UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGBIOTEC)

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO MICROESFERAS PARA O DIAGNÓSTICO DE *Plasmodium vivax*

ADÉLIA MARQUES DE FIGUEIREDO

MANAUS

2022

ADÉLIA MARQUES DE FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO MICROESFERAS PARA O DIAGNÓSTICO DE *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração saúde.

Orientador: Dr. Luis André Morais Mariúba

MANAUS
2022

Ficha Catalográfica
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Figueiredo, Adélia Marques de
F475d Desenvolvimento de um ensaio de citometria de fluxo utilizando microesferas para o diagnóstico de Plasmodium vivax / Adélia Marques de Figueiredo . 2022
105 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Luis André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Malária. 2. Imunodiagnóstico. 3. Citometria de fluxo. 4. Microesferas. 5. Anticorpos policlonais. I. Mariúba, Luis André Morais. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ADÉLIA MARQUES DE FIGUEIREDO

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO DE CITOMETRIA DE FLUXO UTILIZANDO MICROESFERAS PARA O DIAGNÓSTICO DE *Plasmodium vivax*

Dissertação apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia na área de concentração saúde.

Aprovado em: 25 de abril de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luis André Morais Mariúba – Presidente

Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Dr. Allyson Guimarães da Costa – Membro

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dr. Edmar Vaz de Andrade – Membro

Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Com todo amor e gratidão dedico esse trabalho a minha querida mãe, Amélia, uma fonte inesgotável de amor, dedicação e apoio.

Dedico também ao meu amado esposo, Raoni. Sou feliz e grata por todo amor, apoio, companheirismo e cumplicidade recebidos durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, meu amigo e pai amoroso, que permitiu a conclusão deste trabalho, me oferecendo força todos os dias e colocando as pessoas certas para me instruir e ajudar. Durante a realização deste trabalho enfrentei as situações mais difíceis e inimagináveis, como enfrentar uma pandemia trabalhando na linha de frente da saúde, enfrentar um câncer e a perda de um familiar estimado. Agradeço pela graça de obter a minha cura e pela recuperação da minha saúde, por ter minha amada família, pelos amigos conquistados nesta jornada e pela conclusão de trabalho. Obrigado meu Deus, até aqui o senhor nos ajudou. Tenho a honra de dizer que não desisti!

Meus mais sinceros agradecimentos ao **Dr. André Mariúba**, meu orientador, muito obrigada pelos ensinamentos, pela imensa paciência, pela dedicação incansável e por todo apoio e compreensão nos momentos que precisei. Muito obrigada, que o senhor continue desenvolvendo com muito sucesso todos os seus projetos.

Ao meu amado e querido esposo, **Raoni**, agradeço de todo o meu coração. Companheiro em todos os momentos, meu grande incentivador, que nunca me deixou desistir. Obrigada pela ajuda e pelo apoio emocional em todas as etapas.

Aos meus pais, **Maria Amélia e Adalberto** (em memória), meus irmãos **Daiane, Viviane, Júnior e Jardel** e aos demais familiares, sou grata pelo amor e carinho recebidos, obrigada pela incessante torcida pelo meu sucesso. Amo vocês!

Meu agradecimento especial a minha amiga anjo, **Juliane Glória (Jully)**, digo e repito que sua amizade é meu presente de mestrado. Obrigada pelos ensinamentos e pela valiosa ajuda nos experimentos e na escrita da dissertação. Uma mulher admirável como você merece todo o esplendor da vida.

Ao responsável pela plataforma de citometria da Fiocruz - Amazônia, **Dr. Yury Chaves,** que recebeu e analisou todas as amostras do projeto. Obrigada pela colaboração, parceria e demais contribuições no trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, **Walter Neves, Edilene Martins, Késsia Alves, Danielle Mota, Caio Coutinho, Rachel Macedo, André Luís, Gabriela Vasconcelos, Jeniffer Lopes, Fernanda Batalha, Elizângela Farias.** Sem vocês tudo teria sido muito mais

difícil, agradeço pela ajuda nos experimentos, pelos momentos de descontração, pelos risos e abraços. Gratidão!

Aos meus amigos e companheiros de Pós-Graduação, **Daiane, Suziane, Mônica, Miriam, Adriana, Ednaldo, Thaissa, Samara, Jeanne.** Foi divertido estudar e dividir almoços com vocês. Tê-los como companhia nas aulas e nos intervalos deixou tudo mais leve, obrigada por toda ajuda.

Ao **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM),** ao **Dr. Edmar Vaz de Andrade** e a **Dra. Rosany Picolloto,** pelo auxílio nas questões burocráticas e pela compreensão frente aos problemas de saúde. Aos professores do programa pelo conhecimento transmitido.

