais com base nos padrões de persistência de genótipos,

monitorando as flutuações de densidades parasitárias; (ii) avaliar o perfil das infecções maláricas de baixa densidade, buscando compreender o cenário de transmissão em áreas endêmicas, a fim de sugerir regiões potenciais para a vigilância epidemiológica; e (iii) avaliar a extensão das infecções maláricas submicroscópicas no contexto do tratamento antimalárico, uma vez que as infecções crônicas podem resultar em prejuízos na saúde do indivíduo a longo prazo (ASGHAR *et al.*, 2015).

6.2. Limitações do estudo

O presente estudo apresentou algumas limitações que devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. É possível especular que os cortes transversais tenham sido realizados em períodos com baixa transmissão de malária, que poderiam não ser representativos das variações sazonais de transmissão na área. No entanto, deve-se considerar as dificuldades relacionadas à coleta de amostras na região, já que a localização remota das aldeias ianomâmis na floresta Amazônica dificulta o acesso das equipes, sendo este realizado, exclusivamente, por pequenos aviões e embarcações fluviais. Além do mais, as estações na floresta Amazônica não são bem definidas e se caracterizam, basicamente, por uma estação seca e outra chuvosa com duração de cerca de seis meses cada. Visando minimizar as limitações logísticas do estudo, os cortes transversais foram delineados a fim de incluir meses da estação seca (setembro e novembro/2014) e início da estação chuvosa (janeiro/2015). Assim, apesar das limitações, os dados aqui obtidos parecem ser representativos da área de estudo, uma vez que compreendem as variações climáticas intrínsecas da floresta Amazônica.

7 CONCLUSÃO

i. Nas comunidades indígenas contempladas houve predomínio de infecções submicroscópicas, sendo que a relação entre infecções submicroscópicas e microscópicas se manteve relativamente estável ao longo dos quatro meses de acompanhamento do estudo, correspondendo a 4:1;

ii. Na área estudada o *P. vivax* foi a espécie predominante, seguido do *P. malariae* e, em menor extensão, o *P. falciparum*. As infecções por *P. malariae* se caracterizaram, possivelmente, por baixas densidades parasitárias, já que esta espécie foi identificada exclusivamente por protocolos moleculares;

iii. A ausência do *P. simium* nas aldeias ianomâmis da Amazônia Brasileira reforça a hipótese de que a circulação do *P. simium* esta restrita à Mata Atlântica;

iv. A prevalência de infecções maláricas foi similar entre homens e mulheres; no entanto a idade foi um fator determinante no diagnóstico parasitológico da população estudada, sendo as maiores parasitemias detectadas em crianças e adolescentes (<16 anos). A diminuição dos níveis parasitários com aumento da idade sugere imunidade naturalmente adquirida em decorrência da exposição sucessiva e contínua à malária;

v. A densidade parasitária da maioria dos indivíduos infectados não se manteve ao longo do estudo; assim, a parasitemia não pode ser assumida como um parâmetro estático, podendo flutuar ao longo do tempo e, eventualmente, ficar abaixo do limite de detecção dos ensaios moleculares;

vi. Entre as aldeias estudadas, a prevalência de malária variou consideravelmente tanto na intensidade quanto na frequência das espécies de plasmódios circulantes; a heterogeneidade na transmissão da malária local está possivelmente associada a grande variabilidade de criadouros de vetores anofelinos na região;

vii. Os protocolos moleculares fazem-se necessários para o estudo de prevalência

de malária em populações indígenas ianomâmis, tendo em vista, principalmente, a alta prevalência de infecções submicroscópicas e a circulação comprovado do *P. malariae* nestas regiões.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J. H.; MUELLER, I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 7, n. 9, p. 1–12, 2017.
- AGABA, B. B. *et al.* Systematic review of the status of *pfrp2* and *pfrp3* gene deletion, approaches and methods used for its estimation and reporting in *Plasmodium falciparum* populations in Africa: Review of published studies 2010-2019. *Malaria Journal*, v. 18, n. 355, p. 1–10, 2019.
- ALEXANDRE, M. A. *et al.* Severe *Plasmodium vivax* malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 10, p. 1611-1614, 2010.
- ALHO, R. M. *et al.* Alternative transmission routes in the malaria elimination era: an overview of transfusion - transmitted malaria in the Americas. *Malaria Journal*, v. 16, n. 78, p. 1–14, 2017.
- ALMEIDA, A. C. G. *et al.* High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasites and Vectors*, v. 11, n. 194, p. 1–13, 2018.
- ALVES, F. P. *et al.* Asymptomatic Carriers of *Plasmodium spp.* as Infection Source for Malaria Vector Mosquitoes in the Brazilian Amazon. *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 777–779, 2005.
- AMARAL, L. C. *et al.* Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malaria Journal*, v. 18, n. 154, p. 1–14, 2019.
- AMINO, R. *et al.* Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature Medicine*, v. 12, n. 2, p. 220-224, 2006.
- ANDRADE, B. B. *et al.* Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malaria Journal*, v. 9, n. 13, p. 1-8, 2010.
- ANSTEY, N. M. *et al.* Lung Injury in Vivax Malaria: Pathophysiological Evidence for Pulmonary Vascular Sequestration and Posttreatment Alveolar-Capillary Inflammation. *Journal of Infectious Diseases*, v. 195, n. 4, p. 589–596, 2007.
- ARAÚJO, M. S. *et al.* Natural *Plasmodium* infection in monkeys in the state of Rondônia (Brazilian Western Amazon). *Malaria Journal*, v. 12, n. 180, p. 1–8, 2013.
- ASGHAR, M. *et al.* Hidden costs of infection: Chronic malaria accelerates telomere degradation and senescence in wild birds. *Science*, v. 347, n. 6220, p. 436–438, 2015.
- AUTINO, B. *et al.* Epidemiology of malaria in endemic areas. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2012.

BAILEY, J. W. *et al.* Guideline: The laboratory diagnosis of malaria. *British Journal of Haematology*, v. 163, n. 5, p. 573–580, 2013.

BAIRD, J. K. Evidence and implications of mortality associated with acute plasmodium vivax malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 36-57, 2013.

BAIRD, J. K. *et al.* Diagnosis and treatment of *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. Suppl. 6, p. 35–51, 2016.

BATON, L. A.; RANFORD-CARTWRIGHT, L. C. *Plasmodium falciparum* ookinete invasion of the midgut epithelium of *Anopheles stephensi* is consistent with the Time Bomb model. *Parasitology*, v. 129, n. 6, p. 663–676, 2004.

BELACHEW, E. B. Immune Response and Evasion Mechanisms of *Plasmodium falciparum* Parasites. *Journal of Immunology Research*, v. 2018, p. 1-6, 2018.

BENELLI, G.; MEHLHORN, H. Declining malaria, rising of dengue and Zika virus: insights for mosquito vector control. *Parasitology Research*, v. 115, n. 5, p. 1747–1754, 2016.

BETUELA, I. *et al.* Relapses contribute significantly to the risk of plasmodium vivax infection and disease in papua new guinean children 1-5 years of age. *Journal of Infectious Diseases*, v. 206, n. 11, p. 1771–1780, 2012.

BONALUME, R. AIDS in Yanomami? *Nature*, v. 352, p. 272, 1991.

BOUSEMA, T. *et al.* Asymptomatic malaria infections: Detectability, transmissibility and public health relevance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 12, p. 833–840, 2014.

BRASIL, P. *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health*, v. 5, n. 10, p. 1038–1047, 2017.

BROUWER, E. E. *et al.* A case report of transfusion-transmitted *Plasmodium malariae* from an asymptomatic non-immune traveller. *Malaria Journal*, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2013.

BUERY, J. C. *et al.* Ecological characterisation and infection of anophelines (Diptera: Culicidae) of the atlantic forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: Has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 2, p. 111–118, 2018.

CAMARGO-AYALA, P. A. *et al.* High *plasmodium malariae* prevalence in an endemic area of the colombian amazon region. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. 1–17, 2016.

CARTER, R.; MENDIS, K. N. *Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 4, p. 564-594, 2002.

CARVALHO, R. C. C. *et al.* New pentasubstituted pyrrole hybrid atorvastatin-

quinoline derivatives with antiplasmodial activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 26, n. 8, p. 1881-1884, 2016.

CERAVOLO, I. P. *et al.* Naturally acquired inhibitory antibodies to *Plasmodium vivax* Duffy binding protein are short-lived and allele-specific following a single. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 156, n. 3, p. 502–510, 2009.

CERUTTI, C. *et al.* Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malaria Journal*, v. 6, n. 33, p. 1–12, 2007.

CHAVES, K. M. *et al.* Malaria in the state of Minas Gerais, Brazil, 1980-1992. *Cadernos de saude publica*, v. 11, n. 4, p. 621–623, 1995.

CHIODINI, P. L. Malaria diagnostics: Now and the future. *Parasitology*, v. 141, n. 14, p. 1873–1879, 2014.

COIMBRA, C. E. A. *et al.* The First National Survey of Indigenous People's Health and Nutrition in Brazil: Rationale, methodology, and overview of results. *BMC Public Health*, v. 13, n. 52, p. 1–19, 2013.

COLLINS, W. E.; JEFFERY, G. M. *Plasmodium malariae*: Parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 4, p. 579–592, 2007.

COSTA, D. C. *et al.* Submicroscopic malaria parasite carriage: How reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 1, p. 21–28, 2014.

COSTA, M. R. F. *et al.* Performance of an immuno-rapid malaria Pf/Pv rapid diagnostic test for malaria diagnosis in the western Brazilian amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, p. 1-5, 2019.

COURA, J. R.; SUÁREZ-MUTIS, M.; LADEIA-ANDRADE, S. A new challenge for malaria control in Brazil: Asymptomatic *Plasmodium* infection - a Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 3, p. 229-237, 2006.

COWMAN, A. F. *et al.* The Molecular Basis of Erythrocyte Invasion by Malaria Parasites. *Cell Host and Microbe*, v. 22, n. 2, p. 232–245, 2017.

CUNNINGHAM, J. *et al.* A review of the WHO malaria rapid diagnostic test product testing programme (2008-2018): Performance, procurement and policy. *Malaria Journal*, v. 18, n. 387, p. 1-15, 2019.

CYBULSKI, J. S.; CLEMENTS, J.; PRAKASH, M. Foldscope: Origami-based paper microscope. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, p. 1-11, 2014.

DA SILVA JUNIOR, G. B. *et al.* Kidney involvement in malaria: An update. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 59, p. 1–6, 2017.

DAS, A *et al.* Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. *Molecular and cellular probes*, v. 9, n. 3, p.

161-165, 1995.

DASANNA, A. K. *et al.* Rolling Adhesion of Schizont Stage Malaria-Infected Red Blood Cells in Shear Flow. *Biophysical Journal*, v. 112, n. 9, p. 1908-1919, 2017.

DE ALVARENGA, D. A. M. *et al.* Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malaria Journal*, v. 14, n. 81, p. 1–9, 2015.

DE ALVARENGA, D. A. M. *et al.* An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Scientific Reports*, v. 8, n. 86, p. 1–10, 2018.

DE ARRUDA, M. E. Presença do *Plasmodium brasilianum* em macacos capturados na área de enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Pará. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, n. 30, p. 367-369, 1985.

DE ARRUDA, M. *et al.* Sero-epidemiological studies of malaria in Indian tribes and monkeys of the Amazon Basin of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 41, n. 4, p. 379–385, 1989.

DE BARROS, F. S. M. *et al.* Distribution summaries of malaria vectors in the northern Brazilian Amazon. *Journal of vector ecology*, v. 32, n. 2, p. 161–167, 2007.

DEANE, L. M. *et al.* *Anopheles (Kerteszia) cruzi*, a natural vector of the monkey malaria parasites, *Plasmodium simium* and *Plasmodium brasilianum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 64, n. 4, p. 647, 1970.

DEANE, L. M. *Simian malaria in Brazil*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 87, n. Suppl. III, p. 1-20, 1992.

DEMAS, A. *et al.* Applied genomics: Data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 7, p. 2411–2418, 2011.

DGESI/SESAI. *Distritos Sanitários Especiais Indígenas (DSEIs)*. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-indigena/saneamento-e-edificacoes/dseis>>.

DO NASCIMENTO, J. A. A.; GUIMARÃES, L. M.; CARVALHO-COSTA, F. A. Malaria epidemiology in the state of Piauí, Northeastern Brazil: A retrospective study with secondary data. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 1, p. 99–103, 2016.

ERDMAN, L. K.; KAIN, K. C. Molecular diagnostic and surveillance tools for global malaria control. *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 6, n. 1-2, p. 82-99, 2008.

FÄRNERT, A. *et al.* Duration of residency in a non-endemic area and risk of severe malaria in African immigrants. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 21, n. 5, p. 494–501, 2015.

- FEACHEM, R. G. *Shrinking the Malaria Map*, p. 1-66, 2009.
- FELGER, I. *et al.* The Dynamics of Natural *Plasmodium falciparum* Infections. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. 1–10, 2012.
- FIGUEIREDO, M. A. P. *et al.* Molecular identification of *Plasmodium spp.* and blood meal sources of anophelines in environmental reserves on São Luís Island, state of Maranhão, Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 10, n. 203, p. 1-9, 2017.
- FONTES, C. J. F.; BATHURST, I.; KRETTLI, A. U. *Plasmodium vivax* sporozoite antibodies in individuals exposed during a single malaria outbreak in a non-endemic area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 44, n. 1, p. 28–33, 1991.
- FRASER, B. Data reveal state of Venezuelan health system. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 389, n. 10084, p. 2095, 2017.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Relatório Técnico da Malária - Distrito Sanitário Yanomami. Manaus, 2006.
- GENTON, B. *et al.* *Plasmodium vivax* and mixed infections are associated with severe malaria in children: A prospective cohort study from Papua New Guinea. *PLoS Medicine*, v. 5, n. 6, p. 881-889, 2008.
- GIBNEY, E. Brazilian science paralysed by economic slump Bacteria yield new gene cutter. *Nature in focus*, v. 526, p. 16–17, 2015.
- GOMES, A. P. *et al.* Malária grave por *Plasmodium falciparum*. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 23, n. 3, 2011.
- GONZALES, G. Giemsa Staining of Malaria Blood Films. *Malaria Microscopy Standard Operating Procedure*, 2016.
- GRANDE, R. *et al.* A case of *Plasmodium malariae* recurrence, recrudescence or reinfection? *Malaria Journal*, v. 18, n. 169, p. 1–9, 2019.
- GRENFELL, P. *et al.* Anaemia and malaria in Yanomami communities with differing access to healthcare. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 7, p. 645–652, 2008.
- GRILLET, M. E. *et al.* Review Venezuela’s humanitarian crisis , resurgence of vector-borne diseases , and implications for spillover in the region. *Lancet Infect Dis*, v. 19, n. 5, p. 149–161, 2019.
- GROGER, M. *et al.* A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human *Plasmodium ovale* malaria. *Malaria Journal*, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2017.
- GUERRA, C. A. *et al.* The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 8, p. 1-11,

2010.

GUIMARÃES, L. O. *et al.* The genetic diversity of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from human, simian and mosquito hosts in Brazil. *Acta Tropica*, v. 124, n. 1, p. 27-32, 2012.

GUIMARÃES, L. O. *et al.* Merozoite surface protein-1 genetic diversity in *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from Brazil. *BMC Infectious Diseases*, v. 15, n. 529, p. 1–11, 2015.

GUTTERY, D. S. *et al.* A Unique Protein Phosphatase with Kelch-Like Domains (PPKL) in *Plasmodium* Modulates Ookinete Differentiation, Motility and Invasion. *PLoS Pathogens*, v. 8, n. 9, p. 1-15, 2012.

HÄNSCHIED, T. Diagnosis of malaria: A review of alternatives to conventional microscopy. *Clinical and Laboratory Haematology*, v. 21, n. 4, p. 235-245, 1999.

HÄNSCHIED, T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 9, n. 6, p. 497-504, 2003.

HASHIMOTO, M. *et al.* In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of *Plasmodium* species in wide-range thin blood smears. *Malaria Journal*, v. 17, n. 235, p. 1–7, 2018.

HOFMANN, N. E. *et al.* Ultra-Sensitive Detection of *Plasmodium falciparum* by Amplification of Multi-Copy Subtelomeric Targets. *PLoS Medicine*, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2015.

HOFMANN, N. E. *et al.* Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 10, p. 1108-1116, 2018.

HOWES, R. E. *et al.* Global epidemiology of *Plasmodium vivax*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. Suppl. 6, p. 15–34, 2016.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: Knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 9, p. 573–587, 2015.

JOSTE, V. *et al.* Distinction of *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation. *Scientific Reports*, v. 8, n. 300, p. 1–8, 2018.

KAMAU, E. *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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 8, p. 2946–2953, 2011.

KATSURAGAWA, T. H. *et al.* The dynamics of transmission and spatial distribution of malaria in riverside areas of Porto Velho, Rondônia, in the Amazon Region of

Brazil. *PLoS ONE*, v. 5, n. 2, p. 1-12, 2010.

KIM, S. *et al.* Malaria rapid diagnostic test as point-of-care test: Study protocol for evaluating the VIKIA® Malaria Ag Pf/Pan. *Malaria Journal*, v. 14, n. 114, p. 1-8, 2015.

KIRCHGATTER, K. *et al.* Lethal malaria caused by *Plasmodium malariae* in a splenic patient in Brazil. *British Medical Journal*, v. 331, p. 576, 2005.

KOEPFLI, C. *et al.* Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Scientific Reports*, v. 6, n. 39183, p. 1–7, 2016.

KOJOM, L. P.; SINGH, V. Prevalence of *Plasmodium falciparum* field isolates with deletions in histidine-rich protein 2 and 3 genes in context with sub-Saharan Africa and India: A systematic review and meta-analysis. *Malaria Journal*, v. 19, n. 46, p. 1–14, 2020.

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

KROTOSKI, W. A. The hypnozoite and malarial relapse. *Prog Clin Parasitol*, v. 1, p. 1–19, 1989.

KUBISTA, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LADEIA-ANDRADE, S. *et al.* Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the amazon basin of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 3, p. 452–459, 2009.

LAL, A. A. *et al.* Ribosomal RNA-based diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 36, n. 1, p. 67–71, 1989.

LALREMRUATA, A. *et al.* Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*, v. 2, n. 9, p. 1186–1192, 2015.

LASERSON, K. F. *et al.* Use of the Polymerase Chain Reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 50, n. 2, p. 169-180, 1994.

LASERSON, K. F. *et al.* Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, n. 5, p.767-773, 1999.

LEANDRO-REGUILLO, P. *et al.* Urban and architectural risk factors for malaria in indigenous Amazonian settlements in Brazil: A typological analysis. *Malaria Journal*, v. 14, n. 284, p. 1–14, 2015.

LIMONGI, J. E. *et al.* Malaria outbreaks in a non-endemic area of Brazil, 2005.

- Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 3, p. 232–237, 2008.
- LIU, Q. *et al.* Sequence variation in the small-subunit rRNA gene of *Plasmodium malariae* and prevalence of isolates with the variant sequence in Sichuan, China. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 11, p. 3378-3381, 1998.
- LLOYD, Y. M. *et al.* PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial cox3 and varATS primers. *Tropical Medicine and Health*, v. 46, n. 22, p. 1–6, 2018.
- LORENZ, C. *et al.* Spatial and temporal epidemiology of malaria in extra-Amazonian regions of Brazil. *Malaria Journal*, v. 14, n. 408, p. 1-13, 2015.
- LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, v. 63, n. 3998, p. 1-14, 2012.
- MACHADO, R. L. D. *et al.* Malária em região extra-Amazônica: Situação no Estado de Santa Catarina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 5, p. 581–586, 2003.
- MALLERE, B. *et al.* *Plasmodium vivax*: restricted tropism and rapid remodeling of CD71-positive reticulocytes. *Red Cells, Iron, And Erythropoiesis*, v. 125, n. 8, p. 1314–1325, 2015.
- MALPARTIDA-CARDENAS, K. *et al.* Quantitative and rapid *Plasmodium falciparum* malaria diagnosis and artemisinin-resistance detection using a CMOS Lab-on-Chip platform. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 145, n. 111678, p. 1-11, 2019.
- MANGOLD *et al.* Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 5, p. 2435–2440, 2005.
- MARCANO, T. J. *et al.* Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 4, p. 369-376, 2004.
- MARQUES, A. C. Human migration and the spread of malaria in Brazil. *Parasitology Today*, v. 3, n. 6, p. 166-170, 1987.
- MARSH, K; KINYANJUI. S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology*, v. 28, n. 1-2, p. 51-60, 2006.
- MARTÍN-DÁVILA, P. *et al.* Donor-derived multiorgan transmission of mixed *P. malariae* and *P. ovale* infection: Impact of globalization on post-transplant infections. *Transpl Infect Dis*, v. 20, n. 5, p. 1-7, 2018.
- MATO, S. P. Anemia and malaria in a Yanomami amerindian population from the southern Venezuelan Amazon. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 59, n. 6, p. 998–1001, 1998.

MAYOR, A.; ALANO, P. Bone marrow reticulocytes: a *Plasmodium vivax* affair? *Red Cells, Iron, And Erythropoiesis*, v. 125, n. 8, p. 1203–1206, 2015.

MCCREESH, P. *et al.* Subpatent malaria in a low transmission African setting: A cross-sectional study using rapid diagnostic testing (RDT) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from Zambezi region, Namibia. *Malaria Journal*, v. 17, n. 480, p. 1–11, 2018.

MCKENZIE, F. E.; JEFFERY, G. M.; COLLINS, W. E. *Plasmodium malariae* Blood-Stage Dynamics. *Journal of Parasitology*, v. 87, n. 3, p. 626-637, 2001.

MEIS, J. F. *et al.* A scanning electron microscopic study of the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles stephensi*. *Acta tropica*, v. 50, n. 3, p. 227-236, 1992.

METZGER, W. G. *et al.* Malaria diagnosis under field conditions in the Venezuelan Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 1, p. 20–24, 2008.

METZGER, W. G. *et al.* A rapid malaria appraisal in the venezuelan amazon. *Malaria Journal*, v. 8, n. 291, p. 1-14, 2009.

MIDEO, N. *et al.* The Cinderella syndrome: Why do malaria-infected cells burst at midnight? *Trends in Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 10–16, 2013.

MODY, R. M. *et al.* The Remote Diagnosis of Malaria Using Telemedicine or E-Mailed Images. *Military Medicine*, v. 171, n. 12, p. 1167–1171, 2006.

MONDOLFI, A. E. P. *et al.* Venezuela's upheaval threatens Yanomami The. *Science*, v. 365, n. 6455, p. 766, 2019.

MOTA, M. M. *et al.* Migration of *Plasmodium* Sporozoites Through Cells Before Infection. *Science*, v. 291, n. 5501, p. 141-144, 2001.

MOTA, M. M.; RODRIGUEZ, A. Migration through host cells: The first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 12, p. 1113-1118, 2004.

MUELLER, I.; ZIMMERMAN, P. A.; REEDER, J. C. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* - the “bashful” malaria parasites. *Trends in Parasitology*, v. 23, n. 6, p. 278-283, 2007.

MUELLER, I. *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 9, n. 9, p. 555-566, 2009.

MURRAY, C. K.; BENNETT, J. W. Rapid diagnosis of malaria. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, p. 1-7, 2009.

MUSSA, A. *et al.* Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests.

BMC Research Notes, v. 12, n. 334, p. 1-5, 2019.

NEVEU, G.; LAVAZEC, C. Erythrocyte Membrane Makeover by *Plasmodium falciparum* Gametocytes. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 2652, p. 1–8, 2019.

NGUYEN, T. N. *et al.* The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 5, p. 565–572, 2018.

NIÑO, C. H. *et al.* *Plasmodium malariae* in the Colombian Amazon region: You don't diagnose what you don't suspect. *Malaria Journal*, v. 15, n. 576, p. 1–10, 2016.

NTUMNGIA, F. B. *et al.* An engineered vaccine of the *Plasmodium vivax* Duffy binding protein enhances induction of broadly neutralizing antibodies. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

OKELL, L. C. *et al.* The potential contribution of mass treatment to the control of *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. 1-11, 2011.

OKELL, L. C. *et al.* Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Communications*, v. 3, n. 1237, p. 1–9, 2012.

OLIVEIRA, C. S. DE; LOTUFO NETO, F. Suicídio entre povos indígenas: um panorama estatístico brasileiro. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*, v. 30, n. 1, p. 4–10, 2003.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. *Malaria Journal*, v. 9, n. 115, p. 1-15, 2010.

OLSSON, M. L. *et al.* A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*, v. 38, n. 2, p. 168–173, 1998.

ONG, C. W. M. *et al.* Case report: Monkey malaria in humans: A diagnostic dilemma with conflicting laboratory data. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 80, n. 6, p. 927-928, 2009.

PAGE, K. R. *et al.* Venezuela's public health crisis: a regional emergency. *The Lancet*, v. 393, n. 10177, p. 1254–1260, 2019.

PAYNE, D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 66, n. 5, p. 621–626, 1988.

PHILLIPS, M. A. *et al.* Malaria. *Nature Reviews*, v. 3, n. 17050, p. 1–24, 2017.

PINA-COSTA, A. *et al.* Malaria in Brazil: what happens outside the Amazonian endemic region. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 109, n. 5, p. 618–633, 2014.

PITHAN, O. A.; CONFALONIERI, U. E. C.; MORGADO, A. F. A situação de saúde dos índios Yanomámi: diagnóstico a partir da casa do índio de Boa Vista, Roraima, 1987 - 1989. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 7, n. 4, p. 563–580, 1991.

POMARI, E. *et al.* Digital PCR: a new technology for diagnosis of parasitic infections. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 12, p. 1510–1516, 2019.

PONCE, C. *et al.* Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for screening patients with imported malaria in a non-endemic setting. *Parasite*, v. 24, n. 53, p. 1-10, 2017.

PROUX, S. *et al.* Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. *Malaria Journal*, v. 10, n. 323, p. 1-8, 2011.

QUADT, K. A. *et al.* The Density of Knobs on *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes Depends on Developmental Age and Varies among Isolates. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. 1-8, 2012.

RANADIVE, N. *et al.* Limitations of rapid diagnostic testing in patients with suspected malaria: A diagnostic accuracy evaluation from Swaziland, a low-endemicity country aiming for malaria elimination. *Clinical Infectious Diseases*, v. 64, n. 9, p. 1221–1227, 2017.

RAYNER, J. C. *Plasmodium malariae* Malaria: From Monkey to Man? *EBioMedicine*, v. 2, n. 9, p. 1023–1024, 2015.

RECHT, J. *et al.* Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: Current challenges in malaria control and elimination. *Malaria Journal*, v. 16, n. 1, p. 1–18, 2017.

ROSANAS-URGELL, A. *et al.* Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malaria Journal*, v. 9, n. 361, p. 1-8, 2010.

ROSS, A. *et al.* The Incidence and Differential Seasonal Patterns of *Plasmodium vivax* Primary Infections and Relapses in a Cohort of Children in Papua New Guinea. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 5, p. 1–18, 2016.

ROUGEMONT, M. *et al.* Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5636-5643, 2004.

ROVIRA-VALLBONA, E. *et al.* Predominance of asymptomatic and sub-microscopic infections characterizes the *Plasmodium* gametocyte reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2017.

RUSSELL, N. K. *et al.* HIV, syphilis, and viral hepatitis among Latin American indigenous peoples and Afro-descendants: A systematic review. *Revista Panamericana de Salud Pública/Pan American Journal of Public Health*, v. 43, p. 1–13, 2019.

SÁ, D. R. *et al.* Malaria Epidemiology in the Pakaanóva (Wari') Indians, Brazilian Amazon. *Epidémiologie*, v. 98, n. 1, p. 28-32, 2005.

SÁNCHEZ-RIBAS, J. Aspectos ecológicos da transmissão da malária em área indígena Yanomami, Brasil. Tese apresentada a Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz - Rio, 2015.

SÁNCHEZ-RIBAS, J. *et al.* New classification of natural breeding habitats for neotropical anophelines in the yanomami indian reserve, Amazon region, Brazil and a new larval sampling methodology. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 6, p. 760–770, 2015.

SÁNCHEZ-RIBAS, J. *et al.* Environmental variables associated with anopheline larvae distribution and abundance in Yanomami villages within unaltered areas of the Brazilian Amazon. *Parasit & Vectors*, v. 10, n. 571, p. 1–15, 2017.

SANTELLI, A. C. F. E S. *et al.* Plano de eliminação de malária no Brasil, p. 1-38, 2016.

SCURACCHIO, P. *et al.* Transfusion-transmitted malaria: case report of asymptomatic donor harboring *Plasmodium malariae*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 1, p. 55–59, 2011.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Ministério da Saúde (MS). Programa Nacional de Prevenção e Controle da Malária - PNCM, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Ministério da Saúde (MS). Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. 2ª ed, Brasília, 2009.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Ministério da Saúde (MS). Guia de tratamento da malária no Brasil, Brasília, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). Ministério da Saúde (MS). Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2019.

SHAILAJA, M. *et al.* Malaria parasite detection-Employability of foldscope in malarial diagnosis. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, v. 6, n. 12, p. 248-255, 2019.

SHANKS, G. D. Historical review: Does falciparum malaria destroy isolated tribal populations? *Travel Medicine and Infectious Disease*, v. 14, n. 6, p. 646–651, 2016.

SILVINO, A. C. R. *et al.* Variation in Human Cytochrome P-450 Drug-Metabolism Genes: A Gateway to the Understanding of Plasmodium vivax Relapses. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. 1-14, 2016.

SINNIS, P; ZAVALA, F. The Skin: Where Malaria Infection and the Host Immune Response Begin. *Semin Immunopathol.*, v. 34, n. 6, p. 787–792, 2012.

SIQUEIRA, A. M. *et al.* Plasmodium vivax landscape in Brazil: Scenario and challenges. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. Suppl. 6, p.

87–96, 2016.

SLATER, H. C. *et al.* The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nature Communications*, v. 10, n. 1433, p. 1-16, 2019.

SNOUNOU, G. *et al.* High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 61, n. 2, p. 315–320, 1993.

SNOW, R. W. *et al.* The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, v. 434, n. 7030, p. 214-217, 2005.

SRISUTHAM, S. *et al.* Four human *Plasmodium* species quantification using droplet digital PCR. *PLoS ONE*, v. 12, n. 4, p. 1–16, 2017.

STURM, A. *et al.* Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, v. 313, n. 5791, p. 1287-1290, 2006.

TADESSE, F. G. *et al.* The shape of the iceberg: Quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malaria Journal*, v. 16, n. 99, p. 1–11, 2017.

TAUIL, P. The prospect of eliminating malaria transmission in some regions of Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. Suppl. I, p. 105-106, 2011.

TAVARES, F. G.; FERREIRA, A. A. The health of indigenous children and adolescents in Latin America. *Cadernos de Saude Publica*, v. 35, n. Suppl. III, p. 1-3, 2019.

TAYLOR, B. J. *et al.* A lab-on-chip for malaria diagnosis and surveillance. *Malaria Journal*, v. 13, n. 179, p. 1-10, 2014.

TAZI, L.; AYALA, F. J. Unresolved direction of host transfer of *Plasmodium vivax* v. *P. simium* and *P. malariae* v. *P. brasilianum*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, n. 1, p. 209–221, 2011.

TWOHIG, K. A. *et al.* Growing evidence of *Plasmodium vivax* across malaria-endemic Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 1, p. 1–16, 2019.

VEGA, C. M.; ORELLANA, J. D. Y.; BASTA, P. C. Human Mercury Exposure in Yanomami Indigenous Villages from the Brazilian Amazon. *International Journal of Environmental Research and Public Health Article*, v. 15, n. 1051, p. 1–13, 2018.

VERHAGEN, L. M. *et al.* High Malnutrition Rate in Venezuelan Yanomami Compared to Warao Amerindians and Creoles: Significant Associations WITH Intestinal Parasites and Anemia. *PLoS ONE*, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

VINETZ, J. *et al.* *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-years old greek woman with splenomegaly. *New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 6, p.

367-371, 1998.

VLACHOU, D. *et al.* The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 16, n. 4, p. 384–391, 2006.

WAHLGREN, M.; GOEL, S.; AKHOURI, R. R. Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 8, p. 479–491, 2017.

WALKER, W. S. *et al.* The role of forest conversion, degradation, and disturbance in the carbon dynamics of Amazon indigenous territories and protected areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 6, p. 3015–3025, 2020.

WHITE, M. T. *et al.* *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infection dynamics: Re-infections, recrudescences and relapses. *Malaria Journal*, v. 17, n. 170, p. 1–15, 2018.

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, n. 2, p. 172-173, 2008.

WHITE, N. J. *et al.* Malaria. *Lancet*, v. 383, n. 9918, p. 723-735, 2014.

WHO. Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030. Geneva: World Health Organization, 2015.

WHO. Malaria Policy Advisory Committee: Meeting report of the WHO Evidence Review Group on Low-Density Malaria Infections. Geneva: World Health Organization, 2017b.

WHO. Malaria Terminology. Geneva: World Health Organization, 2016b.

WHO. World Malaria Report 2016. Geneva: World Health Organization, 2016a.

WHO. World Malaria Report 2017. Geneva: World Health Organization, 2017a.

WHO. World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization, 2019.

WONG, Y. P. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, n. 3, p. 626–643, 2017.

WONGSRICHANALAI, C. *et al.* A review of malaria diagnostic tools: Microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. Suppl. 6, p. 119-127, 2007.

YAMAUCHI, L. M. *et al.* *Plasmodium* sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 1215-1222, 2007.

YANG, F. *et al.* Deep Learning for Smartphone-based Malaria Parasite Detection in

Thick Blood Smears. *Journal of Biomedical and Health Informatics*, v. 24, n. 5, p. 1427-1438, 2019.

ZAW, M. T.; LIN, Z. Two sympatric types of *Plasmodium ovale* and discrimination by molecular methods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 50, n. 5, p. 559–564, 2017.

ZIELER, H.; DVORAK, J. A. Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 21, p. 11516–11521, 2000.

ANEXO I



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONEP Nº 002/2014

Registro CONEP 16907 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0061.0.011.000-11

Processo nº 25000.103896/2012-51

Projeto de Pesquisa: "A *Oncocercose* e as *co-infecções* em área Yanomami"

Pesquisador Responsável: Marilza Maia Herzog

Instituição: FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - RJ (**CENTRO ÚNICO**)

CEP de origem:

Área Temática Especial: Populações Indígenas e Biossegurança

Patrocinador: FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz - RJ

Sumário geral do protocolo

Introdução/histórico do projeto: As doenças infecciosas e parasitárias não ocorrem isoladamente no mundo, sendo endêmicas e prevalentes nas regiões tropicais. Geralmente negligenciadas, no contexto social estas doenças são típicas de comunidades remotas com pouca visibilidade social, onde não há saneamento básico e assistência médica regular.

Para as comunidades indígenas brasileiras o acesso à "boa assistência sanitária" tem sido problemático, um exemplo clássico é a complicada logística para a assistência à população Yanomami. Esta população está restrita a uma área remota imensa, localizada nos estados de Roraima e do Amazonas em fronteira contínua com a Venezuela. O lado brasileiro ocupa 9.419.108hec em região de grandes altitudes de solo riquíssimo em jazidas minerais, recoberta por densa floresta tropical úmida, cortada por farta rede hidrográfica. Até a década de 60 os Yanomamis viveram praticamente isolados. No entanto, a partir da década de 70, com a divulgação da larga existência de ouro e cassiterita, os Yanomamis começam a sofrer com a invasão garimpeira. Através deste processo, na década de 80, a malária já estava introduzida dizimando a população em quase 15%. A distância somada às condições geográficas locais dificultam as ações de saúde e a fiscalização e/ou vigilância de invasão ilegal. No Brasil o processo de invasão da área Yanomami se propagou livremente até 1989 e perdura ainda hoje, apesar da homologação da área pela União como Terra Indígena Yanomami em 1992. O isolamento geográfico foi perdido gradativamente, através de invasões procedentes de diversos locais do Brasil e da Venezuela causando a introdução e a disseminação generalizada de doenças infecto-transmissíveis, até então não incidentes entre os Yanomamis.

No Brasil, não existem dados de prevalência da co-infecção humana dessas endemias e nem dados que relatem a ocorrência de alterações na história natural dessas patologias quando se encontram associadas. A transmissão dessas doenças está relacionada à população susceptível, ao agente etiológico e ao vetor, além das condições ecológicas, geográficas, econômicas, sociais e culturais. Devido a sua ampla incidência e aos efeitos debilitantes, essas doenças são as que mais contribuem para reduzir a capacidade produtiva das pessoas de desenvolver seus recursos econômicos.

A oncocercose humana é uma doença infecto-parasitária presente na África, Península Arábica e nas Américas. O padrão de distribuição da doença é diferente nos

Cont. Parecer CONEP nº. 002/2014

Continentes Africano e Americano. No Continente Africano possui uma larga distribuição geográfica, por outro lado, no Continente Americano a doença é focal, sendo evidenciada em pequenas áreas situadas em seis países. A sua ocorrência obedece à tríade tradicional de transmissão onde em uma extremidade está presente o filarídeo *Onchocerca volvulus* como seu agente etiológico, na outra o homem como hospedeiro vertebrado, e na última, espécies do gênero *Simulium* como hospedeiro invertebrado (vetor). A dispersão ocorre sem sintomatologia notável, sendo detectada com a determinação de seus sinais específicos, como por exemplo, a gerodermia, os quais ocorrem após pelo menos dois anos e meio de infecção do paciente visto que este é o período de vida das microfírias. Além disso, a infecção é cumulativa, portanto a severidade da doença depende do tempo de exposição ao vetor, que determina a densidade de microfírias na pele. As microfírias são responsáveis por lesões da pele e pela invasão do globo ocular, onde produzem graves alterações da retina e dos meios transparentes que podem conduzir à cegueira.

Embora a oncocercose não seja uma doença letal, seu impacto socioeconômico é muito grande e extremamente relevante em termos de saúde pública. Seu efeito mais grave é a cegueira irreversível, mas as dermatopatias também constituem grande problema. O foco principal de oncocercose no Brasil está localizado no norte do País nos Estados do Amazonas e Roraima, fronteira com a Venezuela, habitada por uma população de aproximadamente 15.000 indígenas Yanomamis do lado do território brasileiro.

Considerando que nas áreas endêmicas de oncocercose, a população também esta exposta a mansonelose, tracoma, malária, hepatites virais e enteroparasitoses, a nossa hipótese é que a co-infecção exista e que essa interação possa causar alterações no equilíbrio entre a resposta imune e a evolução clínica do hospedeiro infectado.

Estudos genéticos também têm contribuído muito para o entendimento da patogênese das doenças infecciosas. Vários alelos HLA e KIR têm sido associados com a evolução clínica de doenças, sendo alguns alelos favoráveis à cura e outros à evolução clínica para forma grave da doença. Portanto é importante levar em consideração a influência dos marcadores genéticos na evolução clínica, no poliparasitismo, das doenças estudadas e na resposta imune do hospedeiro. Dentro deste contexto, a caracterização do perfil genético de HLA e KIR da população será essencial para avaliarmos o papel destas moléculas na patogênese das doenças estudadas e na resposta imune aos seus patógenos, bem como nas relações entre elas. O conhecimento de fatores/marcadores genéticos que influenciem na evolução/prognóstico das infecções e coinfeções na população Yanomami será de grande valia para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas mais eficazes.

Vale ressaltar que mesmo que os casos de co-infecção não sejam detectados na área de estudo, o diagnóstico e tratamento dos casos de todas estas doenças irão contribuir para a melhoria na saúde da população local e para implantação de medidas de controle integradas levando em consideração a ocorrência destas endemias em uma mesma área. Os dados obtidos através deste projeto serão publicados independente dos resultados encontrados.

Objetivos: Conduzir um estudo descritivo de casos de Onconercose, Mansonelose, Tracoma, Malária, Hepatites e Enteroparasitoses com o objetivo de investigar os aspectos clínico-epidemiológicos e imunológicos mais importantes nessas enfermidades, na associação entre elas e o impacto de uma infecção sobre a evolução clínica da outra na área Yanomami.

Métodos: Os profissionais da equipe de saúde do DSEI-Yanomami de dois dos Pólos Base de Saúde selecionados, dentre os das Aldeias - Auaris, Parafuri, Toototobi e Balawau - serão os profissionais que executarão os procedimentos das coletas de sangue e dos fragmentos de pele dos sujeitos da pesquisa. Os exames Clínicos serão efetuados

Cont. Parecer CONEP nº. 002/2014

pelos médicos do DSEI-Yanomami (quando pertinente os médicos clínico e oftalmologista do projeto - verificação da existência de nódulos, alterações de pele, prurido, ou qualquer outro sinal ou sintoma ligados a oncocercose, mansonelose, tracoma, malária, hepatites e enteroparasitoses - executarão os exames assistidos pelos médicos do DSEI-Yanomami). Tanto os procedimentos das coletas de sangue e dos fragmentos de pele e os exames clínicos dos sujeitos da pesquisa serão acompanhados pelos participantes do projeto, para a anotação dos dados pertinentes. Todo e qualquer caso de doença ou agravo diagnosticado pelos profissionais do projeto serão repassados por comunicação oral e escrita para a SESAI/DSEI-Yanomami, órgãos responsáveis pelo acompanhamento e tratamento dos casos diagnosticados nos sujeitos da pesquisa.

Critérios de inclusão/exclusão: Critérios de exclusão - indivíduos que por qualquer motivo se recusarem a fazer os testes, portadores de doenças neurológicas, gestantes, parturientes, crianças que não atinjam os três critérios de inclusão preconizados pela PBEO/OEPA - idade maior ou igual a cinco anos, altura maior ou igual a noventa centímetros ou peso maior ou igual a quinze quilogramas e qualquer adulto acometido de grave doença que esteja em estado de prostração.

Critérios de inclusão - indivíduos residentes das aldeias selecionadas que aceitem voluntariamente a participar do estudo e não façam parte do grupo de exclusão. Entretanto para a avaliação de prevalência e verificação de incidência da malária e da mansonelose utilizaremos material cedido pelo DSEI-Yanomami da busca ativa e passiva dos casos de malária realizados mensalmente através da gota espessa e esfregaço sanguíneo em todos os indivíduos independente da idade (pulsão digital e uma gota de sangue é colocada na lâmina). A cada três meses por dois anos, no momento da coleta uma pequena gota de sangue a mais será colocada em papel de filtro para fazer o diagnóstico por PCR (mais sensível). As amostras obtidas serão mantidas e transportadas para o LSO-IOC/Fiocruz-RJ, em caixas térmicas com sílica.

Riscos/Benefícios: O protocolo afirma não existirem riscos. Em relação aos benefícios, no TCLE lê-se "Com a exceção da malária, as outras doenças não são diagnosticadas com facilidade, e isto traz problemas para o controle delas na região. Com o diagnóstico poderei ser tratado ou encaminhado a uma unidade de saúde para cuidar do meu caso. Além disto, alguns trabalhos têm mostrado que se uma pessoa tiver mais de um parasita produzindo doença ao mesmo tempo, algumas vezes as doenças podem apresentar maior dificuldade para serem curadas pelos remédios. Já é conhecido que algumas células e reações do corpo (imunológicos) são importantes no desenvolvimento das doenças. No entanto, mais estudos são necessários para tentar conhecer o seu papel na cura ou na proteção".

Destinação das amostras: "As amostras de sangue venoso e fragmento de pele serão coletadas uma vez por ano, pelo período de dois anos. Inicialmente serão mantidas sob guarda do Laboratório de Simulídeos e Onconercose/IOC, posteriormente será distribuída uma alíquota de sangue/plasma para cada coordenador temático para realização dos exames e esta ficará sob guarda dos mesmos pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados" (p.12/26 da 2ª versão Projeto Protocolo 638-11).

Local de realização

Trata-se de um projeto nacional e unicêntrico. No mundo, o total de sujeitos de pesquisa é de 500.