Ao **Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD - FIOCRUZ AMAZÔNIA)**, pelo suporte estrutural e técnico imprescindível para a realização deste trabalho. Agradeço a todos os funcionários que auxiliaram durante o desenvolvimento do trabalho.

Sou imensamente grata a todos que direta ou indiretamente contribuíram, ajudaram e apoiaram a realização desse trabalho. Muitíssimo obrigada!

Enquanto houver vontade de lutar,
haverá esperança de vencer.

Santo Agostinho

RESUMO

A malária é uma doença infecto-parasitária de grande relevância na saúde pública global, relacionada à altas taxas de morbidade e mortalidade, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a região Amazônica é a mais atingida, com a prevalência de infecções causadas pelas espécies *Plasmodium vivax,* que é responsável por 85% dos casos no país, e *P. falciparum*. O desenvolvimento de novos métodos diagnósticos continua sendo de grande importância para o enfrentamento desta doença em busca de sua erradicação. No primeiro capítulo desta dissertação apresentamos um artigo de revisão, no qual evidenciamos as principais aplicações dos testes de citometria de fluxo baseada em microesferas para a detecção de doenças infecciosas e não-infecciosas. No segundo capítulo foi elaborado um artigo original no formato de *short communication*, a partir do desenvolvimento de um teste de citometria de fluxo utilizando microesferas de látex, visando a detecção do antígeno lactato desidrogenase de *P. vivax* (*Pv*LDH). Os testes de citometria foram realizados em 50 amostras de pacientes diagnosticados com malária causada por *P. vivax* e 40 amostras de indivíduos sadios. Ao ser analisado pela porcentagem de marcação de fluorescência, o ensaio apresentou sensibilidade de 64%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo de 97% e o valor preditivo negativo de 57%. Pela análise da média de intensidade de fluorescência (MFI), a sensibilidade foi de 53%, especificidade de 89%, valor preditivo positivo de 95% e o valor preditivo negativo de 33%. Nos dois métodos de análise foi evidenciada diferença estatística significativa entre os grupos analisados (valor-p < 0,0001). Foi observada uma alta correlação (0,60) entre os dois métodos e uma baixa correlação entre a concentração de *Pv*LDH e a densidade parasitária. O teste apresentou resultados mais promissores quando analisado pela porcentagem de marcação de fluorescência, sendo capaz de detectar a proteína *Pv*LDH com alta especificidade. No entanto, a sensibilidade ainda deve ser otimizada, o que possibilitaria, entre outras aplicações, a utilização do teste em ensaios sorológicos visando a detecção de pacientes assintomáticos e para confirmação de resultados de testes imunocromatrográficos.

Palavras chaves: malária, imunodiagnóstico, citometria de fluxo, microesferas, anticorpos policlonais.

ABSTRACT

Malaria is an infectious-parasitic disease of great importance in global public health, related to high rates of morbidity and mortality, especially in tropical and subtropical regions. In Brazil, the Amazon region is the most affected, with the prevalence of infections caused by the species *Plasmodium vivax,* which is responsible for 85% of cases in the country, and *Plasmodium falciparum*. The development of new diagnostic methods continues to be of great importance for fighting this disease in search of its eradication. In the first chapter of this dissertation we present a review article, in which we highlight the main applications of flow cytometry tests based on microspheres for the detection of infectious and non-infectious diseases. In the second chapter, an original article was prepared in the format of a short communication, based on the development of a flow cytometry test using latex microspheres, aiming at the detection of the P. vivax lactate dehydrogenase antigen (PvLDH). Cytometry tests were performed on 50 samples from patients diagnosed with malaria caused by *P. vivax* and 40 samples from healthy individuals. When analyzed by the percentage of fluorescence labeling, the assay had a sensitivity of 64%, specificity of 97%, positive predictive value of 97%, and negative predictive value of 57%. By analyzing the mean fluorescence intensity (MFI), the assay sensitivity was 53%, specificity 89%, positive predictive value 95% and negative predictive value 33%. In both methods of analysis, there was a statistically significant difference between the groups analyzed (p-value < 0.0001). A high correlation (0.60) between the two methods and a low correlation between *Pv*LDH concentration and parasite density were observed. The test showed more promising results when analyzed by the percentage of fluorescence labeling, being able to detect the *Pv*LDH protein with high specificity. However, sensitivity still needs to be optimized, which would make it possible, among other applications, to use the test in serological assays to detect asymptomatic patients and to confirm the results of immunochromatographic tests.