Apresentação do protocolo

Cont. Parecer CONEP nº. 002/2014

Os seguintes documentos foram apresentados no CD-ROM do protocolo em tela: Termos de Compromisso e Responsabilidade: Acordo de Submissão de Projeto - Diretor do IOC; Carta de Compromisso e Responsabilidade do Colaborador no Projeto - João B.F. Vieira; Termo de Compromisso e Responsabilidade do Colaborador no Projeto - Maria G. R. Freitas; Termo de Compromisso e Responsabilidade do Colaborador no Projeto - Nildimar H. Rocha. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Corrigido) - 2ª versão; Protocolo enumerado - 2ª versão; Questionário de Adesão; Folha de Rosto; Currículo; Pareceres do CEP: Parecer 26dez11 Com Pendência; Parecer 28fev12 Aprovado e Encaminhado;

Os seguintes documentos foram apresentados no CD-ROM de respostas ao parecer 363/2012 da CONEP: Ofício 2036/2012/CONEP/CNS/MS; Parecer 363/2012 CONEP, de 26 de dezembro de 2012; Carta PI ao CEP FIOCRUZ/IOC; Resposta do PI às pendências mencionadas no Parecer CONEP 363/2012, (Resposta ao Parecer CONEP 363/2012); 3ª Versão Formulário CEP, protocolo 638/11, Registro CONEP 16907; 3ª versão projeto registro CONEP 16907; Termos de Compromisso e Responsabilidade: Carta de Compromisso SESAI-MS - carta 1; Carta de Compromisso SESAI-MS - carta 2; Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e de Assentimento: TCLE Pais-Responsáveis Registro CONEP 16907; TCLE - Termo Consentimento Livre e Esclarecido Registro CONEP 16907; Termo de Assentimento Registro CONEP 16907.

Comentários/Considerações:

1. Projeto de Pesquisa:

- a. Solicita-se apresentação do modelo de amostragem (aleatorização) e justificativa do tamanho da amostra.

Resposta: Acrescentamos o cálculo amostral e o modelo de amostragem no projeto (pag 10 item 4. Coleta de amostras - em amarelo):

Análise: Pendência atendida.

- b. Não está citada as faixas etárias a serem observadas e na página 9-31 os pesquisadores citam “no caso de criança os pais ou responsável legal farão a assinatura digital”. Solicita-se esclarecimentos quanto à faixa etária a ser incluída na pesquisa. Se o projeto incluir menores de 18 anos, devem ser incluídos nos documentos os Termos de Assentimento para menores entre 7 e 12 anos e entre 12 e 18 anos, além dos Termos de Consentimento para Pais/Responsáveis.

Resposta: Página 10 (critérios de exclusão – em amarelo): No grupo de exclusão do formulário mencionamos que serão excluídas as crianças que não atinjam os três critérios de inclusão preconizados pelo Programa Brasileiro de Eliminação da Oncocercose (PBEO) / Programa para Eliminação da Oncocercose das Américas (OEPA) - idade maior ou igual há cinco anos, altura maior ou igual a noventa centímetros ou peso maior ou igual a quinze quilogramas e qualquer adulto acometido de grave doença que esteja em estado de prostração. Portanto, a faixa etária vai ser crianças com idade entre 5-18 anos e adultos que atendam aos critérios acima definidos. Na oncocercose e na malária, a aquisição de imunidade a infecção está associada a idade, portanto será importante a coleta de sangue da faixa etária entre 5-18 anos para compararmos com a faixa de adultos e assim verificar a prevalência de infecção e resposta imune nas diferentes faixas etária. Acrescentamos em anexo os seguintes termos de consentimento: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para Pais/Responsáveis) e Termo de Assentimento.

Análise: Pendência atendida.

Cont. Parecer CONEP n°. 002/2014

2. Em relação ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

- a. Está redigido em forma de declaração. O documento de consentimento deve seguir a terminologia da Resolução CNS 196/96, item IV, e ser apresentado ao sujeito da pesquisa em forma de convite. Expressões do tipo “Eu sei...”, “Eu fui...”, entre outras, podem comprometer a autonomia do indivíduo. Cabe ao pesquisador informar todos os procedimentos do estudo e as garantias do sujeito da pesquisa para, ao final, solicitar sua anuência. Solicita-se adequação.
Resposta: Adequamos o texto dos Termos de Consentimento (em anexo) de acordo com a terminologia da Resolução CNS 196/96, item IV, em forma de convite.
Análise: Pendência atendida.
- b. Foram apresentados os procedimentos relacionados aos exames de visão, de sangue, de pele e de fezes, porém não são apresentados os seus respectivos objetivos. Solicitam-se apresentações claras e sucintas dos objetivos dos exames a serem feitos.
Resposta: Reformulamos o texto para apresentar os procedimentos e os seus respectivos objetivos de maneira clara e sucinta (ver os termos de consentimento em anexo em amarelo para cada exame).
Análise: Pendência atendida.
- c. Na página 2/3 do documento lê-se “Não há riscos potenciais visto”. Cabe ressaltar que, de acordo com o item V da Resolução CNS 196/96, “considera-se que toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve risco. O dano eventual poderá ser imediato ou tardio, comprometendo o indivíduo ou a coletividade”. Ressalte-se ainda o item II.8 da mesma resolução que define como “Risco da pesquisa - possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer fase de uma pesquisa e dela decorrente”. Solicita-se retirada do trecho e adaptação do texto.
Resposta: Retiramos a frase “Não há riscos potenciais visto...” e adaptamos o texto.
Análise: Pendência atendida.
- d. De acordo com a Carta Circular N°. 003/2011/CONEP/CNS, tendo em vista sua vulnerabilidade no momento de adesão a um protocolo de pesquisa, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, apondo suas assinaturas na última página do referido Termo. Solicita-se que espaços para rubricas sejam incluídos nas páginas.
Resposta: Incluímos espaço para rubricas em cada página dos Termos de Consentimento.
Análise: Pendência atendida.
- e. O Termo faz menção, página 2-3, que “**Exame de visão** - o médico vai olhar os meus olhos”, mas descreve com maior precisão no página 12-31 do protocolo de pesquisa que haverá, entre outros, medida de pressão intraocular e exame de fundo de olho. Esses procedimentos não se encaixam na descrição “olhar nos meus olhos” e estão mais próximos da descrição de que “os médicos vão examinar e tocar meus olhos com instrumentos – sem provocar dor”. Solicita-se esclarecimentos sobre a afirmação do texto apresentada do Termo.
Resposta: Esclarecemos o texto sobre o exame de visão (em amarelo) com a frase: “Os médicos vão examinar e tocar meus olhos com instrumentos e me

Cont. Parecer CONEP nº. 002/2014

mostrará algumas figuras para que eu diga o que estou vendo – sem provocar dor”.

Análise: Pendência atendida.

- f. Na mesma página do Termo, solicita-se esclarecer o que significam as siglas “OMS/OEPA”.

Resposta: As siglas foram escritas por extenso no texto. Organização Mundial da Saúde (OMS) / Programa para Eliminação da Oncocercose das Américas (OEPA) (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

- g. Na mesma página e na 3-3, solicita-se substituir as menções adicionais do “punch oftálmico de esclera” por “pinça” – como descrito.

Resposta: Substituímos “punch oftálmico de esclera” por “pinça” (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

- h. A página 3-3 faz menção a “cópia do termo”. Solicita-se modificação esclarecendo que o Termo deve ser assinado em duas vias de igual teor.

Resposta: Modificamos o texto explicitando que o Termo vai ser assinado em duas vias de igual teor (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

- i. Na mesma página do TCLE, em “Benefícios esperados”, está descrito que o sujeito de pesquisa “poderei ser tratado ou encaminhado para...unidade de saúde...”. Solicita-se esclarecimento sobre a afirmação, considerando que o sujeito de pesquisa tem direito à assistência à saúde durante a realização da pesquisa. A frase deve ser reescrita “Com o diagnóstico, serei encaminhado para unidade de saúde para avaliação médica”.

Resposta: Reescrevemos a frase como sugerido: “Com o diagnóstico, serei encaminhado para unidade de saúde para avaliação médica” (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

- j. Na página 3-3 cita-se “...sem receber qualquer incentivo financeiro ou ter qualquer ônus...” aos voluntários. Solicita-se que a palavra “ônus” seja substituída por sinônimo mais simples (Exemplo: despesa).

Resposta: Substituímos a palavra ônus por despesa (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

- k. Sobre o mesmo assunto, o participante da pesquisa deve ser esclarecido que eventuais despesas serão ressarcidas (Res. CNS 196/96. Item IV.1.h) e que o mesmo tem direito à indenização, caso ocorra algum dano eventual, direto ou indireto, imediato ou tardio, decorrente dos procedimentos da pesquisa (Res. CNS 196/96. Item IV.1.i). Solicitam-se adequações.

Resposta: Inserimos um parágrafo esclarecendo que eventuais despesas serão ressarcidas e o direito à indenização, caso ocorra algum dano eventual decorrente dos procedimentos da pesquisa (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

- l. Solicita-se esclarecer se haverá armazenamento de tecidos/células. Se houver tal armazenamento, o protocolo e o Termo de Consentimento devem se pautar pela Resolução 441/11.

Resposta: Esclarecemos no termo de consentimento que o material coletado para realização dos exames ficará sob a guarda da coordenadora do projeto pelo período de cinco anos até que todos os experimentos propostos no projeto sejam realizados e se necessário para repetição de testes para confirmação de dados (em amarelo).

Análise: Pendência atendida.

Cont. Parecer CONEP nº. 002/2014

- m. Por se tratar de pesquisa com critérios de diagnóstico, devem ser apresentados de modo claro e objetivo os cuidados integrais de saúde a serem garantidos caso ocorra uma gravidez. Solicitam-se adequações.

Resposta: Inserimos o texto (em amarelo no item- Benefícios esperados):
“Caso ocorra gravidez em alguma participante, os cuidados integrais de saúde serão garantidos pela Unidade de Saúde que acompanhará a participante e terá os dados de diagnóstico da pesquisa”.

Análise: Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: **Protocolo aprovado.**

Brasília, 03 de fevereiro de 2014.



JORGE ALVES DE ALMEIDA VENANCIO
COORDENADOR DA CONEP/CNS/MS

ANEXO II

RESEARCH

Open Access



Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections

Lara Cotta Amaral¹, Daniela Rocha Robortella^{1,2}, Luiz Felipe Ferreira Guimarães¹, Jean Ezequiel Limongi³, Cor Jesus Fernandes Fontes⁴, Dhelio Batista Pereira⁵, Cristiana Ferreira Alves de Brito¹, Flora Satiko Kano¹, Taís Nóbrega de Sousa^{1*} and Luzia Helena Carvalho^{1,2*} 

Abstract

Background: The unexpected high proportion of submicroscopic malaria infections in areas with low transmission intensity challenges the control and elimination of malaria in the Americas. The current PCR-based assays present limitations as most protocols still rely on amplification of few-copies target gene. Here, the hypothesis was that amplification of different plasmodial targets—ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal multi-copy sequences (Pvr47 for *Plasmodium vivax* and Pfr364 for *Plasmodium falciparum*)—could increase the chances of detecting submicroscopic malaria infection.

Methods: A non-ribosomal real-time PCR assay targeting Pvr47/Pfr364 (NR-qPCR) was established and compared with three additional PCR protocols, two of them based on *18S rRNA* gene amplification (Nested-PCR and R-qPCR) and one based on Pvr47/Pfr364 targets (NR-cPCR). The limit of detection of each PCR protocol, at single and artificial mixed *P. vivax/P. falciparum* infections, was determined by end-point titration curves. Field samples from clinical (n = 110) and subclinical (n = 324) malaria infections were used to evaluate the impact of using multiple molecular targets to detect malaria infections.

Results: The results demonstrated that an association of ribosomal and non-ribosomal targets did not increase sensitivity to detect submicroscopic malaria infections. Despite of that, artificial mixed-malaria infections demonstrated that the NR-qPCR was the most sensitive protocol to detect low-levels of *P. vivax/P. falciparum* co-infections. Field studies confirmed that submicroscopic malaria represented a large proportion (up to 77%) of infections among asymptomatic Amazonian residents, with a high proportion of infections (~20%) identified only by the NR-qPCR.

Conclusions: This study presents a new species-specific non-ribosomal PCR assay with potential to identify low-density *P. vivax* and *P. falciparum* infections. As the majority of subclinical infections was caused by *P. vivax*, the commonest form of malaria in the Amazon area, future studies should investigate the potential of Pvr47/Pfr364 to detect mixed-malaria infections in the field.

Keywords: Malaria, Molecular diagnosis, PCR, Submicroscopic, Mixed-malaria infections

*Correspondence: tais@minas.fiocruz.br; lhcarvalho@minas.fiocruz.br

¹ Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, MG, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Malaria is a worldwide public health concern that is present in roughly 90 countries, mainly in tropical and subtropical regions [1]. While *Plasmodium vivax* is the most widely distributed parasite causing malaria, *Plasmodium falciparum* accounts for the most severe forms of the disease [2]. Although malaria incidence rate is estimated to have decreased by 18% globally between 2010 and 2016, a recent increase in case incidence occurred in the Americas, particularly in the Amazon rainforest [1, 3].

In order to progress towards malaria control and elimination, it is critical to understand the sources of transmission (the infectious reservoir) and those at risk of infection at the population level [4]. In this context, the molecular detection of *Plasmodium* infections in endemic areas have confirmed previous finding of high frequencies of malaria infections at densities below the limit of conventional microscopic diagnostics [5–9]. It is particularly relevant as data from systematic reviews have shown that across different geographic areas low-density infections may represent the majority of malaria infections [10, 11]. Accordingly, a substantial proportion of asymptomatic and submicroscopic malarial infections has been described in peri-urban areas of the Brazilian Amazon [12]. Many are the implications of these findings as submicroscopic malaria carriers may be able to transmit the *Plasmodium* parasites, acting as reservoirs for malaria [13, 14]. Beyond the practical value of using molecular tools to identify submicroscopic carriers and mixed-species infections, malaria infections at any density may have significant health and socioeconomic consequences [15].

Historically, the small subunit 18S of the ribosomal RNA gene (*18S rRNA*) has been the most common target used for molecular diagnosis of malaria [16–20]. As this gene is present in few copies (5 to 8) in the genome of *Plasmodium* parasites [21], low sensitivity and reproducibility of standard PCR protocols based on *18S rRNA* gene amplification have been described [22, 23]. In the last decade, the genomic data mining of *Plasmodium* parasites has allowed the discovery of new species-specific multi-copy targets which show potential for molecular diagnosis of *P. vivax* and *P. falciparum* malaria [24–26]. Among the promising targets include the non-coding subtelomeric repeat sequences Pvr47 and Pfr364 that are present in 14 and 41 copies in the genomes of *P. vivax* and *P. falciparum*, respectively [24]. While there is evidence for their location and distribution, the biological functions of Pvr47 and Pfr364 remains to be established. By using a single-step PCR assay to amplify Pvr47/Pfr364 targets, it was possible to demonstrate the relatively higher sensitivity of these targets as compared to

the amplification of *18S rRNA* gene by the conventional nested-PCR assay [24].

Since most malaria PCR-based protocols still relies on amplification of *18S rRNA* gene, which has low sensitivity to detect low-density infections, we evaluated here how useful Pvr47/Pfr364 targets are to detect single and mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections in clinical and subclinical malaria. As the original PCR protocol to amplify Pvr47/Pfr364 involved DNA visualization on gel electrophoresis [24], here a new qPCR protocol targeting these high-copy non-ribosomal sequences was established. The experimental approach evaluated whether amplification of different plasmodial targets (Pvr47/Pfr364 and *18S rRNA* gene) could increase the chances of detecting submicroscopic malaria infections. For that, field samples (clinical and subclinical malaria) were amplified by four different PCR assays, two of them targeting Pvr47/Pfr364 sequences [24] and two targeting the *18S rRNA* gene [16, 17].

Methods

Study population and participants

Ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the René Rachou Institute/Oswaldo Cruz Foundation (protocols No 24/2008, and No 1.821.955/2016), according to the Brazilian National Council of Health (Resolutions 196/96 and 466/12). All participants were informed about the objectives and procedures of the study, with voluntary participation through written informed consent.

Clinical malaria

This group included individuals with clinical suspicion of malaria who sought care at Brazilian malaria reference healthcare facilities located in both endemic (States of Rondônia and Mato Grosso) and non-endemic areas (Minas Gerais). After short-trips to malaria transmission areas, these individuals presented symptoms suggestive of uncomplicated malaria infection, such as fever, myalgia, chills, and headaches. Non-inclusion criteria included: (i) refusal or inability to sign the informed consent; (ii) age below 5 years-old; (iii) pregnant women; and (iv) any other co-morbidity that could be traced. One-hundred-and-ten patients were enrolled in the study, which gives 90% statistical power at 5% significance level assuming 30% of prevalence by light microscopy and an estimative of 50% increase by molecular assays; the majority of study population were adults, with a median age of 40 years (IQR 30.75–48.25), and a proportion female:male of 1:5. For each individual, blood sample was collected at a single time point by venipuncture or finger prick. The period of blood collection varied from 2008

to 2017, and since there, all samples from participants have been maintained in the biorepository of malaria research group at FIOCRUZ-MINAS (Belo Horizonte, MG), Brazilian Ministry of Health, according to the local legislation.

Subclinical malaria

This group included malaria-exposed individuals who had participated of cross-sectional surveys carried-out between 2008 and 2015 in a rural community of the Brazilian Amazon rainforest, Rio Pardo (1°46'S–1°54'S, 60°22'W–60°10'W), Presidente Figueiredo municipality, State of Amazonas. The study site and malaria transmission patterns have been described in details elsewhere [27–29]. In this area, malaria transmission is considered hypo to mesoendemic, and the majority of residents were natives from the Amazon region [27]. For the current study, the non-inclusion criteria were: (i) refusal or inability to sign the informed consent; (ii) any signs and/or symptoms that could be related to symptomatic malaria such as fever, myalgia, chills, and headaches; the absence of symptoms was self-reported and obtained during a personal interview conducted through structured questionnaire, as previously described [27]; (iii) age below 5 years-old, as subclinical malaria infection is not prevalent in Amazon children [30]; (iv) pregnant women; and (v) any other morbidity that could be traced. This group was composed by 324 participants; considering 7% of prevalence by light microscopy [27] and assuming that in an area of greater chance of *P. vivax* infection molecular assays is expected to increase malaria prevalence by a factor of 2 [11], sample size will give more than 90% of statistical power at 5% significance level. The median age of studied individuals were 40 years (IQR 24–56), with female:male ratio of 1:1.5, and an average of 35 years (IQR 21–52) living in the endemic area. For each individual, blood sample was collected at a single time-point by venipuncture or finger prick. As in the study area the number of malaria cases fluctuated during the last 8 years, reflecting periods of high and low malaria transmission [31], samples covered the temporal-variation in the profile of malaria transmission; thus, the blood samples were collected from November 2008 to June 2015, and all biological specimens have been maintained in the biorepository of malaria research group at FIOCRUZ-MINAS (Belo Horizonte, MG), Brazilian Ministry of Health, according to the local legislation.

Conventional light microscopy

At the time of blood collection, all individuals (clinical and subclinical groups) were submitted to a finger-prick for malaria diagnosis by light microscopy. The Giemsa-stained thick blood smears were prepared and examined

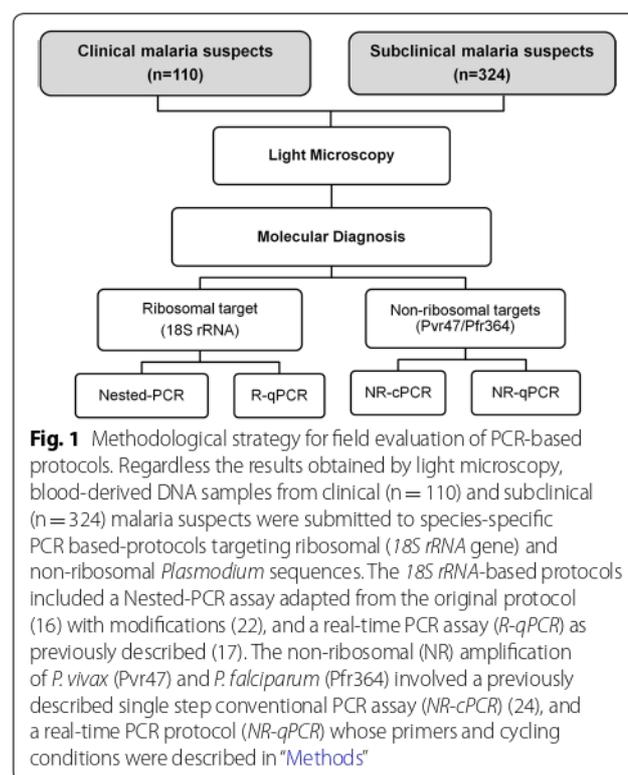
by experienced local microscopists, according to the malaria diagnosis guidelines of the Brazilian Ministry of Health [32]. Parasite density was estimated as the number of parasites per microlitre of blood (parasites/ μ L), and all microscopically positive cases were treated immediately in local health services, following the national malaria treatment protocols recommended by the Brazilian Ministry of Health [33].

Extraction of genomic DNA

The experimental approach to the molecular detection of clinical and subclinical malaria infections was included in Fig. 1. Genomic DNA (gDNA) was extracted from either whole blood samples collected in EDTA, or from dried blood spots on filter paper using the Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen) and the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), respectively, according to manufacturer's instructions. As an internal control of the DNA extractions, 10% of the samples extracted were randomly submitted to a PCR assay for the amplification of a human gene (ABO blood group), according to the protocol previously described [34]. All samples tested amplified the target gene. The extracted DNA was stored at -20°C until use.

Panel of *Plasmodium* reference samples

The following parasites were used as reference in molecular assays: (i) *P. falciparum* (3D7 strain) from in vitro



continuous blood-stage cultures maintained in the routine of the laboratory, according to protocol previously described [35]; (ii) *P. vivax*, *P. falciparum* and *Plasmodium malariae* from peripheral blood of malaria infected individuals whose species-specific diagnosis was confirmed by PCR protocols (Malaria Biorepository, FIOCRUZ-Minas, MG, Brazil); (iii) *Plasmodium brasilianum*/*P. malariae* (Peruvian III strain, MR4-349) kindly provided by the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, MR4 (Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, BEI Resources, NIAID/NIH, ATCC, USA).

End-point *Plasmodium* DNA titrations of single and mixed *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections

DNA samples from high-density *P. vivax* (12,900 parasites/ μ L) and *P. falciparum* (13,400 parasites/ μ L) infections were used to determine the end-point detection for ribosomal and non-ribosomal PCR assays. For each plasmodial DNA, three-fold dilutions were prepared range from 2000 to 0.3 parasites/ μ L. Similarly, artificial mixed malaria infections were produced by mixed DNA samples from *P. vivax* and *P. falciparum* in different proportions (1:1 until 1:2000; threefold dilutions). Each sample was assayed in triplicate and submitted to all PCR protocols (Fig. 1).

Primers design and real-time PCR conditions to amplify the non-ribosomal Pvr47/Pfr364 targets (NR-qPCR)

Primers and MGB (minor groove binder) probes were designed for Pvr47 and Pfr364 targets using Primer-Blast (NCBI) and OLIGO (version 4.0, 1999) softwares, considering conserved regions in each species alignments. The alignments were based on the sequences previously described [24], composed of 14 copies of Pvr47 (*P. vivax* Sal-I strain) and 41 copies of Pfr364 (subfamilies 1 and 2 of *P. falciparum* 3D7 strain). The set of oligonucleotides obtained for Pvr47 was 5'TCCGCGAGCTCACAAA TGTTTC3' (forward), 5'ACATGGGGATTCTAAGCC AATTTA3' (reverse), and 5'HEX-TCCGCGAGGGCT GCAA3' (probe), which binds respectively to positions 142–161, 245–222 and 189–204 of *P. vivax* Sal-I (GenBank accession number AAKM01000578), resulting in a 104 bp amplicon. For Pfr364, the set used was 5'ACT CGCAATAACGCTGCAT3' (forward), 5'TTCCCTGCC CAAAAACGG3' (reverse), and 5'FAM-GGTGCCGGG GGTTCCTACGC3' (probe), which binds respectively to positions 313–331, 400–383 and 335–354 of *P. falciparum* 3D7 (*Pf3D7_04_12625_14152*, in [24]), resulting in an 88 bp amplicon. All NR-qPCR reactions were performed in 10 μ L volumes containing 2 μ L of DNA (~3 to 6 μ L of whole blood) and 5 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). For Pvr47

amplification was used 50 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer, and 250 nM of probe; for Pfr364, 900 nM of forward primer, 300 nM of reverse primer, and 150 nM of probe were used. The PCR assays were performed using the automatic thermocycler ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) and the following cycling parameter: a pre-incubation and initial denaturation, respectively, at 50 °C for 2 min and 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, primers annealing at 52 °C for 1 min, and extension at 60 °C for 1 min. The fluorescence acquisition was performed at the end of each extension step. Analytical sensitivity and specificity of Pvr47 and Pfr364 NR-qPCR assays were included as an Additional file 1. Specificity was investigated using template DNA from either malaria unexposed individuals (n = 30) or other *Plasmodium* species (Additional file 2). For the limit of detection, standard curves were prepared from serial dilution of plasmid DNA carrying the Pvr47 or Pfr364 target (Additional file 3). The cycle threshold (Ct) values of 37 and 38 ($C_t \leq 37$ or $C_t \leq 38$) were used to define positivity to *P. vivax* and *P. falciparum*, respectively.

Amplification of Pvr47/Pfr364 targets by conventional PCR assay (NR-cPCR)

The amplification of the targets Pvr47 (*P. vivax*) and Pfr364 (*P. falciparum*) were conducted by using primers previously described [24]. Details about primers and cycling conditions were included in Additional file 4.

18S rRNA gene amplification by nested-PCR (Nested-PCR) and real-time PCR assay (R-qPCR)

Nested-PCR assay for amplification of 18S rRNA gene was performed as described [22], using genus and species-specific primers previously described [16]. The real-time PCR (R-qPCR) method uses a single pair of genus-specific primers for the detection of the 18S rRNA gene, with two internal species-specific hydrolysis probes for *P. falciparum* and *P. vivax* [17]. Primers and cycling conditions for 18S rRNA gene amplification (Nested-PCR and R-qPCR) were included as Additional file 4.

Statistical analysis

Differences in proportions were evaluated using the Chi square (χ^2) test or Fisher's exact test, as appropriate. The Probit Regression analysis was used to define the limit of detection (LOD) of NR-qPCR assay, with different input concentrations of plasmid DNA used to calculate the predicted proportion of positive results (MedCalc Statistical Software program, Ostend, Belgium). Heat map of malaria prevalence was constructed using the heatmap.2 function available in the R package gplots. The assessment of sensitivity and specificity of PCR assays was

determined as described [23], with the reference standard established by combining the detection of any PCR assay excluding the protocol under evaluation. The analyses of sensitivity and specificity were performed in the *GraphPad InStat*, version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The significance at the 5% level was considered to all analysis.

Results

Limit of detection of Pvr47 and Pfr364 NR-qPCR

To determine the LOD of NR-qPCR protocols, standard curves were constructed for each DNA plasmid carrying the target gene (Pvr47 or Pfr364) through serial dilution ranging from 20,000 to 0.05 copies/ μL (Additional file 3). By using probit regression analysis was possible to demonstrate that NR-qPCR developed here presented a 95% probability of detecting levels as low as 0.66 copies/ μL for *P. vivax* (Additional file 5A) and 3.27 copies/ μL for *P. falciparum* (Additional file 5B). No amplification was observed by using template DNA from either malaria unexposed individuals or other *Plasmodium* species (data not shown, Additional file 2).

Ribosomal and non-ribosomal detection of mono-infections caused by either *P. vivax* or *P. falciparum*

The ability of different targets (*18S rRNA* vs. Pvr47/Pfr364) to detect *P. vivax* and *P. falciparum* mono-infections at low parasite densities was investigated through serial dilutions of field samples containing known

amounts of either *P. vivax* or *P. falciparum* gDNA. In case of *P. vivax* mono-infection, no significant difference was observed between parasite targets amplified by PCR (Table 1). Despite of that, the NR-qPCR was the only protocol able to consistently detect the lowest levels of parasite densities (all replicates amplified until 1 parasite/ μL). Variability between PCRs assays using the same target resulted in a difference in positivity between conventional and real-time PCR assays targeting Pvr47 (67% vs. 96% for NR-cPCR and NR-qPCR, respectively). Considering *P. falciparum* titration (Table 2), regardless the PCR assay, the amplification of Pfr364 sequence was more precise than *18S rRNA* gene (80% vs. 59%, $p=0.0359$, Fisher's exact test). While the amplification of Pfr364 by NR-qPCR was reproducible until 3 parasites/ μL , the amplification of *18S rRNA* was inconsistent, alternating between positive and negative results at similar levels of parasite density (both nested-PCR and R-qPCR).

Ribosomal and non-ribosomal detection of artificial mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections

Next, the ability of ribosomal and non-ribosomal targets to amplify artificial mixed malaria infections was evaluated. By fixing the amount of *P. vivax* DNA (1433 parasites/ μL) and varying the amount of *P. falciparum* (1489 to 0.7 parasites/ μL), it was possible to demonstrate that the protocols based on non-ribosomal targets were much more precise to identify both parasite species, even when *P. falciparum* was present at very low densities (Table 3).

Table 1 Titration of *P. vivax* single infection by PCR assays targeting ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal (Pvr47) species-specific sequences

<i>P. vivax</i> mono-infection (12,900 parasites/ μL) ^c				
Parasite density (μL) ^d	18S rRNA		Pvr47	
	Nested-PCR	R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2000	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
1	1/3 (33%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)
0.3	0/3 (0%)	2/3 (67%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)
PCR positivity	22/27 (81%) ^{ab}	25/27 (93%) ^b	18/27 (67%) ^a	26/27 (96%) ^b
Target positivity	47/54 (87%) ^{af}		44/54 (81%) ^{af}	

P. vivax blood-derived DNA template was serially diluted (2000 to 0.3 parasites/ μL) and submitted to each PCR protocol in triplicate. The results were expressed as the number of positive samples in relation to the total of replicates (percentage of positive). PCR assays were defined as described in legend of Fig. 1

Different letters (a,b) indicate differences between proportions ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test)

No difference was observed between proportions of targets positivity (a')

^c Determined by Light Microscopy

^d Parasite density (μL of blood) was estimated according to the fold-dilution

Table 2 Titration of *P. falciparum* single infection by PCR assays targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (Pfr364) species-specific sequences

<i>P. falciparum</i> mono-infection (13,400 parasites/μL) ^c						
Parasite density (μL) ^d	18S rRNA			Pfr364		
	Nested-PCR			R-qPCR	NR-cPCR	NR-qPCR
2000	3/3 (100%)			3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
670	3/3 (100%)			3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
220	3/3 (100%)			3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
74	3/3 (100%)			3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
25	2/3 (67%)			2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
8	1/3 (33%)			1/3 (33%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
3	1/3 (33%)			1/3 (33%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)
1	0/3 (0%)			0/3 (0%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
0.3	0/3 (0%)			0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33%)
PCR positivity	16/27 (59%) ^a			16/27 (59%) ^a	21/27 (78%) ^a	22/27 (81%) ^a
Target positivity	32/54 (59%) ^{a'}				43/54 (80%) ^{b'}	

P. falciparum blood-derived DNA template was serially diluted (2000 to 0.3 parasites/μL) and submitted to each PCR protocol in triplicate. The results were expressed as the number of positive samples in relation to the total of replicates (percentage of positive).

Different letters (a, a', b') indicate differences between proportions ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test). PCR assays were defined as described in legend of Fig. 1

^c Determined by light microscopy

^d Parasite density (μL of blood) was estimated according to the fold-dilution

Table 3 Titration of *P. falciparum* in artificial mixed infections by PCR assays targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (Pvr47/Pfr364) species-specific sequences

Parasite density (per μL of blood)		18S rRNA						Pvr47/Pfr364 (NR targets)					
		Nested-PCR			R-qPCR			NR-cPCR			NR-qPCR		
Pv	Pf	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3
1433	1489	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf
	496	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf
	165	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf
	55	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf
	18	Pv + Pf	Pv	Pv + Pf	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf
	6	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv + Pf
	2	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf
	0.7	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv	Pv	Pv + Pf	Pv + Pf	Pv
PCR positivity		13/24 (54%) ^b			2/24 (8%) ^a			19/24 (79%) ^{b,c}			22/24 (92%) ^c		
Target positivity		15/48 (31%) ^{a'}						41/48 (85%) ^{b'}					

Artificial mixtures containing *P. vivax* (Pv) and *P. falciparum* (Pf) in different proportions were prepared from well-characterized field samples, as described in Methods. The results are expressed as positive to *P. vivax* and *P. falciparum* (Pv + Pf), *P. vivax* (Pv) or *P. falciparum* (Pf). For each PCR assay, dilution points were assayed in triplicate (#1 to #3)

Different letters (a–c or a', b') indicate significant differences between proportions ($p < 0.05$, Fisher's Exact Test)

Taken together, non-ribosomal protocols identified 85% (41 out of 48) artificial mixed infections, while ribosomal protocols identified only 31% (15 out of 48). By comparing the variation intra-target, the amplification of 18S rRNA gene by R-qPCR demonstrated a trend to amplify *P. vivax* in detriment of *P. falciparum*, even when *P. falciparum* DNA was present at relatively high concentrations

(Table 3). By fixing the concentration of *P. falciparum* (1489 parasites/μL) and varying *P. vivax* densities (1433 to 0.7 parasites/μL), a good performance of both targets was observed until 6 parasites/μL (Table 4). Although there was no significant difference between the amplification of ribosomal and non-ribosomal targets (69% vs. 83%), the NR-qPCR protocol developed here seems to

Table 4 Titration of *P. vivax* in artificial mixed infections by PCR assays targeting ribosomal (18S rRNA) and non-ribosomal (Pvr47/Pfr364) species-specific sequences

Pf	Pv	18S rRNA		Pvr47/Pfr364 (NR targets)									
		Nested-PCR		NR-cPCR			NR-qPCR						
		#1	#2	#3	#1	#2	#3	#1	#2	#3			
1489		Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
478		Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
159		Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
53		Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
18		Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf
6		Pv+Pf	Pv+Pf	Pv+Pf	Pf								
2		Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf
0.7		Pv+Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf	Pf
PCR positivity		18/24 (75%) ^{a,b}	15/24 (63%) ^a	17/24 (71%) ^a	17/24 (71%) ^a	23/24 (96%) ^b							
Target positivity		33/48 (69%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a	40/48 (83%) ^a

Artificial mixtures containing *P. vivax* (Pv) and *P. falciparum* (Pf) in different proportions were prepared from well-characterized field samples, as described in Methods. The results are expressed as positive to *P. vivax* and *P. falciparum* (Pv+Pf), *P. vivax* (Pv) or *P. falciparum* (Pf). For each PCR assay, dilution points were assayed in triplicate (#1 to #3)

Different letters (a, b) indicate differences between proportions ($p < 0.05$, by Fisher's exact test)

No difference was observed between proportions of targets positivity (a')

present a better performance as compared to *18S rRNA* amplification, detecting almost all replicates in all *P. vivax/P. falciparum* dilution points. In fact, NR-qPCR was the only PCR assay able to consistently detect mixed infection when one of the species was present in a ratio of about 700-fold lower than the other species (1489 vs. 2 parasites/ μ L to all replicates) (Table 4).

Field evaluation of ribosomal and non-ribosomal PCR targets in clinical and subclinical malaria infections

Initially, the potential use of both ribosomal and non-ribosomal PCR targets for application in malaria field studies involved samples from 110 symptomatic individuals whose light microscopy (LM) confirmed 35 (32%) malaria infections (Fig. 2). As compared with LM, *18S rRNA* gene PCR-based assays (nested-PCR and/or R-qPCR) identified a similar proportion of malaria infections (35%, $n=39$) (Fig. 2a); of interest, the majority of positive samples were amplified by both *18S rRNA* protocols. Basically, the same proportion of positives was obtained with the non-ribosomal protocols (NR-cPCR and/or NR-qPCR). In addition, the use of different PCR targets (ribosomal and non-ribosomal) did not increase malaria positivity (Fig. 2a, the right-side bar chart, in lilac; $p=1.0$ for ribosomal vs. both PCR-targets and $p=0.89$ for non-ribosomal vs. both targets). To confirm that an association of ribosomal and non-ribosomal targets did not increase sensitivity to detect submicroscopic malaria infections, the values of sensitivity and specificity were determined for molecular PCR-assays. In accordance, the performance of each PCR assay was similar with almost no detection of false positives or negatives (Table 5). *Plasmodium* species-specific identification (Fig. 2b) showed the same pattern of positivity, with no significant difference obtained between methods (LM vs. PCR based-protocols) or target amplified (ribosomal vs. non-ribosomal). In this symptomatic malaria patients, *P. vivax* and *P. falciparum* were found in similar proportions. Despite of that, a couple of mixed-infections (5 out of 6) identified by LM (Fig. 2b, first panel) could not be confirmed by any PCR-based assay.

Screening for subclinical malaria infections among individuals from cross-sectional surveys identified a positivity of 7% (21 out of 324) by LM (Fig. 3A). In this population, molecular diagnosis of malaria increased three to four times the detection of subclinical malaria carries. However, the amplification of either *18S rRNA* gene (nested-PCR/R-qPCR) or non-ribosomal targets (NR-cPCR/NR-qPCR) detected a similar proportion of subclinical infections, being 22% ($n=72$) and 27% ($n=89$), respectively. As the predicted sensitivity of individual PCR assays varied significantly in this group of low-parasite densities, especially with high false negative rate for nested-PCR

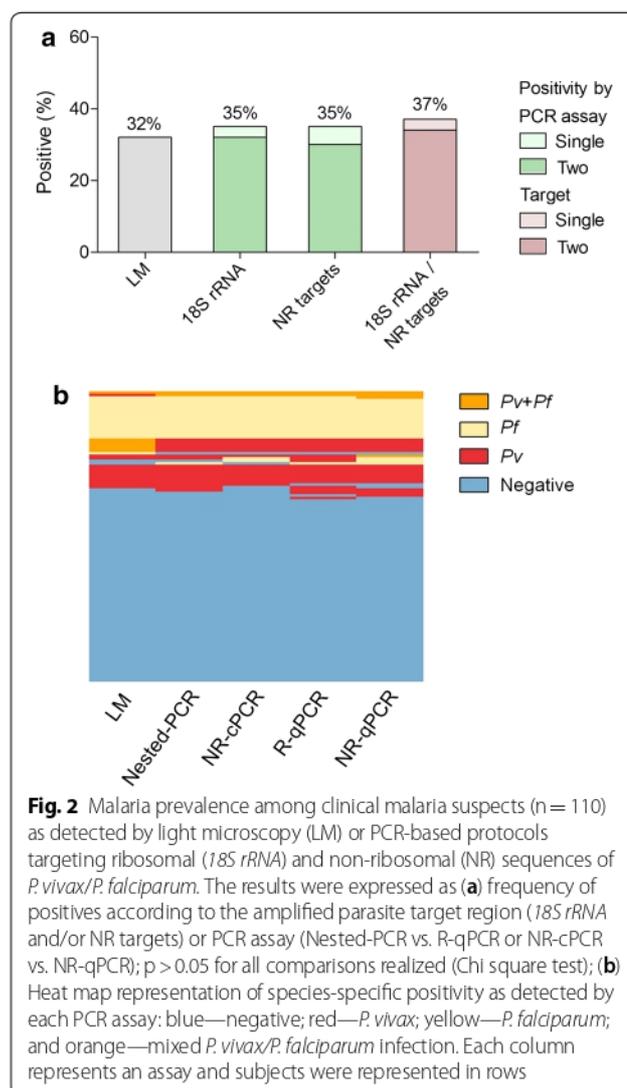


Fig. 2 Malaria prevalence among clinical malaria suspects ($n=110$) as detected by light microscopy (LM) or PCR-based protocols targeting ribosomal (*18S rRNA*) and non-ribosomal (NR) sequences of *P. vivax/P. falciparum*. The results were expressed as (a) frequency of positives according to the amplified parasite target region (*18S rRNA* and/or NR targets) or PCR assay (Nested-PCR vs. R-qPCR or NR-cPCR vs. NR-qPCR); $p > 0.05$ for all comparisons realized (Chi square test); (b) Heat map representation of species-specific positivity as detected by each PCR assay: blue—negative; red—*P. vivax*; yellow—*P. falciparum*; and orange—mixed *P. vivax/P. falciparum* infection. Each column represents an assay and subjects were represented in rows

assay (Table 5), a significant amount of submicroscopic infections was identified only by the real-time PCR assays, i.e., R-qPCR for *18S rRNA* and NR-qPCR for Pvr47/Pfr364 sequences. In addition, the majority of submicroscopic infections were identified by both ribosomal and non-ribosomal targets (Fig. 3A, the right-side bar chart, in lilac; $p=0.09$ ribosomal vs. both PCR-targets, and $p=0.86$ for non-ribosomal vs. both targets). Overall, while PCR protocols identified 92 (28%) subclinical infections, only 21 (7%) were identified by LM ($p < 0.0001$, Fig. 3), indicating that 71 out of 92 (77%) infections were missed by the routine LM. Species-specific identification demonstrated a high proportion of *P. vivax* as compared with *P. falciparum* and mixed infections (Fig. 3B), and confirmed differences in the sensitivity between protocols. Although real-time PCR assays (R-qPCR and NR-qPCR) presented a better performance than conventional PCR assays (NRc-PCR and Nested-PCR), the results confirmed the gains achieved

Table 5 Assessment of sensitivity and specificity for molecular PCR-assays in clinical (n = 110) and subclinical (n = 324) malaria suspects

Study population/ molecular protocol	True positive	False positive ^a	True negative	False negative	Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)
Clinical malaria suspects						
Nested-PCR	36	0	70	4	90% (0.76–0.97)	100% (0.95–1.0)
R-qPCR	37	1	70	2	95% (0.83–0.99)	99% (0.92–1.0)
NR-cPCR	34	0	70	6	85% (0.70–0.94)	100% (0.95–1.0)
NR-qPCR	36	1	70	3	92% (0.79–0.98)	99% (0.92–1.0)
Subclinical malaria suspects						
Nested-PCR	16	1	232	75	18% (0.10–0.27)	100% (0.98–1.0)
R-qPCR	67	2	232	23	74% (0.64–0.83)	99% (0.97–1.0)
NR-cPCR	42	0	232	50	46% (0.35–0.56)	100% (0.98–1.0)
NR-qPCR	72	17	232	3	96% (0.89–0.99)	93% (0.89–0.96)

Sensitivity and specificity was determined as previously described (23). The reference standard (true positive) for each protocol was calculated by combining the detections by any PCR, excluding the protocol under evaluation

^a False positive in a sense that no other molecular protocol detected these infections

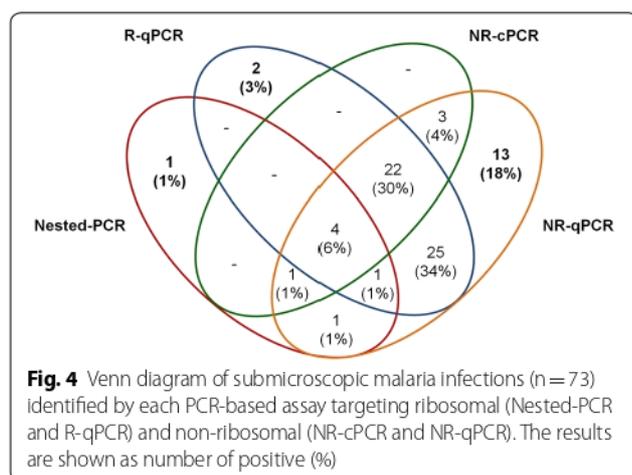
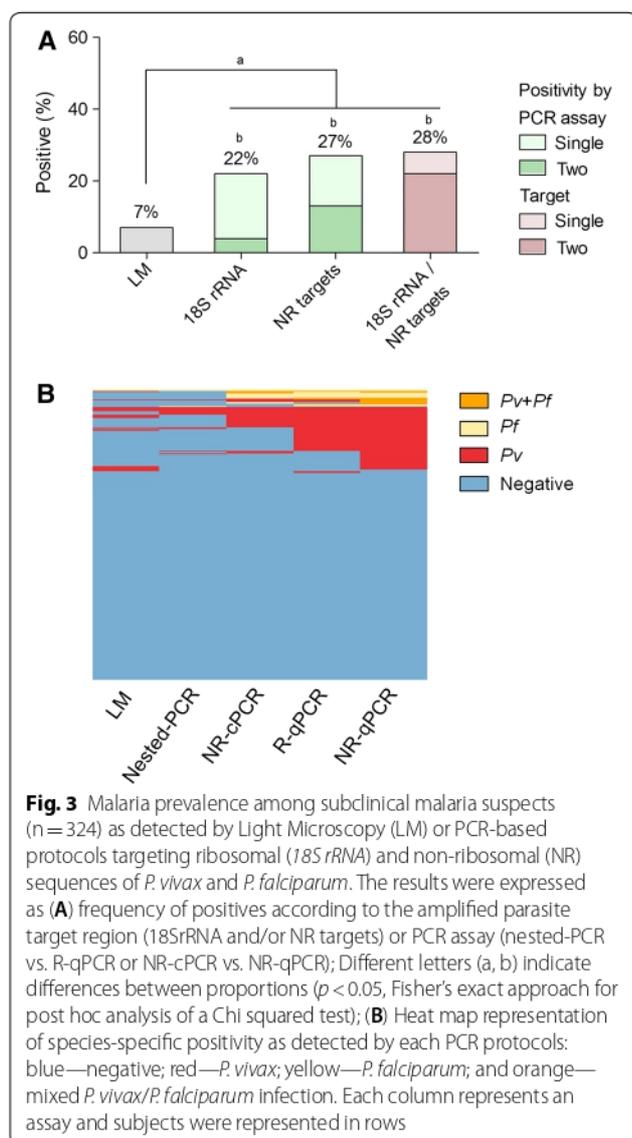
by using NR-qPCR to detect subclinical malaria infection (Fig. 3B). According, considering only the submicroscopic infections identified by any PCR-based assay (73 out of 92), Venn diagram demonstrated a high proportion of infections (18%, 13 out of 73) identified only by the NR-qPCR (Fig. 4). In terms of amplified target region, 96% (n = 70) of submicroscopic infections were detected by non-ribosomal sequences, while 78% (n = 57) were detected by ribosomal target ($p = 0.0024$, Fisher's exact test).

Discussion

Although major advances have been reached for the molecular detection of malaria parasites [25, 26, 36, 37], most sensitive PCR-based assays require high-volume of venous blood and complex sample processing [8, 23, 38, 39], being not feasible in the context of malaria routine surveillance. The current study involved investigate the hypothesis that the amplification of both ribosomal and non-ribosomal multi-copy PCR targets could increase the chances of detecting low parasite density and mixed *P. falciparum* and *P. vivax* infection. For that, a non-ribosomal (NR) qPCR targeting the multi-copy Pvr47/Pfr364 sequences was developed and this new protocol was compared with the original non-ribosomal gel-stained PCR-based protocol [24] as well as with two species-specific PCR assays based on the *18S rRNA* gene amplification.

The end-point titration assays of field samples revealed that the NR-qPCR protocol was able to accurately detect both *P. vivax* and *P. falciparum* infections—in single and artificial mixed infections—producing reproducible results at the lowest parasite densities (1–3 parasites/ μ L).

Although there was considerable variation between PCR protocols assayed, the non-ribosomal protocols (NR-cPCR and NR-qPCR) were more accurate than ribosomal (nested-PCR and R-qPCR) to detect mixed-species infections. Of interest, only NR-qPCR assay developed here were able to detect *P. falciparum* when this species was present in a proportion of 240-fold lower than *P. vivax*. As the sensitivity of any PCR protocol depends largely on the molecular target used [40], the high copy number of Pfr364 (around 20 copies of “subfamily 1” targeted by specific primers) probably facilitated the detection of low levels of *P. falciparum* in co-infections as compared to *18S rRNA* (around 5–8 copies). Although different multi-copy targets have been described as sensitive for molecular diagnosis of malaria [23, 25, 36], those studies did not investigate the reliability of these targets in mixed-malaria infections, which precludes any potential comparison with results described here. In addition, most of the studies have been carried-out in endemic areas, such as Papua New Guinea, that currently does not represent an unstable and low-transmission endemic area [23]. More work needs to be done in this field of investigation. An apparent inability of *18S rRNA* qPCR to detect low *P. falciparum* densities in situation where *P. vivax* was present in much higher densities was observed. The use of a single pair of primers to detect both species may have been a determinant factor in causing failure of R-qPCR to identify mixed infections. A similar phenomenon of primer competition was described in the original protocol [17], straightening that species-specific primers should be used in field studies in which malaria co-infection is expected to be relevant.



In clinical malaria suspects, the overall prevalence for *P. vivax* and *P. falciparum* detected by amplification of non-ribosomal Pvr47/Pfr364 targets was not significantly different than that of either conventional microscopy or *18S rRNA* gene amplification. The predicted sensitivity and specificity of each PCR protocol assayed here were also similar, and it was independent of the parasite target. Although the clinical sample size limited the statistical power to detect small differences between protocols, these results were not completely unexpected as symptomatic patients usually present high parasite densities in the peripheral blood; consequently, it may facilitate the confirmation of malaria infection by less sensitive protocols such as microscopy and rapid diagnostic tests (RDTs) [41]. These findings reinforce that submicroscopic malaria infections are not prevalent among symptomatic patients, and LM and RDTs are adequate tools for case management [10, 42]. Nevertheless, the limited sensitivity of microscopy in correct identification of mixed-species malaria should be considered in areas where more than one *Plasmodium* species is circulating [43, 44], a result that was confirmed here.

While low frequencies of submicroscopic infections were observed in the group of clinical malaria cases (3–5%), screening for malaria in cross-sectional surveys demonstrated a large proportion (> 70%) of malaria cases in the study area that was not detected by conventional microscopy. The majority of subclinical infections were caused by *P. vivax*, the commonest malaria parasite in the Amazon basin, and frequently associated with low-density infections [27, 28, 45–47]. These findings are in accordance with recent reports showing high proportions of submicroscopic *P. vivax* infections across different endemic settings, particularly areas with relatively low transmission intensity [10–12, 26]. Although the reason for this high rate of asymptomatic *P. vivax* infections is unknown, it is probably associated with the unique biology of *P. vivax* that includes a fast acquisition of clinical immunity as compared with *P. falciparum* [47]. It is particularly relevant because in different epidemiological settings there are perspectives on treating asymptomatic infections for malaria elimination [48]. In the study area, the results demonstrated that, in general, multiple molecular targets (i.e., ribosomal plus non-ribosomal) did not increase sensitivity to detect subclinical malaria infections. Despite of that, the NR-qPCR developed here was the most sensitive protocol to detect submicroscopic asymptomatic malaria infections, which resulted in a significantly higher prevalence of submicroscopic infections (70 out of 73, 96%) when compared to that detected by ribosomal PCR assays (57 out of 73, 78%). While more sensitive amplification of *18S rRNA* gene has been described [39, 49], the likelihood of amplify *18S rRNA*

gene was dependent on (i) large blood volume (2 mL); (ii) careful removal of plasma and buffy coat as prerequisite to avoid interference during PCR processing; (iii) concentration of purified DNA dehydrated in a centrifugal vacuum concentrator; additionally, these “high-volume” *18S rRNA* PCR strategy did not allow the detection by species (only *Plasmodium* spp.) [39].

The apparent ability of Pvr47/Pfr364 NR-qPCR to increase sensitivity to investigate the true prevalence of malaria infection is relevant as an unexpectedly large reservoir of infections may hinder control and elimination of malaria in the Americas [3, 50]. These findings are critical as both subclinical and submicroscopic malaria carriers remain untreated in the Brazilian Amazon region and therefore might remain infective over long periods of time [12]. As parasite densities cannot be assumed as a static parameter and thus may fluctuate over time falling below the detection threshold of the assay [51], future studies should approach longitudinal PCR-malaria surveys. Although the NR-qPCR developed here may constitute powerful additive tools to identify endemic sites where relevant control measures have to be settled and monitored [52], the costs of PCR-based assays limited such type of study. In general, nucleic acid amplification tests (NAATs) require expensive equipment available, well-equipped laboratories, qualified personnel, and large quantities of disposable supplies that need to be frozen or refrigerated, which is sometimes difficult in the country [41, 53]. Currently, WHO recommends that the use of NAATs be considered only for epidemiological research or surveys mapping submicroscopic infections in low transmission areas [54]. Innovative and cost-effective strategies that identify the real burden of malaria infections (those detected by qPCR) are required to reach malaria elimination goals, but remain a challenge [48].

Assuming that the NR-qPCR developed here seems to be the most sensitive method—as it was positive in a number of samples not detected by other PCR protocols—the results suggested that NR-qPCR has a lower detection threshold. Despite of that, it is important to clarify the technical limitations that apply for the definition of “reference standard” for PCR-detection of submicroscopic malaria infections. In general, the estimative of test accuracy are based on the assumptions that the reference standard is 100% sensitive and that specific disagreements between the reference standard and the diagnostic test being evaluated (index test) result from incorrect classification by the index test [55]. However, this statement cannot be applied for the detection of low-density malaria infections because there is no “gold-standard”. While the conventional microscopy diagnostic present high number of false negatives at low parasite density [41], there is no

consensus about a PCR assay able to detect all malaria infections [25]. Due to these inherent limitations, the “reference standard” for each molecular diagnostic method was defined as a combination of positive detections by any PCR assay, excluding the method under evaluation, as described before [23]. Consequently, “false positive” in this type of analysis is considered in the sense that no other PCR method found these infections. In this scenario, the findings unlikely represent a tendency to false positive by NR-qPCR as it was established by (i) end-point titration of well-characterized field samples, including mono and artificial mixed-infections; (ii) reproducibility of replicates at low levels of parasitaemia; (iii) no amplification with gDNA samples from malaria-free volunteers; (iv) no cross-reactivity with other *Plasmodium* species. Furthermore, considering the rules for quality assessment of diagnostic accuracy studies (QUADAS-2) [56], the risk of bias of the present study was reduced as methodological design involved: (i) structured sample size calculations and random selection of malaria-exposed individuals, with explicit exclusion criteria defined in methods; (ii) in the estimative of sensitivity and/or specificity, the diagnostic test being evaluated was clearly interpreted before the reference standard was known; (iii) the execution of the PCR-based assays and the definition of reference standard were described in sufficient detail to permit replication of the test. Consequently, valuable malaria information can be retrieved from the current study.

Finally, relatively low frequencies of mixed-malaria infections were detected here, which precluded a more detailed evaluation of the potential of Pvr47/Pfr364 to detect mixed-malaria infections in the field. In the Amazon area, besides *P. vivax* being the predominant malaria parasite [27, 29], the progress achieved in malaria control has decreased the number of *P. falciparum* cases in recent years [57]. Notwithstanding this study limitation, it is highly relevant the results from the end-point titration experiments showing the ability of Pvr47/Pfr364 to consistently detect *P. vivax/P. falciparum* co-infection, as the accurate detection of malaria mixed-infections seems to be critical for control and management of malaria [43, 44]. In fact, disease burden due to mixed species infections remains largely unknown, and this limitation have the potential to influence decisions on testing vaccines and new antimalarial drugs [58]. As malaria has been re-emerging in areas where it was previously controlled, dealing with mixed malaria infection cannot be bypassed, as recent evidence suggest that the frequency of these infections may be much higher than previously expected [44], including in the Amazon region [59]. Due to the risk of *P. falciparum* reemergence from Amazonian

neighboring countries with high transmission rates, a cross-border malaria study to evaluate the relevance of NR-qPCR in mixed-malaria infections are on progress.

Conclusion

Although the simultaneous use of ribosomal and non-ribosomal PCR-targets did not impact the molecular diagnosis of malaria, the amplification of Pfr364 and Pvr47 multi-copy targets by the NR-qPCR seems to be a valuable tool in detection of subclinical and mixed *P. vivax*/*P. falciparum* infections, even though one of the species was present in a ratio of hundred-times lower than the other species.

Additional files

Additional file 1. Analytical evaluation of NR-qPCR assay.

Additional file 2. Amplification curves of NR-qPCR performed on field samples infected with *P. vivax* (n = 3; red), *P. falciparum* (n = 3; blue), *P. malariae* (n = 3; green), and *P. brasilianum* DNA (n = 1; orange). The amplification plots are shown for (A) Pvr47 and (B) Pfr364 assays.

Additional file 3. Five-fold dilution of *P. vivax*-Pvr47 and *P. falciparum*-Pfr364 plasmids amplified by NR-qPCR.

Additional file 4. Conditions of the Nested-PCR, R-qPCR, and NR-cPCR assays. The primers/probes used for *P. vivax* and *P. falciparum* targets were the original described. The products of nested-PCR and NR-cPCR were visualized by 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

Additional file 5. Limit of detection (LOD) for (A) Pvr47 and (B) Pfr364 targets amplified by NR-qPCR. Probit regression analysis was used on logarithmic scale using nine points of NR-qPCR standard curves (20,000 to 0.05 copies/ μ L). The calculated regression curves (blue lines) indicate the probability (y-axis) of obtaining positive results at any template concentration, and dashed brown lines shows 95% confidence intervals. Dashed black lines correspond to the lower DNA concentration in which 95% of positive samples were detected (0.66 copies/ μ L of Pvr47 and 3.27 copies/ μ L of Pfr364).

Abbreviations

18S rRNA: small subunit 18S of the ribosomal RNA gene; NR: non-ribosomal; PCR: polymerase chain reaction; NR-qPCR: non-ribosomal real-time PCR; NR-cPCR: non-ribosomal conventional PCR; R-qPCR: ribosomal real-time PCR; IQR: interquartile range; gDNA: genomic DNA; LM: light microscopy; LOD: limit of detection.

Authors' contributions

LHC, CFAB, and TNS led the conception and study design. LCA contributed to the study design, performed PCR assays, and data analysis. DRR and LFFG performed PCR assays based on the amplification of 18S rRNA gene. JEL, CJFF, DBP and FSK participated in the field study. LCA, TNS and LHC wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-MINAS, Belo Horizonte, MG, Brazil. ²Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. ³Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil. ⁴Hospital Júlio Müller, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. ⁵Centro de Pesquisas em Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM), Porto Velho, Rondônia, Brazil.

Acknowledgements

The authors would like to thank the MR4/Bei Resources/NIAID/NIH/ATCC for providing the genomic DNA of the *P. brasilianum* Peruvian III strain (MRA-349). We also thank the Programme for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of the DNA sequencing (RPT01E) and Real-Time PCR (RPT09D) facilities. This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the Research Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG) and Program of Excellence in Research/Diagnosis (Proep/IRR/FIOCRUZ). Fellowships from CNPq (LHC, CFAB, TNS, CJFF, DRR) and CAPES (LCA, LFFG) are also acknowledged. The authors declare that the study was conducted in the absence of any financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The authors confirm that all data reported in the manuscript are publicly available.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Ethical and methodological aspects of this study were approved by the Ethical Committee of Research on Human Beings from the René Rachou Institute/Oswaldo Cruz Foundation (Protocols Nos. 24/2008, and 1.821.955/2016), according to the Brazilian National Council of Health (Resolutions 196/96 and 466/12). All participants were informed about the objectives and procedures of the study, with voluntary participation through written informed consent.

Funding

The study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Research Foundation of Minas Gerais (FAPEMIG), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES; Finance code 001)—Finance Code 001. Scholarships from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel/CAPES (LCA, LFFG) and CNPq (DRR, LHC, CFAB, TNS, CJFF) are also acknowledged. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 11 February 2019 Accepted: 13 April 2019

Published online: 30 April 2019

References

- WHO. World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization. 2018. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>. Accessed 9 Apr 2019.
- Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *Int J Parasitol*. 2017;47:145–52.
- Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 2017;16:273.
- Rabinovich RN, Drakeley C, Djimde AA, Hall BF, Hay SI, Hemingway J, et al. malERA: an updated research agenda for malaria elimination and eradication. *PLoS Med*. 2017;14:e1002456.
- Imwong M, Stepniewska K, Tripura R, Peto TJ, Lwin KM, Vihokhern B, et al. Numerical distributions of parasite densities during asymptomatic malaria. *J Infect Dis*. 2016;213:1322–9.
- Tadesse FG, Van Den Hoogen L, Lanke K, Schildkraut J, Teteh K, Aseffa A, et al. The shape of the iceberg: quantification of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* parasitaemia and gametocytaemia in five low endemic settings in Ethiopia. *Malar J*. 2017;16:99.

7. Lamptey H, Ofori MF, Kusi KA, Adu B, Yeboa EO, Baafour EK, et al. The prevalence of submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage and multiplicity of infection in children, pregnant women and adults in a low malaria transmission area in Southern Ghana. *Malar J*. 2018;17:331.
8. Bejon P, Andrews L, Hunt-cooke A, Sanderson F, Gilbert SC, Hill AVS. Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malar J*. 2006;5:104.
9. Haanshuus CG, Chandy S, Manoharan A, Vivek R. A high malaria prevalence identified by PCR among patients with acute undifferentiated fever in India. *PLoS ONE*. 2016;11:e0158816.
10. Cheng Q, Cunningham J, Gattton ML. Systematic review of sub-microscopic *P. vivax* infections: prevalence and determining factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e3413.
11. Moreira CM, Shehada MA, Price RN, Drakeley CJ. A systematic review of sub-microscopic *Plasmodium vivax* infection. *Malar J*. 2015;14:360.
12. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors*. 2018;11:194.
13. Alves FP, Gil LHS, Marrelli MT, Ribolla PEM, Camargo EP, Pereira Da Silva LH. Asymptomatic carriers of *Plasmodium* spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 2005;42:777–9.
14. Schneider P, Bousema JT, Gouagna LC, Otieno S, van de Vegte-Bolmer M, Omar SASR. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76:470–4.
15. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. "Asymptomatic" malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med*. 2016;13:e1001942.
16. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu PZ, 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;61:315–20.
17. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille JJK. 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;42:5636–43.
18. Mangold KA, Manson RU, Koay ES, Stephens L, Regner M, Thomson RB Jr, Peterson LRKK. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2435–40.
19. Murphy SC, Prentice JL, Williamson K, Wallis CK, Fang FC, Fried M, et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86:383–94.
20. Kamau E, Alemayehu S, Feghali KC, Saunders D, Ockenhouse CF. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PLoS ONE*. 2013;8:e71539.
21. Mercereau-Puijalon O, Barale J, Bischoff E. Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *Int J Parasitol*. 2002;32:1323–44.
22. Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BAM, Gomes LT, Fernandes Fontes CJ, et al. Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109:21–8.
23. Hofmann NE, Gruenberg M, Nate E, Ura A, Rodriguez-Rodriguez D, Salib M, et al. Assessment of ultra-sensitive malaria diagnosis versus standard molecular diagnostics for malaria elimination: an in-depth molecular community cross-sectional study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:1108–16.
24. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2411–8.
25. Hofmann N, Mwingira F, Shekalaghe S, Robinson LJ, Mueller I, Felger I. Ultra-sensitive detection of *Plasmodium falciparum* by amplification of multi-copy subtelomeric targets. *PLoS Med*. 2015;12:e1001788.
26. Gruenberg M, Moniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. *Malar J*. 2018;17:55.
27. Kano FS, Sanchez BAM, Sousa TN, Tang ML, Saliba J, Oliveira FM, et al. *Plasmodium vivax* Duffy binding protein: baseline antibody responses and parasite polymorphisms in a well-consolidated settlement of the Amazon Region. *Trop Med Int Health*. 2012;17:989–1000.
28. Souza-silva A, Brito CFA, Adams JH, Kano FS, Carvalho LH. Duffy antigen receptor for chemokine (DARC) polymorphisms and its involvement in acquisition of inhibitory anti-duffy binding protein II (DBPII) immunity. *PLoS ONE*. 2014;9:e93782.
29. Kano FS, Souza-Silva FA, Torres LM, Lima BA, Sousa TN, Alves JR, Rocha RS, Fontes CJ, Sanchez BA, Adams JH, Brito CF, Pires DE, Ascher DB, Sell AMCL. The presence, persistence and functional properties of *Plasmodium vivax* duffy binding protein II antibodies are influenced by HLA class II allelic variants. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0005177.
30. Ladeia-Andrade S, Ferreira MU, de Carvalho ME, Curado I, Coura JR. Age-dependent acquisition of protective immunity to malaria in riverine populations of the Amazon Basin of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;80:452–9.
31. Pires CV, Alves JRS, Lima BAS, Paula RB, Sousa N, Soares IS, et al. Blood-stage *Plasmodium vivax* antibody dynamics in a low transmission setting: a nine year follow-up study in the Amazon region. *PLoS ONE*. 2018;13:e0207244.
32. Ministério da Saúde. Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_laboratorial_malaria_2ed.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
33. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. 2010. http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
34. Olsson ML, Hansson C, Avent ND, Åkesson IE, Green CA, Daniels GL. A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion*. 1998;38:168–73.
35. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976;193:673–5.
36. Lloyd YM, Esemu LF, Antallan J, Thomas B, Yunga ST, Obase B, et al. PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* in saliva using mitochondrial cox3 and varATS primers. *Trop Med Health*. 2018;46:22.
37. Meerstein-Kessel L, Andolina C, Carrio E, Mahamar A, Sawa P, et al. A multiplex assay for the sensitive detection and quantification of male and female *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Malar J*. 2018;17:441.
38. Andrews L, Andersen RF, Webster D, Dunachie S, Walther RM, Bejon P, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction for malaria diagnosis and its use in malaria vaccine clinical trials. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;73:191–8.
39. Imwong M, Hanchana S, Malleret B, Rénia L, Day NPJ, Dondorp A, et al. High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias. *J Clin Microbiol*. 2014;52:3303–9.
40. Lucchi NW, Oberstaller J, Kissinger JCUV. Malaria diagnostics and surveillance in the post-genomic era. *Public Health Genomics*. 2013;16:37–43.
41. Zimmerman PA, Howes RE. Malaria diagnosis for malaria elimination. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28:446–54.
42. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12:833–40.
43. Ehtesham R, Fazaeli A, Raeisi A, Keshavarz H, Heidari A. Detection of mixed-species infections of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by nested PCR and rapid diagnostic tests in southeastern Iran. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93:181–5.
44. Singh US, Siwal N, Pande V, Das A. Can mixed parasite infections thwart targeted malaria elimination program in India? *Biomed Res Int*. 2017;2017:2847548.
45. Oliveira-ferreira J, Lacerda MVG, Brasil P, Ladislau JLB, Tauil PL, Daniel-ribeiro CT. Malaria in Brazil: an overview. *Malar J*. 2010;9:115.
46. Sampaio VS, Siqueira AM, Costa G, Paula M, Mourão G, Monteiro WM, et al. Malaria in the State of Amazonas: a typical Brazilian tropical disease influenced by waves of economic development. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(Suppl 1):4–11.
47. Adams JH, Mueller I. The biology of *Plasmodium vivax*. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7:9.

48. Jaiteh F, Masunaga Y, Okebe J, Alessandro UD, Balen J, Bradley J, et al. Community perspectives on treating asymptomatic infections for malaria elimination in The Gambia. *Malar J*. 2019;18:39.
49. Imwong M, Nguyen TN, Tripura R, Peto TJ, Lee SJ, Lwin KM, et al. The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand–Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malar J*. 2015;14:381.
50. Ferreira MU, Castro MC. Challenges for malaria elimination in Brazil. *Malar J*. 2016;15:284.
51. Nguyen T, Seidlein LV, Nguyen T, Truong P, Hung SD, Pham H, et al. The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:565–72.
52. Niang M, Diop F, Niang O, Sadio BD, Sow A, Faye O, et al. Unexpected high circulation of *Plasmodium vivax* in asymptomatic children from Kédougou, southeastern Senegal. *Malar J*. 2017;16:497.
53. Berzosa P, De Lucio A, Barja MR, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malar J*. 2018;17:333.
54. WHO. Nucleic acid amplification-based diagnostics. Geneva: World Health Organization. 2018. <https://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/nucleic-acid-amplification-tests/en/>. Accessed 9 Apr 2019.
55. Biesheuvel C, Irwig L, Bossuyt P. Observed differences in diagnostic test accuracy between patient subgroups: is it real or due to reference standard misclassification? *Clin Chem*. 2007;53:1725–9.
56. Whiting PF, Rutjes AWS, Westwood ME, Mallett S, Deeks JJ, Reitsma JB, et al. QUADAS-2: a revised tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *Ann Intern Med*. 2011;155:529–36.
57. Siqueira AM, Mesones-lapouble O, Marchesini P, Sampaio VDS, Brasil P, Tauil PL, et al. *Plasmodium vivax* landscape in Brazil: scenario and challenges. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(Suppl 6):87–96.
58. Zimmerman PA, Mehlotra RK, Kasehagen LJK. Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? *Trends Parasitol*. 2004;20:440–7.
59. Camargo M, León SCS, Del Río-ospina L, Páez AC, González Z, González E, et al. Micro-epidemiology of mixed-species malaria infections in a rural population living in the Colombian Amazon region. *Sci Rep*. 2018;8:5543.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXO III

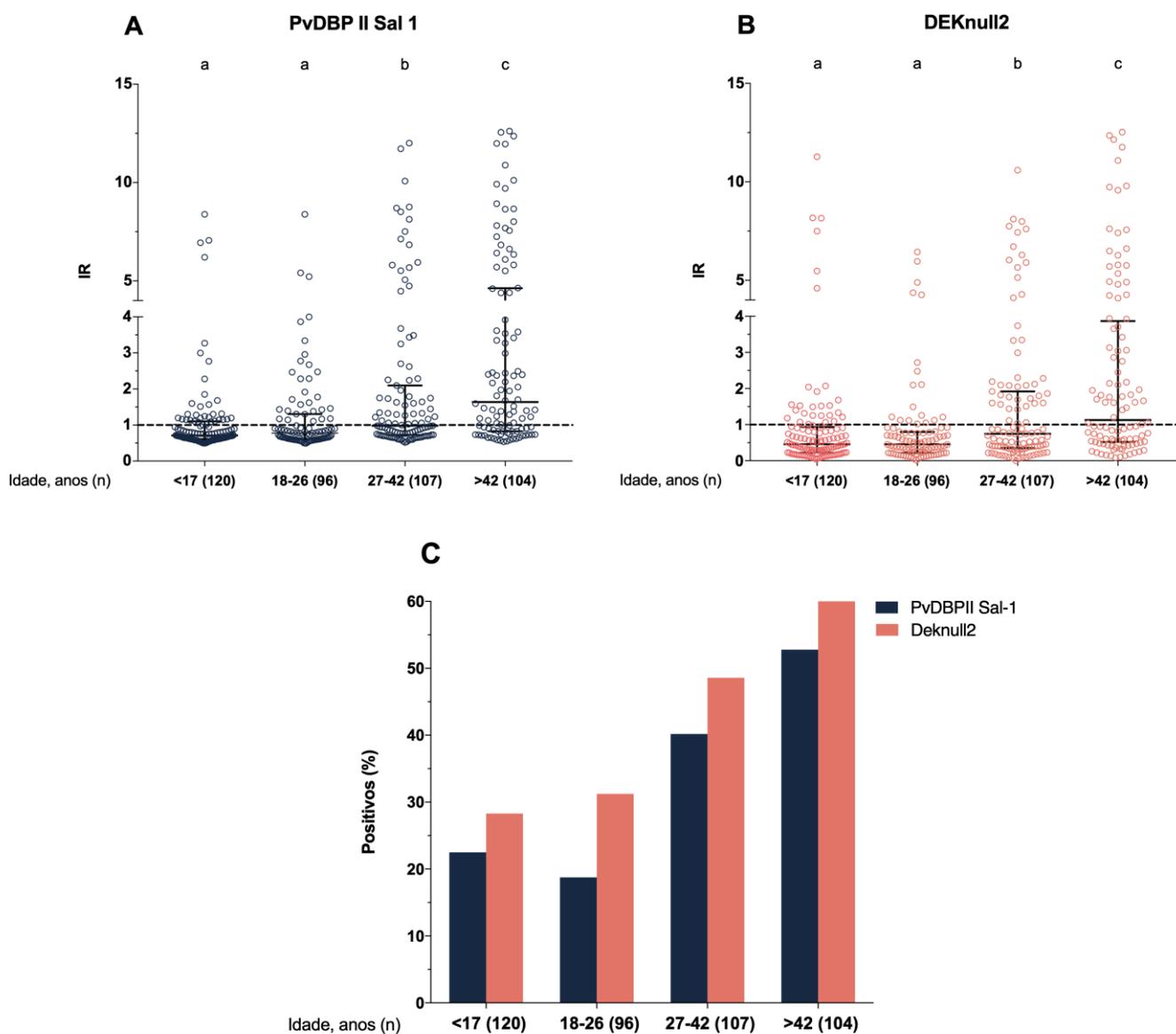
Anticorpos contra formas sanguíneas de *P. vivax* em função da idade:

Figura A-C: Resposta de anticorpos IgG contra: (A) o principal antígeno candidato vacinal contra as formas sanguíneas do *P. vivax*, a proteína de ligação ao antígeno Duffy (DBP II, variante Sal-1); (B) o protótipo vacinal baseado na DBP II, DEKnull2 (NTUMNGIA *et al.*, 2017); e (C) frequência de positivos para cada um dos antígenos estudados (PvDBP II Sal-1 e DEKnull2) em função da idade. Os ensaios sorológicos foram realizados pela sorologia convencional (ELISA). Em A e B, os resultados foram expressos em níveis de anticorpos, representados pelo índice de reatividade (IR). O IR foi obtido pela divisão da média da densidade óptica (DO_{492nm}) de cada amostra pelo valor do *cutt-off* determinado para cada proteína (média da DO_{492nm} de 30 indivíduos nunca expostos a transmissão de malária). Amostras com valores de $IR > 1$ foram consideradas positivas, sendo a linha pontilhada no gráfico o limite de detecção ($IR = 1$). No rodapé de cada figura foram

incluídos o número de indivíduos por grupo etário. As diferentes letras (^{a,b,c}) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$), conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste para múltiplas comparações de Dunn. Em **C**, para os dois antígenos avaliados foram observadas tendências significativas no aumento na frequência de positivos em função da idade dos indivíduos (análises de Qui-quadrado de tendência; $p < 0.05$).

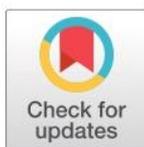
RESEARCH ARTICLE

Prospective assessment of malaria infection in a semi-isolated Amazonian indigenous Yanomami community: Transmission heterogeneity and predominance of submicroscopic infection

Daniela Rocha Robortella^{1,2}, Anderson Augusto Calvet³, Lara Cotta Amaral², Raianna Farhat Fantin^{1,2}, Luiz Felipe Ferreira Guimarães², Michelle Hallais França Dias², Cristiana Ferreira Alves de Brito², Tais Nobrega de Sousa², Mariza Maia Herzog³, Joseli Oliveira-Ferreira^{3*}, Luzia Helena Carvalho^{1,2*}

1 Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, **2** Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MINAS), Belo Horizonte, Brazil, **3** Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio De Janeiro, Brazil

* luzia.carvalho@fiocruz.br (LHC); lila@ioc.fiocruz.br (JOF)



OPEN ACCESS

Citation: Robortella DR, Calvet AA, Amaral LC, Fantin RF, Guimarães LFF, França Dias MH, et al. (2020) Prospective assessment of malaria infection in a semi-isolated Amazonian indigenous Yanomami community: Transmission heterogeneity and predominance of submicroscopic infection. PLoS ONE 15(3): e0230643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643>

Editor: Adriana Calderaro, Università degli Studi di Parma, ITALY

Received: November 8, 2019

Accepted: March 4, 2020

Published: March 19, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643>

Copyright: © 2020 Robortella et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

In the Amazon basin, indigenous forest-dwelling communities typically suffer from a high burden of infectious diseases, including malaria. Difficulties in accessing these isolated ethnic groups, such as the semi-nomadic Yanomami, make official malaria data largely underestimated. In the current study, we longitudinally surveyed microscopic and submicroscopic malaria infection in four Yanomami villages of the Marari community in the north-eastern-most region of the Brazilian Amazon. Malaria parasite species-specific PCR-based detection of ribosomal and non-ribosomal targets showed that approximately 75% to 80% of all malaria infections were submicroscopic, with the ratio of submicroscopic to microscopic infection remaining stable over the 4-month follow-up period. Although the prevalence of malaria infection fluctuated over time, microscopically-detectable parasitemia was only found in children and adolescents, presumably reflecting their higher susceptibility to malaria infection. As well as temporal variation, the prevalence of malaria infection differed significantly between villages (from 1% to 19%), demonstrating a marked heterogeneity at micro-scales. Over the study period, *Plasmodium vivax* was the most commonly detected malaria parasite species, followed by *P. malariae*, and much less frequently *P. falciparum*. Consecutive blood samples from 859 out of the 981 studied Yanomami showed that malaria parasites were detected in only 8% of the previously malaria-positive individuals, with most of them young children (median age 3 yrs). Overall, our results show that molecular tools are more sensitive for the identification of malaria infection among the Yanomami, which is characterized by heterogeneous transmission, a predominance of low-density infections, circulation of multiple malaria parasite species, and a higher susceptibility in young children. Our findings are important for the design and implementation

Data Availability Statement: All relevant data are available within the article and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance code 001, PAEF/FIOCRUZ (IOC-FIO-18-2-47 by JOF), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ (E-26/110.803/2013 by JOF), Yanomami Special Indigenous Sanitary District (DSEI-Y) for Air transport (by JOF). CFAB, TNS, JOF and LHC are CNPq Research Productivity fellows. Scholarships were sponsored by CAPES (LFFG, LCA and MHFD) and CNPq (DRR and RFF). We also thank the financial support from the Program for Institutional Internationalization of the Higher Education Institutions and Research Institutions of Brazil-CAPES-Print from FIOCRUZ. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

of the new strategic interventions that will be required for the elimination of malaria from isolated indigenous populations in Latin America.

Introduction

In the Americas, of the 17 malaria endemic countries, 11 are on target to achieve a $\geq 40\%$ reduction in case incidence by 2020, while the remaining six are on target for a 20–40% reduction [1]. Despite this overall progress, since 2015, malaria incidence began to rise in the Americas, mainly due to increases in the Amazonian rain forest areas of Venezuela (Bolivarian Republic of), Brazil and Colombia [2]. In 2018, Venezuela alone accounted for 50% of all reported cases of malaria in the Americas, followed by Brazil (23%), Colombia (10%) and Nicaragua (6%) [3]. Malaria control in the Amazon region is difficult due to its low population density and scarcity of reliable transport routes, which make it challenging to deliver and sustain preventive health-care measures [4]. In this context, local control measures need to characterize areas and populations according to their levels of disease transmission, while also considering socio-economic, political and environmental factors.

In the Amazon basin, malaria is endemic among many indigenous people, which is often considered one of the last barriers to malaria elimination due to their geographic isolation [5]. According to the Brazilian Surveillance Secretary of the Ministry of Health (SVS/MS), while malaria increased by 3% among some vulnerable populations living in the Brazilian Amazon, such as gold-miners, in indigenous areas the number of cases increased about 30% over the same period of time (2017–2018) [6]. In this region, indigenous communities, including the traditionally seminomadic and widely dispersed Yanomami ethnic group, suffer from a high burden of infectious diseases [7]. The Yanomami are considered the largest semi-isolated Amazonian indigenous people, which inhabit an area of roughly 74,000 square miles that straddles the Brazilian-Venezuelan border [8]. Partly due to the impact of the current political instability in Venezuela and its associated healthcare crisis, the Yanomami people—who have great vulnerability to malaria, measles, malnutrition and mercury pollution in rivers—are currently confronted with environmental destruction of their homeland and potential ethnocide [9].

In the current study, we prospectively evaluated the prevalence of malaria infection in four Yanomami villages of the Marari community in the northern-most region of the Brazilian Amazon, close to the border with Venezuela. To accurately estimate the burden of malaria infection among the Yanomami, the study design involved the screening of 981 individuals for both microscopic and submicroscopic malaria infection (using species-specific PCR-based assays) during three cross-sectional surveys taken at two-month intervals.

Individuals and methods

Study area

The study was performed in a remote forest-dwelling Yanomami community called Marari located in the northern-most region of the Brazilian Amazon in the state of Amazonas (Fig 1). Although only a few studies have so far reported in detail malaria transmission among the Marari community [10], we have previously identified high rates of infection (1.5–2%) in the main local malaria vector, the mosquito *Anopheles darlingi* [8]. Marari is one of the basic Health Units in the Brazilian Yanomami Indigenous Territory, which provide health care for four geographically close communities: Taibrapa-I, Gasolina, Alapusi and Ahima/Castanha, with the last one of these listed located close to the Health Unit (Fig 1). Due to the semi-nomadic habits of the Yanomami, the residents of Taibrapa-I also have an alternative residence named Taibrapa-II. The

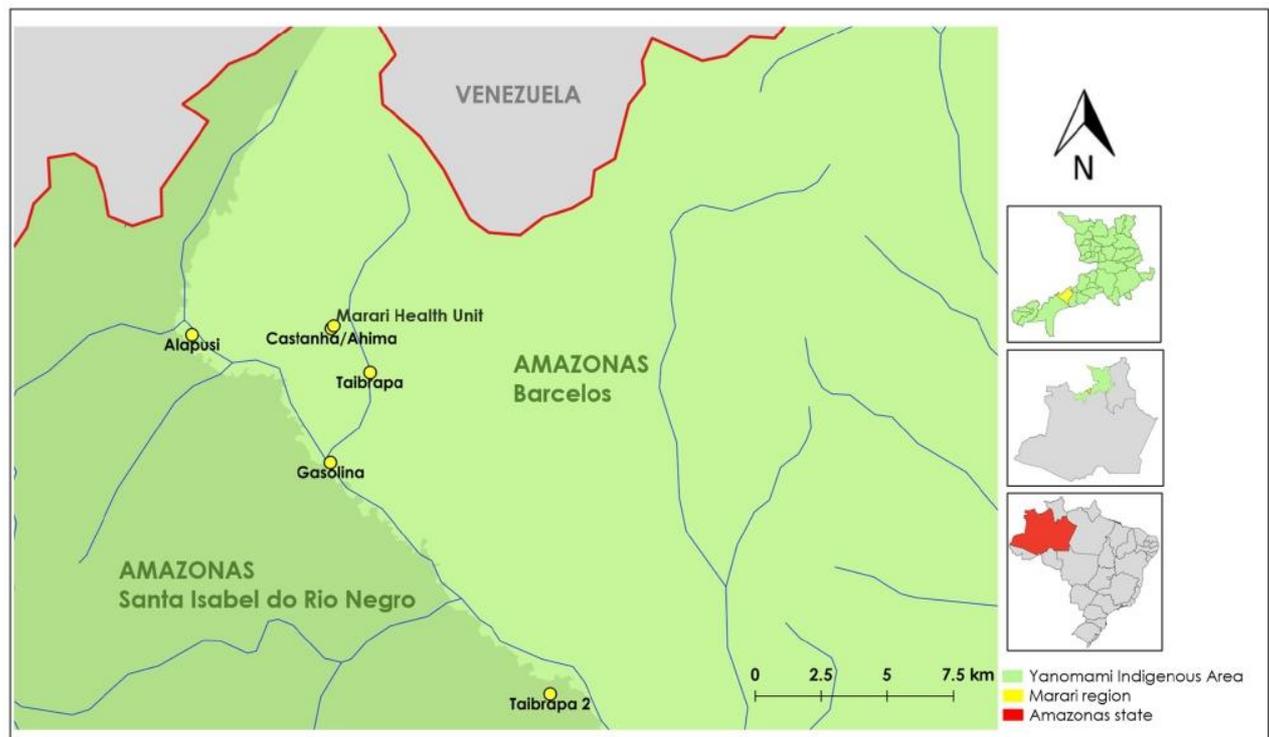


Fig 1. Map of the Brazilian-Venezuelan border showing the study area. The Marari community (yellow in the top inset map) is located in the Yanomami indigenous area (green in the inset maps) in the northern-most region of the state of Amazonas (red in the bottom inset map), roughly 454 miles from the state capital, Manaus, in Brazil. The studied villages are marked with yellow dots, while the main rivers are shown in blue. Studied villages shown in the main map are located in the municipality of Barcelos (light green) or Santa Isabel do Rio Negro (dark green). Map sources: the Brazilian Water National Agency, Multi-scale Ottocoded Hydrographic Base, and the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). Amazonas municipal cartographic base (SRC selected- EPSG: 4674, SIRGAS 2000). Scale 1:128.000.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g001>

Marari community is located in an area of lowland Amazonian rain forest (139 meters above sea level), which is drained by primary to tertiary tributaries and surrounded nearby by high mountains at the border of Brazil and Venezuela (Fig 1). In Marari, the Yanomami in each village occupy a single large dwelling named a “shabono” or “shapono”, which is a circular, thatched-roofed communal shelter with no internal walls [5]. Due to the seasonal dependence on river transport and the high costs of air transportation, access to health services is extremely limited within such Yanomami regions [11, 12]. In our study area, the Yanomami still maintain traditional modes of subsistence, including hunter-gathering and rural agriculture. In 2014, the Annual Parasitological Index (API) for the Yanomami territory was approximately 100 cases per 1,000 inhabitants, with *P. vivax* usually predominating over *P. falciparum* infection [13].

Study design, participants and sample collection

Ethical and methodological aspects of this study were approved by the Brazilian National Research Ethics Commission (CONEP, Protocol #16907), which regulates studies involving Brazilian indigenous people and was locally supervised by their representatives. The study design involved a longitudinal approach with three cross-sectional surveys at two-month intervals. The first survey (baseline) was carried out in September 2014, the second in November 2014 (2 months later), and the third in January 2015 (4 months after the first baseline survey). At that time of cross-sectional surveys, roughly 30 microscopically confirmed cases per 1,000 inhabitants were officially registered in the study area (Fig 2). Recruitment in the Marari

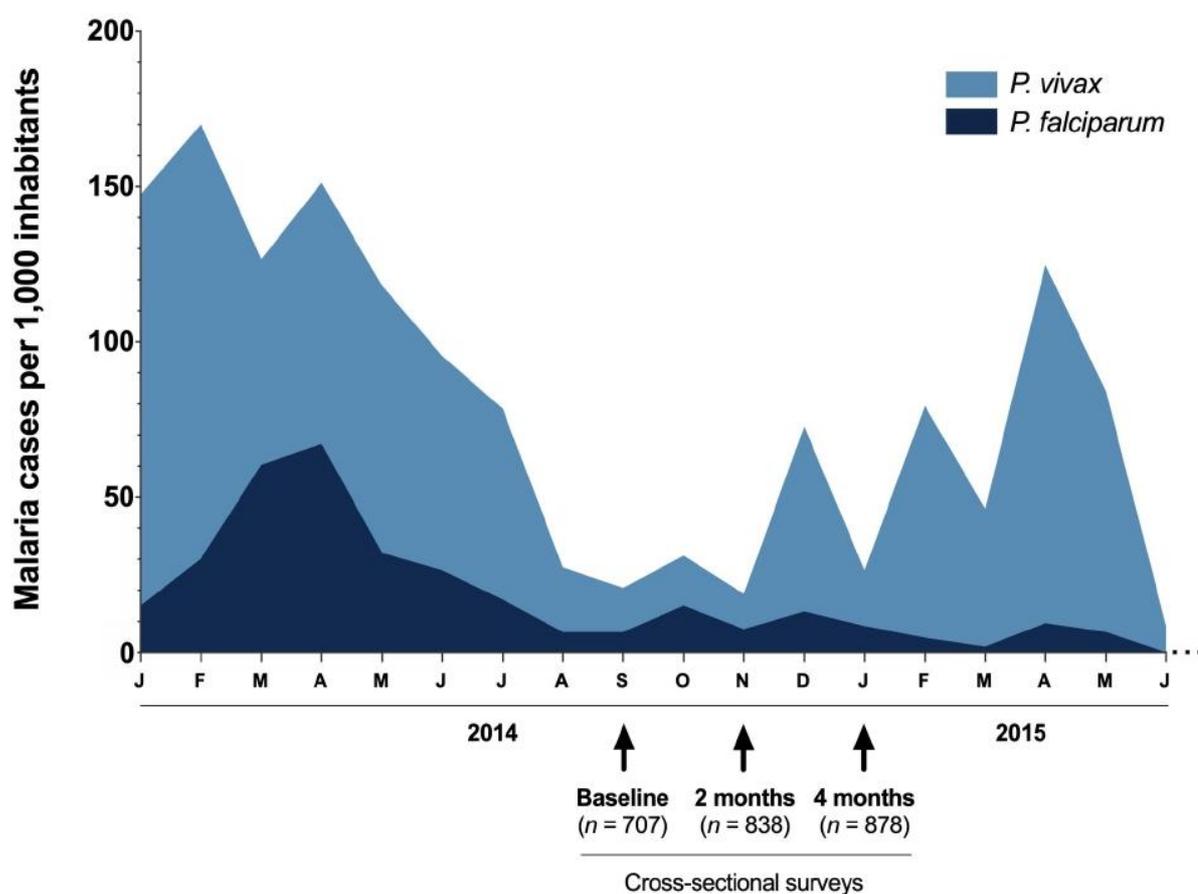


Fig 2. Monthly-time series of microscopically-confirmed malaria cases in the Marari community of the Yanomami indigenous area (Amazonas, Brazil) during the study period, 2014–2015. The study design included three cross-sectional surveys: the first survey (baseline) was carried out in September 2014, the second in November 2014 (2 months later) and the third in January 2015 (4 months after the first baseline survey). Data are presented as microscopically-confirmed cases per 1,000 inhabitants, and were provided by the National Malaria Surveillance System Registry (SIVEP-Malaria) from the Brazilian Ministry of Health. Malaria infection caused by *P. vivax* (light blue) and *P. falciparum* (dark blue) are plotted by month.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g002>

community involved a bilingual interpreter that explained to the leaders and/or indigenous representatives, the purpose of the study, the procedures to be carried out, and requested written informed consent of each adult participant, or from the next of kin or guardians on the behalf of minors. Blood for malaria parasite detection was collected by finger prick during the surveys. A few drops of blood were placed directly from the finger prick onto either a glass slide for preparation of thick blood smears or Whatman FTA™ classic card (GE Healthcare Life Sciences) for dried blood spots (DBS). The blood spots were dried in open air for 15 min, and stored in zip-locked plastic bags containing desiccant, and then transported to the laboratory at Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) for malaria diagnosis by PCR. At enrollment, age and gender information were recorded for each participant. In total, 981 Yanomami individuals were enrolled in the study, with 707 (72%) recruited in the baseline, 838 (85.4%) during the 2nd survey (November 2014) and 878 (89.5%) in the 3rd survey (January 2015). During the follow-up period, the minimum and maximum number of participants per village ranged from 197 to 235 (Taibrapa I/II), 174 to 231 (Gasolina), 122 to 154 (Alapusi) and 214 to 282 (Castanha/Ahima). A total of 859 (87.5%) individuals participated in at least two cross-sectional surveys, and 583 (59.4%) subjects were present in all three-cross sectional surveys.

In the current study, malaria infection was defined as the occurrence of any confirmed malaria infection with or without symptoms according to the general guidelines proposed by the WHO Malaria Policy Advisory Committee [14]. Malaria infections were confirmed by either conventional light microscopy (microscopically-confirmed cases) or species-specific PCR-based assays (submicroscopic infections). As malaria symptoms were not evaluated in the study population, the terms “submicroscopic” and “asymptomatic” infection cannot be used interchangeably. Here, submicroscopic infections refer to low density malaria infections below the limit of detection of microscopy, as proposed by the WHO Evidence Review Group on Low-Density Malaria Infections [15]

Microscopic diagnosis

Thick blood smears were stained with 10% Giemsa solution in phosphate buffer solution at pH 7.2, and examined by light microscopy at the health facilities in Marari by trained microscopists, according to the malaria diagnosis guidelines of the Brazilian Ministry of Health [16]. All microscopically positive cases were treated immediately for malaria, according to the treatment guidelines of the Brazilian Ministry of Health [17].

Molecular diagnosis

DNA extraction. Genomic DNA was extracted from DBS on FTA paper using a commercial extraction kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen), according to manufacturer’s instructions. DNA was eluted in 150 μ l of AE Buffer and stored at $-2000\text{B}0030\text{C}$ until it was used in the experiments. As an internal control for the DNA extractions, 10% of the extracted samples were submitted to a PCR assay for the amplification of a constitutive human gene (ABO blood group) using primers previously described [18], with modifications for a real-time PCR assay.

Detection of *Plasmodium* species by PCR-based protocols. In order to improve the sensitivity of molecular detection of malaria infection, each sample was submitted to at least two PCR-based assays targeting the amplification of different plasmodial genes, i.e., the widely used *18S small subunit ribosomal RNA (18S SSU rRNA)* [19] and multi-copy non-ribosomal sequences for the detection of *P. vivax (Pvr47)* and *P. falciparum (Pfr364)* [20]. The non-ribosomal PCR assays may identify co-infections that could be missed by the ribosomal PCR assay [21]. Detailed PCR-based protocols are included as Supporting Information (S1 File). Briefly, the real-time PCR amplification of non-ribosomal targets was conducted using species-specific TaqMan™ probes and the protocol as we described recently [21]. The amplification of *18S SSU rRNA* was carried-out using the protocol described by Rougemont and colleagues with modification [22], which includes a pair of genus-specific primers with three different internal species-specific TaqMan™ probes, one each for *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae*. In case of discordance between the different PCR protocols, samples were submitted to an additional third PCR protocol also based on amplification of *18S SSU rRNA*, as described previously [23]. If no consensus was obtained between the PCR assays, samples were considered as only genus-positive (*Plasmodium* spp.). Concordance between at least two species-specific amplifications was considered the minimum criteria to define mixed-species *Plasmodium* infection.

Statistical analysis

Demographic, epidemiological and parasitological data were entered into a database created using the Epi Info™ software (Atlanta, GA, USA). For statistical analyses, the following variables were taken into consideration: gender, age, village of origin, malaria infection status at enrollment and during the follow-up. Proportions were compared using 2x2 contingency

tables with either chi-squared tests, adjusted by Yates' continuity correction or Fisher's exact tests, as appropriate. Odds ratios (OR) were used to quantify the strength of the association between variables. The statistical significance threshold was $P < 0.05$, with 95% confidence intervals for all hypothesis tests. These analyses were performed using GraphPad InStat, version 3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Malaria infection at enrollment

In our first baseline survey conducted in September 2014, we assessed malarial infection in 707 Yanomami individuals from Marari, with a median age of 14 years (IQR 6–33 years; range 1–79 years) and a male:female ratio of 1:1 (Table 1). Although the number of inhabitants varied between villages (from 122 to 214), subjects were matched by age and gender. The frequency of malaria infection, as detected by optical microscopy, was 1.55% (11 out of 707), ranging from 0.46 to 2.3% between the villages (Table 1). Considering PCR-based protocols, the proportion of positives was higher at 5.95% (42 out of 707), with significant differences between villages that ranged from 1.4% (Castanha/Ahima) to 12.2% (Taibrapa-II) (Table 1). Specifically, the likelihood of having malaria was significantly higher in Taibrapa-II (OR = 9.8, 95% CI 3.05–31.11, $P < 0.0001$) and Gasolina (OR = 5.2, 95% CI 1.64–17.49; $P = 0.0068$) compared with Castanha/Ahima (Fig 3), while the odds of having malaria infection were not significantly different between Alapusi and Castanha/Ahima.

Overall, at enrollment, a similar proportion of *P. vivax* and *P. malariae* infections (35–33%) were found in the study population, followed by *P. falciparum* (16%) and then mixed infections (9%). Of particular interest, *P. malariae* infections were largely restricted to Taibrapa-II village, i.e., 12 out of all 14 *P. malariae* cases detected, suggesting highly localized transmission. Four out of the total of 43 detected infections were mixed: *P. malariae* was present in all 4 of

Table 1. Baseline demographic, epidemiological and parasitological data from the first survey of the Yanomami villages studied in the Marari community, Amazonas, Brazil, conducted in September 2014.

	Characteristics at enrollment				
	Taibrapa-II* (n = 197)	Gasolina (n = 174)	Alapusi (n = 122)	Castanha/ Ahima** (n = 214)	Total (n = 707)
Gender ratio male:female	1:1.05	1:0.74	1:0.79	1:1.39	1:1
Age (years)					
Median (IQR)	15 (6–35)	12 (5–30)	13 (6.25–31)	15 (8–33.25)	14 (6–33)
Range	1–76	1–69	1–76	1–79	1–79
Malaria infection, positive (%)					
Microscopy***	4 (2.0)	4 (2.3)	2 (1.6)	1 (0.46)	11 (1.55) [§]
PCR-based protocols	24 (12.2)	11 (6.3)	4 (3.3)	3 (1.4)	42 (5.95) [§]
Total	24 (12.2) ^a	12 (6.9) ^{ac}	4 (3.3) ^{bc}	3 (1.4) ^b	43 (6.1)

IQR = interquartile range.

Microscopy (thick blood smears).

PCR = polymerase chain reaction.

* At the baseline, the inhabitants of Taibrapa were temporarily located in their alternative dwelling (Taibrapa-II).

** Marari Health Unit.

*** No statistical differences (Chi-square test, $P = 0.4614$).

^{§-§} Different symbols indicate statistically significant differences between microscopy and PCR (Fisher's exact test, $P < 0.05$).

^{a-b-c} Different letters indicate statistically significant differences between the positivity per village (Fisher's exact test, $P < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.t001>

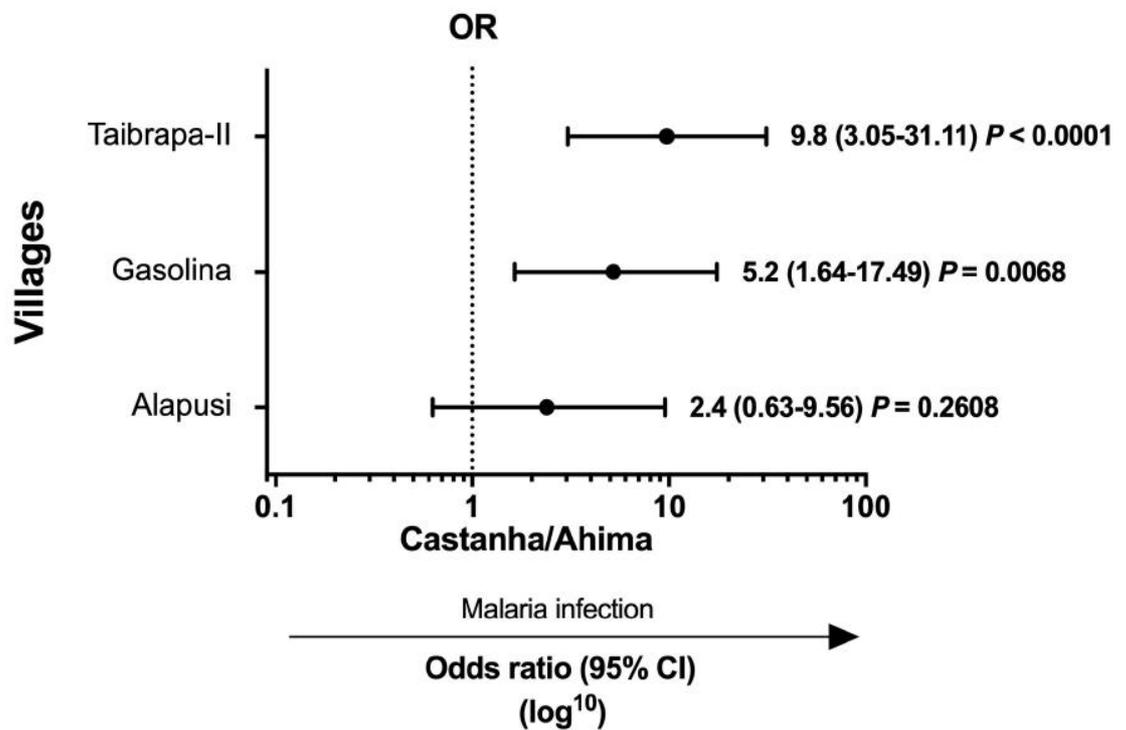


Fig 3. Odds ratios (ORs) for the relative risk of malaria infection in each village compared with Castanha/Ahima (the village with the lowest number of malaria infections, used as the reference). At first baseline survey, the inhabitants of Taibrapa were temporarily located in their alternative residence (Taibrapa-II). Crude OR were obtained by using 2x2 contingency tables with a 95% confidence interval (CI). $P < 0.05$ was considered significant. Malaria infection was confirmed by either conventional light microscopy (microscopically-confirmed cases) or species-specific PCR-based assays (submicroscopic or low-density infections).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g003>

these mixed infections, while two had *P. vivax* and two *P. falciparum*. In three malaria-positive samples, inconsistencies between different species-specific molecular methods did not allow diagnosis of the particular *Plasmodium* species (i.e., the infections could only be diagnosed as genus-positive).

Only microscopy detected malaria infections in individuals below 16 years old (Fig 4), while PCR-based protocols were able to detect submicroscopic infections in all age groups—including individuals above of 50 years old—showing that submicroscopic malaria infection was prevalent among both children and adults (Fisher's exact test $P > 0.05$ for all comparisons between the different age groups) (Fig 4). The frequency of malaria infection was similar between genders (S1 Fig).

Spatial and temporal dynamics of malaria prevalence

As the majority of malaria infections among the Yanomami were submicroscopic, we sought to evaluate the spatial and temporal dynamics of malaria infection two and four months after the first baseline survey. At these later times, the inhabitants of Taibrapa-II village were now located in their alternative residence Taibrapa-I (Fig 1).

We observed that the number of malaria infections fluctuated both spatially and temporally during the 4 month follow-up period, reflecting areas and periods with decreased (2nd survey) and then increased (3rd survey) malaria positivity (Fig 5). Although malaria positivity varied among villages (S1 Table), all cross-sectional surveys were characterized by a predominance of submicroscopic infection. More specifically, while the overall prevalence of microscopic

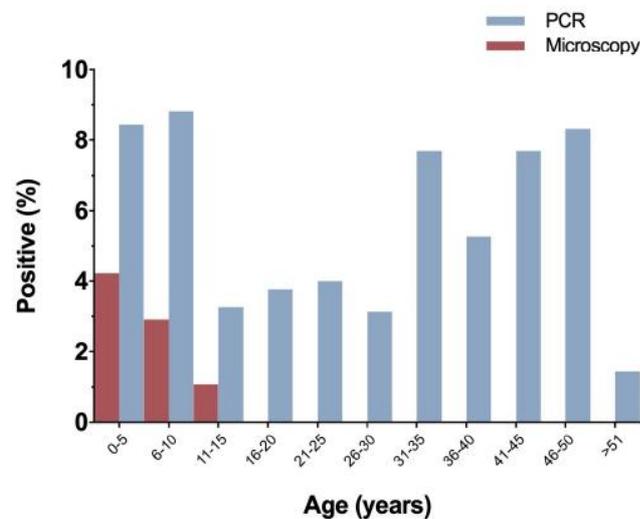


Fig 4. Prevalence of microscopic and submicroscopic malaria infection stratified by age at baseline survey. Submicroscopic infections were determined by PCR-based protocols (PCR) and microscopic infections by conventional Giemsa-stained thick blood smears (Microscopy).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g004>

infections ranged from 0.7 to 2%, PCR ranging from 3.6 to 8.7% (Fig 5), which corresponded to a four to five-fold increase in the prevalence of malaria.

The prevalence of the three detected *Plasmodium* species also varied during the study period (Fig 6). While the prevalence of *P. vivax* and *P. malariae* were similar during the first baseline survey, *P. vivax* infections predominated at the time of the 2nd and 3rd cross-sectional surveys. A decrease in the prevalence of *P. malariae* infections at the time of the 2nd survey—that occurred concomitantly with the migration of the inhabitants of Taibrapa to their

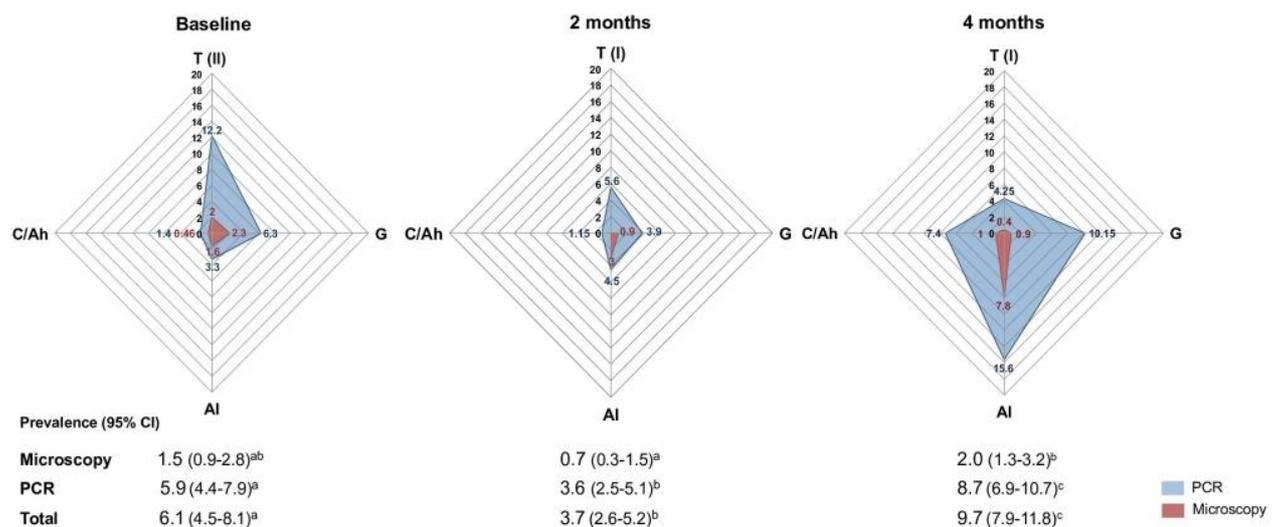


Fig 5. Radar charts showing the malaria prevalence by village over the 4-month study period. Three cross-sectional surveys were carried as described in the legend of Fig 2 (baseline, and then 2 and 4 months later). On each radar chart the data are shown as the percentage of individuals positive by either conventional microscopy or PCR-based methods. The 4 Yanomami villages are represented as Taibrapa (T-I or T-II, according to the alternative residences used by the Yanomami during the study), Gasolina (G), Alapusi (Al) and Castanha/Ahima (C/Ah). The overall percentage of positive individuals and their 95% confidence intervals for each survey are shown underneath their respective radar charts, with different letters (a-c) indicating statistically significant differences between the surveys (Fisher's exact test, $P < 0.05$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g005>

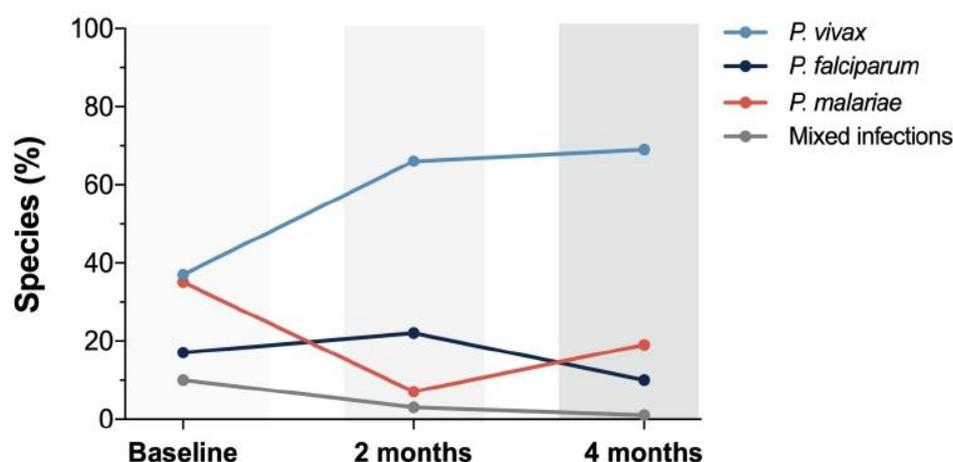


Fig 6. Comparison of the frequency of species-specific positivity (*P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum* and mixed infections) during the study period (baseline, 2 and 4 months later).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g006>

alternate residence—resulted in a temporary increase in the prevalence of *P. falciparum* over *P. malariae*. Regardless of the cross-sectional survey, the distributions of the species-specific prevalences of malaria infection by age confirmed that microscopic infections were only present in those under 16 years old, while submicroscopic infections were prevalent in all age groups (Fig 7).

Consecutive blood samples taken from the 859 Yanomami studied allowed us to evaluate within-individual variation in malaria positivity by either microscopy or PCR-based methods. Of the 143 (16.6%) individuals who were positive to malaria at any time during the study (S2 Fig), only 12 (8.4%) had an additional positive sample, most of which were detected using PCR-based protocols (S2A Fig) and were from young children (median age 3 yrs). With regard to single-sample positivity, 35 (24.5%), 22 (15.4%) and 74 (51.7%) individuals were positive to malaria at either the 1st, 2nd or 3rd survey, respectively (S2B–S2D Fig). The median age of individuals with a single positive sample ranged from 9 to 11 years old, and there was no statistically significant difference between this age group and those of young children who had consecutive positive samples (3 vs 9–11 yrs).

Discussion

Although malaria is known to cause a significant burden of disease for many populations of indigenous people in Latin America, inequitable access to healthcare leads to sparse and fragmented data on malaria prevalence [7], which are likely to be underestimates due to the use of conventional diagnosis by light microscopy. In order to provide more realistic estimates of malaria prevalence among the Yanomami of the Amazon, we longitudinally surveyed both microscopic and submicroscopic malaria infections in four villages of the Marari community in northern Brazil. Using distinct multi-copy PCR-based protocols—ribosomal and more sensitive non-ribosomal targets [21]—it was possible to demonstrate that in this group of semi-isolated people approximately 75% to 80% of all malaria infections were submicroscopic, with the ratio of submicroscopic to microscopic infections remaining stable overtime. These results are important for disease control in the Brazilian Amazon region as individuals with submicroscopic malaria infection are likely to be asymptomatic and, therefore, remain an untreated and potentially infectious reservoir [24]. The limited previously available data similarly report relatively high prevalences of submicroscopic malaria infection among other communities of

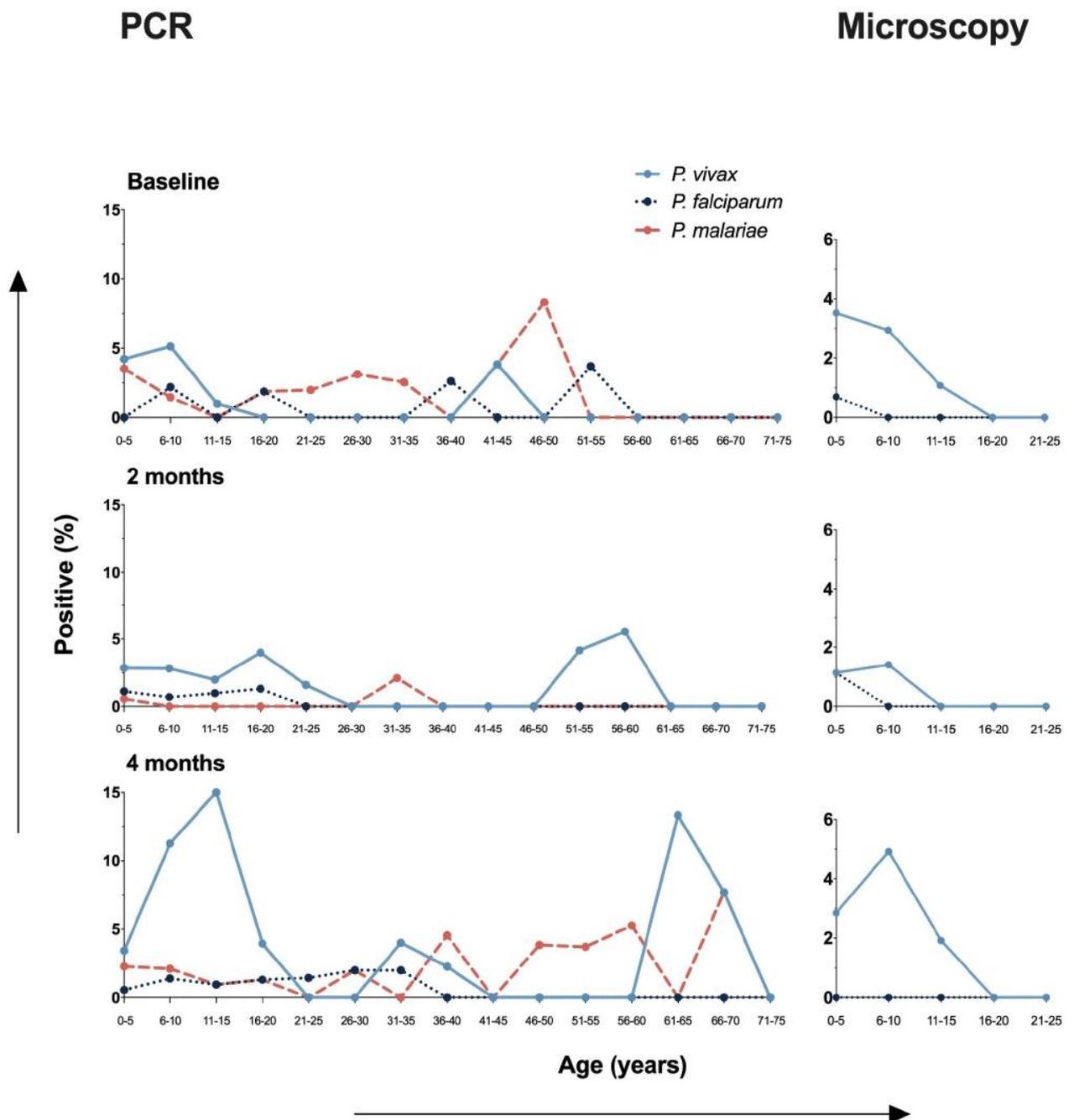


Fig 7. Species-specific malaria positivity stratified by age during the 4 month study period (baseline, 2 and 4 months later). Infections caused by *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* were determined by microscopy and/or PCR-based protocols, as described in the methods.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230643.g007>

indigenous people in the region close to the border of the Brazilian Amazon, particularly in Venezuela, for which most data are available [11, 25]. Although there is currently no consensus regarding the contribution of submicroscopic malaria infection to the maintenance of malaria transmission, recent findings indicate that such infections may (i) appreciably contribute to the infectious reservoir, (ii) be long-lasting, and (iii) require more sensitive diagnostics in epidemiological settings with lower transmission [26]. Although our findings highlight that

molecular diagnosis is more appropriate for the estimation of the prevalence of malaria in indigenous people in the Amazon, surveillance of malaria infection remains a considerable challenge in hard to reach isolated populations [2].

With regard to gender-related malaria positivity, we detected a similar prevalence of infection in males and females. This result was not completely unexpected as in Yanomami areas, in which transmission predominates outdoors around dwellings, socio-cultural habits and the nomadic behavior of large family groups may result in similar levels of exposure for both sexes [25, 27]. In forest-dwelling people, it has been shown that the cultural activities of the entire family in close proximity of their house during the peak hours of vector activity (e.g., going to the river early in the morning to bathe) may facilitate exposure to infection [28]. In addition, the inhabitants of each Yanomami village reside under a single, temporary, non-partitioned communitarian house (roughly 200 people per “shabono”), built in clearings in the forest, which may also promote equal exposure of males and females to infected mosquito bites. Submicroscopic malaria infection was also equally prevalent among adults and children, but microscopically-detectable parasitemia was identified exclusively in children and adolescents (<16 years old). Due to the limited sensitivity of light microscopy at low parasite densities [29], it is possible to postulate an increased susceptibility of children and adolescents to acute malaria with high levels of parasitemia. Although the current study was not designed to investigate malaria morbidity, our findings are consistent with previous reports showing that severe cases of malaria in Yanomami communities usually occur in children under 10 years old [30]. According, a recent overview of the current state of health of indigenous populations in Latin America confirmed the unfavorable scenario for children and adolescents of persistent high morbidity and mortality rates from infectious and parasitic diseases [31].

In the current study, the prevalence of malaria differed considerably among the Yanomami villages, suggesting high heterogeneity in malaria transmission at both spatial and temporal micro-scales. Local variability in natural breeding habitats of anophelines may account for differences in malaria prevalence between villages and surveys. In a previous study, we described a wide variety of larval microhabitats in the Yanomami area, including river-associated lakes, temporary pools of rainwater and flooded areas, as well as forest streams and rivers [10]. Consequently, different larval habitats with different intrinsic characteristics may result in a high heterogeneity in larval density and *Anopheles* species between indigenous villages and communities [8]. Additionally, as the inhabitants of a given Yanomami village periodically travel as a single large group, exposure to anopheline vectors may also fluctuate according to the time they spend in different residences. During the current study, for example, the inhabitants of Taibrapa traveled between their alternative residences (from Taibrapa-II to I). Coincidentally, we detected a significant decrease in malaria prevalence among the inhabitants of Taibrapa (between the 1st baseline to 2nd cross-sectional survey), possibly reflecting differences in vector exposure between the residences. In addition, infections may be short-lived, and/or the re-introduction of malaria parasites may take time for local transmission to re-establish itself. Overall, our findings are important for guiding and implementing surveillance and control measures, as they indicate that particular locations (i.e., villages) and specific periods of time may be most appropriate for intervention.

Screening for species-specific malaria infections in consecutive cross-sectional surveys confirmed that *P. vivax* is the predominant malaria parasite species circulating in our study area, with regard to both microscopic and submicroscopic infection. *Plasmodium vivax* may be able to persist in the human population since it can relapse after variable periods of dormancy [32] and because attempts at radical cure with primaquine often fail in isolated communities. Indeed, *P. vivax* is typically the most prevalent species in the Amazon area, and the results

presented here are consistent with its historical predominance in indigenous areas, previously detected mainly by routine Giemsa-stained microscopy [7, 27, 30].

Although there was some variation in the prevalence of *P. malariae* between villages and surveys, the molecular protocols we used confirmed that *P. malariae* is present and a frequently detected malaria parasite species in our study area. Previous assessment of malaria infection in the Yanomami indigenous territory also reported the circulation of *P. malariae* in indigenous populations [11, 30, 33], which typically occurs in sympatry with other species of *Plasmodium* [34]. Despite this, only low levels of mixed infection were detected by us, although all but one of them (5 out of 6) included *P. malariae*. The occurrence of human *P. malariae* infection in the forested areas inhabited by the Yanomami is consistent with the possibility that monkeys may be acting as reservoirs, as *P. malariae* appears to be the same species as *P. brasilianum*, which is a malaria parasite commonly found in New World monkeys [35]. Given that *P. malariae* can be associated with renal complications, including acute kidney injury and glomerulopathies (reviewed in [36]), our findings indicate that the effects of this malaria parasite species on indigenous people in the Amazon should be systematically investigated.

Although *P. falciparum* was much less prevalent than *P. malariae*, the results described here demonstrated that this most pathogenic malaria parasite was present in all the villages studied and infected young children. This is important because in the Venezuelan Amazon rainforest, *P. falciparum* has been reported to have a higher prevalence among the Yanomami than other ethnic groups [33]. Unfortunately, as illegal mining and timber operations have moved into the forests of the Yanomami indigenous territory, the periodic introduction of *P. falciparum* has increased [37]. Future studies are needed to evaluate the impact of this increased exposure to *P. falciparum* on the health of Yanomami children.

Finally, our longitudinal study provided an exceptional opportunity to explore changes in malaria parasite positivity over a 4 month follow-up period. Our results showed that only 8% of all positive individuals remained positive in subsequent surveys, with most of such individuals being very young children (median age 3 years old). This observation—together with microscopic malaria infections being more frequent in young children—is consistent with naturally-acquired immunity increasing with age in the Yanomami population as a function of increased exposure to malaria parasites. Clinical immunity to malaria is known to be acquired after repeated parasite exposure, but its rate of acquisition varies widely depending on the intensity of transmission and geographical setting (reviewed in [38]). Our data fit this epidemiological pattern, with malaria parasite densities within infected individuals not remaining constant, but fluctuating and declining with increasing age, and then eventually falling below the detection threshold of molecular assays [39]. Although we were not able to genotype malaria infections over time, it has been suggested that acquired immunity controls transmission mainly by limiting blood-stage parasite densities rather than changing rates of acquisition or clearance of infections [40]. Future studies of the Yanomami could evaluate individual infections based on the patterns of persistence of individual genotypes (i.e., monitor fluctuations in clone-specific malaria parasite density).

The current study had some limitations that should be taken into consideration when interpreting its results. Regarding the best time for consecutive sampling, a major challenge was the remote location of the Yanomami villages within the Amazon forest, whose accessibility is seasonal and dependent on small planes and local boats. Seasons in the Amazon rainforest are not well-defined, and it is divided into the dry season and the wet season, each lasting about six months. Despite this, our cross-sectional surveys covered months of both the dry season (September and November) and the rainy season (January). Consequently, we are confident that the results presented here are representative of temporal variation in malaria prevalence

associated with dry/wet seasons. Overall, our results confirm that molecular methods are a much more sensitive diagnosis tool than traditional light microscopy for the identification of malaria infection among the Yanomami, which are characterized by low-density parasitemias and the circulation of multiple malaria parasite species. Unfortunately, a suitable protocol for nucleic acid amplification (NAATs) in the field is not available yet [41]. Thus, innovative solutions and cost-effective strategies that can accurately identify the real burden of malaria infection in remote and isolated areas are urgently required as part of the global initiative for malaria elimination [42].

Supporting information

S1 File. Conditions for the different PCR-based protocols used to amplify genes from *P. vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae*.
(DOCX)

S1 Fig. Prevalence of malaria according to age group (years) and gender (male and female). Malaria positivity was defined by PCR-based protocols (PCR) or by conventional light microscopy (Microscopy). The number (*n*) of individuals in each age group is represented in the respective bars.
(TIFF)

S2 Fig. Species-specific malaria positivity of each positive individual who participated during the cross-sectional surveys. Each row represents a single individual coded (#) and grouped according to their profile of positive samples in each of the three cross-sectional surveys (columns I, II and III, respectively, of the colored matrix). (A) shows individuals who were positive in at least two of the three cross-sectional surveys (*n* = 12). (B), (C) and (D) show individuals who were positive in only one of the three cross-sectional surveys: either (B) the 1st baseline survey (I; *n* = 35), (C) the 2nd survey (II, *n* = 22) or (D) the 3rd survey (III; *n* = 74). Species-specific PCR positivity is represented using different colors, as indicated in the legend: *P. vivax* (Pv) in light blue; *P. falciparum* (Pf) in dark blue; *P. malariae* (Pm) in orange; and mixed infections by the other different colors. The dark dot (•) inside each square indicates positivity by microscopy as well as PCR, while the asterisks (*) indicate positivity only by microscopy. Individual age, gender and place of dwelling were included in the left part of figure. Each village was coded as according to the legend of Fig 5.
(TIF)

S1 Table.
(TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank the Yanomami people for participating in this study and for their help in many ways during the fieldwork, the Secretaria Especial de Saúde Indígena (SESAI) and DSEI-Y and their employees for logistic support and assistance with the fieldwork, the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of the Real-Time PCR (RPT09D) facility, and Dr. Luke A. Baton for revising the manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Daniela Rocha Robortella, Cristiana Ferreira Alves de Brito, Tais Nobrega de Sousa, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.

- Data curation:** Daniela Rocha Robortella, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Formal analysis:** Daniela Rocha Robortella, Lara Cotta Amaral, Luiz Felipe Ferreira Guimarães, Michelle Hallais França Dias, Tais Nobrega de Sousa, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Funding acquisition:** Mariza Maia Herzog, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Investigation:** Daniela Rocha Robortella, Anderson Augusto Calvet, Cristiana Ferreira Alves de Brito, Mariza Maia Herzog, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Methodology:** Daniela Rocha Robortella, Anderson Augusto Calvet, Lara Cotta Amaral, Raianna Farhat Fantin, Luiz Felipe Ferreira Guimarães, Michelle Hallais França Dias, Cristiana Ferreira Alves de Brito, Tais Nobrega de Sousa, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Project administration:** Mariza Maia Herzog, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Resources:** Cristiana Ferreira Alves de Brito, Mariza Maia Herzog, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Supervision:** Mariza Maia Herzog, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Validation:** Daniela Rocha Robortella, Lara Cotta Amaral, Raianna Farhat Fantin, Luiz Felipe Ferreira Guimarães, Michelle Hallais França Dias, Cristiana Ferreira Alves de Brito, Tais Nobrega de Sousa, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Visualization:** Daniela Rocha Robortella.
- Writing – original draft:** Daniela Rocha Robortella, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.
- Writing – review & editing:** Daniela Rocha Robortella, Anderson Augusto Calvet, Lara Cotta Amaral, Raianna Farhat Fantin, Luiz Felipe Ferreira Guimarães, Michelle Hallais França Dias, Cristiana Ferreira Alves de Brito, Tais Nobrega de Sousa, Mariza Maia Herzog, Joseli Oliveira-Ferreira, Luzia Helena Carvalho.

References

1. WHO (2018) World Malaria Report 2018. Geneva: World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275867/9789241565653-eng.pdf?ua=1>. Accessed 9 Apr 2019.
2. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG (2017) Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J* 16:273. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6> PMID: 28676055.
3. WHO (2019) World Malaria Report 2019. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>. Accessed 20 Dec 2019.
4. Siqueira AM, Mesones-Lapouble O, Marchesini P, Sampaio VS, Brasil P, Taul PL, et al. (2016) Plasmodium vivax Landscape in Brazil: Scenario and Challenges. *Am J Trop Med Hyg* 95: 87–96. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0204> PMID: 27708190.
5. Leandro-Reguillo P, Thomson-Luque R, Monteiro WM, de Lacerda MV (2015) Urban and architectural risk factors for malaria in indigenous Amazonian settlements in Brazil: a typological analysis. *Malar J* 14:284. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0806-0> PMID: 26194898.
6. Ministry of Health of Brazil (2018) Malaria epidemiologic status in Brazil. Brazil: Ministry of Health of Brazil. https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/agosto/30/3.c-malaria_CIT_30_ago_2018_cassiopeterka.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
7. Grenfell P, Fanello CI, Magris M, Goncalves J, Metzger WG, Vivas-Martinez S, et al. (2008) Anaemia and malaria in Yanomami communities with differing access to healthcare. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(7):645–52. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.02.021> PMID: 18405929.

8. Sanchez-Ribas J, Oliveira-Ferreira J, Gimnig JE, Pereira-Ribeiro C, Santos-Neves MSA, Silva-do-Nascimento TF (2017) Environmental variables associated with anopheline larvae distribution and abundance in Yanomami villages within unaltered areas of the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors* 10(1):571. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2517-6> PMID: 29145867.
9. Mondolfi AEP, Grillet ME, Tami A, Oliveira-Miranda MA, Noguera LD, Hotez P, et al. (2019) Venezuela's upheaval threatens Yanomami. *Science* 365(6455):766–7. <https://doi.org/10.1126/science.aay6003> PMID: 31439788.
10. Sanchez-Ribas J, Oliveira-Ferreira J, Rosa-Freitas MG, Trilla L, Silva-do-Nascimento TF (2015) New classification of natural breeding habitats for Neotropical anophelines in the Yanomami Indian Reserve, Amazon Region, Brazil and a new larval sampling methodology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(6):760–70. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150168> PMID: 26517655.
11. Lalremruata A, Magris M, Vivas-Martinez S, Koehler M, Esen M, Kempaiah P, et al. (2015) Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine* 2(9):1186–92. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.033> PMID: 26501116.
12. Vega CM, Orellana JDY, Oliveira MW, Hacon SS, Basta PC (2018) Human Mercury Exposure in Yanomami Indigenous Villages from the Brazilian Amazon. *Int J Environ Res Public Health* 8; 15(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph15061051> PMID: 29789499.
13. Sánchez-Ribas J (2015) Aspectos ecológicos da transmissão da malária em área indígena Yanomami. Ph.D. Thesis. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Fundação Oswaldo Cruz.
14. WHO (2016) WHO Malaria terminology. Geneva: World Health Organization. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208815/WHO_HTM_GMP_2016.6_eng.pdf;jsessionid=0E04CF71BBECAF2D970CA975EDE65F0?sequence=1. Accessed 20 Dec 2019.
15. WHO (2017) Meeting report of the WHO Evidence Review Group on Low-Density Malaria Infections. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/malaria/mpac/mpac-oct2017-erg-malaria-low-density-infections-session2.pdf?ua=1>. Accessed 20 Dec 2019.
16. Ministério da Saúde (2009) Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/malaria_diag_manual_final.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
17. Ministério da Saúde (2010) Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf. Accessed 9 Apr 2019.
18. Olsson M, Hansson C, Avent N, Akesson I, Green C, Daniels G (1998) A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (FY) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. *Transfusion* 38(2):168–73. <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.38298193099.x> PMID: 9531948.
19. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaihong S, Brown K (1993) 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. *Mol Biochem Parasitol* 58(2):283–92. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90050-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90050-8) PMID: 8479452.
20. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. (2011) Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. *J Clin Microbiol* 49(7):2411–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.02603-10> PMID: 21525225.
21. Amaral LC, Robortella DR, Guimaraes LFF, Limongi JE, Fontes CJF, Pereira DB, et al. (2019) Ribosomal and non-ribosomal PCR targets for the detection of low-density and mixed malaria infections. *Malar J* 18(1):154. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2781-3> PMID: 31039781.
22. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K (2004) 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* 42(12):5636–43. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5636-5643.2004> PMID: 15583293.
23. Costa DC, Madureira AP, Amaral LC, Sanchez BA, Gomes LT, Fontes CJ, et al. (2014) Submicroscopic malaria parasite carriage: how reproducible are polymerase chain reaction-based methods? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(1):21–8. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140102> PMID: 24626306.
24. Almeida ACG, Kuehn A, Castro AJM, Vitor-Silva S, Figueiredo EFG, Brasil LW, et al. (2018) High proportions of asymptomatic and submicroscopic *Plasmodium vivax* infections in a peri-urban area of low transmission in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors* 11(1):194. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2787-7> PMID: 29558985.
25. Laserson KF, Petralanda I, Hamlin DM, Almera R, Fuentes M, Carrasquel A, et al. (1994) Use of the polymerase chain reaction to directly detect malaria parasites in blood samples from the Venezuelan Amazon. *Am J Trop Med Hyg* 50(2):169–80. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.169> PMID: 8116809.

26. Slater HC, Ross A, Felger I, Hofmann NE, Robinson L, Cook J, et al. (2019) The temporal dynamics and infectiousness of subpatent *Plasmodium falciparum* infections in relation to parasite density. *Nat Commun* 10(1):1433. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09441-1> PMID: 30926893.
27. Laserson KF, Wypij D, Petralanda I, Spielman A, Maguire JH (1999) Differential perpetuation of malaria species among Amazonian Yanomami Amerindians. *Am J Trop Med Hyg* 60(5):767–73. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.767> PMID: 10344650.
28. Sá DR, Souza-Santos R, Escobar AL, Coimbra CE Jr (2005) Malaria epidemiology in the Pakaanova (Wari) Indians, Brazilian Amazon. *Bull Soc Pathol Exot* 98(1):28–32. PMID: 15915970.
29. Payne D (1988) Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ* 66(5):621–6. PMID: 2463112.
30. Marcano TJ, Morgado A, Tosta CE, Coura JR (2004) Cross-sectional study defines difference in malaria morbidity in two Yanomami communities on Amazonian boundary between Brazil and Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(4):369–76. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762004000400005> PMID: 15322625.
31. Tavares FG, Ferreira AA (2019) The health of indigenous children and adolescents in Latin America. *Cad Saude Publica* 35 Suppl 3 (Suppl 3). <https://doi.org/10.1590/0102-311X00130819> PMID: 31433036.
32. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, et al. (1982) Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg* 31(6):1291–3. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1982.31.1291> PMID: 6816080.
33. Metzger WG, Vivas-Martinez S, Rodriguez I, Goncalves J, Bongard E, Fanello CI, et al. (2007) Malaria diagnosis under field conditions in the Venezuelan Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(1):20–4. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.08.007> PMID: 17919672.
34. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC (2007) *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale*—the “bashful” malaria parasites. *Trends Parasitol* 23(6):278–83. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.04.009> PMID: 17459775.
35. Collins WE, Jeffery GM (2007) *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev* 20(4):579–92. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-07> PMID: 17934075.
36. Silva GBDJ, Pinto JR, Barros EJJ, Farias GMN, Daher EF (2017) Kidney involvement in malaria: an update. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 59:e53. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759053> PMID: 28793022.
37. Shanks GD (2016) Historical review: Does falciparum malaria destroy isolated tribal populations? *Travel Med Infect Dis* 14(6):646–51. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.08.003> PMID: 27555283.
38. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C (2014) Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol* 12(12):833–40. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3364> PMID: 25329408.
39. Nguyen TN, von Seidlein L, Nguyen TV, Truong PN, Hung SD, Pham HT, et al. (2018) The persistence and oscillations of submicroscopic *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections over time in Vietnam: an open cohort study. *Lancet Infect Dis* 18(5):565–72. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30046-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30046-X) PMID: 29398388.
40. Felger I, Maire M, Bretscher MT, Falk N, Tiaden A, Sama W, et al. (2012) The dynamics of natural *Plasmodium falciparum* infections. *PLoS One* 7(9):e45542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045542> PMID: 23029082.
41. WHO (2018) Nucleic acid amplification-based diagnostics. Geneva: World Health Organization. <https://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/nucleic-acid-amplification-tests/en/>. Accessed 9 Apr 2019.
42. Tedla M (2019) A focus on improving molecular diagnostic approaches to malaria control and elimination in low transmission settings: Review. *Parasite Epidemiol Control* 6:e00107. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00107> PMID: 31193331.