Key words: malaria, immunodiagnosis, flow cytometry, microspheres, polyclonal antibody.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do P. *falciparum*. 19
Figura 2- Mapa de risco de infecção por malária no Mundo em 2020. 22
Figura 3- Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2020, por município. 24
Figura 4- Histórico de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020. 25
Figura 5- Diagnóstico de malária por microscopia. 28
Figura 6- Reação catalisada pela enzima LDH 32
Figura 7- Princípios básicos do ELISA. 33
Figura 8- Componentes e interpretações para ensaio imunocromatográfico para malária. 34
Figura 9- Princípio do Ensaio de Citometria de fluxo com base em esfera. 35
Figura 10 - Anticorpo policlonal e monoclonal. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Plano de Eliminação da Malária no Brasil – Diagnóstico. 26

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µL	Microlitros
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CBA	Cytometric *bead* assay
EDAC	Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DCDIA	Diagnóstico e Controle e Doenças Infecciosas da Amazônia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
g	Grama
H	Hora
HRP	Histidine-rich proteins
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactato Desidrogenase
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milimetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
NHS	N-hidroxissuccinimida
nm	Nanômetros
ºC	Graus Ceusius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PEG	Polietilenoglicol
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RPM	Rotação por minuto
TMB	Tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....17
1.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA.....17
1.2 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium sp.*.....19
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....21
1.3.1 Malária no Brasil.....24
1.4 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA.....27
1.4.1 Diagnóstico por Microscopia.....27
1.4.2 Biossensores.....29
1.4.3 Diagnóstico Molecular.....29
1.4.4 Diagnóstico Sorológico.....30
1.4.4.1 Biomarcadores de infecção malárica aplicados em testes sorológicos.....30
1.4.4.3 Testes de Diagnóstico Rápido.....33
1.4.4.4 Citometria de Fluxo.....35
1.5 UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA.....37
2. OBJETIVOS.....39
2.1 OBJETIVO GERAL.....39
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....39
3. METODOLOGIA.....40
3.1 LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO.....40
3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão.....40
3.2 ASPECTOS ÉTICOS.....40
3.3 PROCEDIMENTOS.....40
3.3.1 Obtenção de Anticorpos policlonais Anti-*Pv*LDH de coelho e camundongo.....40
3.3.2 Citometria de fluxo.....41
3.3.2.1 Ativação das *beads*.....41
3.3.2.2 Acoplamento ao anticorpo de captura.....41
3.3.2.3 Bloqueio.....41
3.3.2.4 Testes com amostra de sangue dos pacientes utilizando anti-*Pv*LDH de coelho como captura e anti-*Pv*LDH de camundongo como primário.....41
3.3.2.5 Análise de sensibilidade e especificidade do teste.....42
CAPÍTULO I.....43

ARTIGO DE REVISÃO.....43
CAPÍTULO II.....67
ARTIGO ORIGINAL – *Short Communication*.....67
4. DISCUSSÃO GERAL.....79
5. CONCLUSÃO.....82
6. REFERÊNCIAS.....83
7. ANEXOS.....93
7.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP PARA AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS.....93
7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....100
7.3 TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO 104

INTRODUÇÃO

A malária é uma patologia considerada de grande relevância no cenário da saúde pública mundial, pois apesar dos importantes avanços no controle das infecções parasitárias, ainda há grande incidência em todo o mundo, predominando em países de clima tropical e subtropical (WHO, 2021). Essa enfermidade é causada por parasitos do gênero *Plasmodium spp*, que são inoculados durante repasto sanguíneo das fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles* (MILLER et al., 2002).

São seis espécies que podem causar malária em humanos: *Plasmodium ovale, Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium cynomolgi*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax* ((IMWONG et al., 2019; TA et al., 2014; WHO, 2016). Destas, as duas últimas são as maiores responsáveis pelos casos de malária no mundo, sendo o *P. falciparum* o responsável também pelo maior número de óbitos, principalmente no continente africano (WHO, 2021). No Brasil, estão presentes as espécies *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo que as duas últimas espécies mencionadas são responsáveis por 99% dos casos nacionais (BRASIL, 2021).

Em 2016, a Organização Mundial da Saúde divulgou uma iniciativa com o objetivo de impulsionar o controle e a eliminação da malária no mundo até 2030. O diagnóstico e o tratamento preciso e adequado na fase inicial da doença são componentes essenciais na estratégia para o controle da malária no mundo, pois propicia a interrupção na cadeia de transmissão e a consequente diminuição do número de casos e óbitos (WHO, 2016). Um dos objetivos do desenvolvimento de novos imunoensaios é superar as deficiências na detecção precoce e precisa da doença.

Apesar de a microscopia ser considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da malária, essa técnica exige pessoal treinado e experiente no exame de distensões sanguíneas e, em muitos locais, sobretudo em áreas de difícil acesso, não existem equipamentos para a realização do exame (JAIN et al.,2014; REIS et al., 2018).

Diversas frentes de pesquisa buscam novos métodos de diagnóstico para malária com alta sensibilidade e especificidade, a fim de introduzir métodos mais eficazes e com a capacidade de diagnosticar pacientes semi-imunes e com baixa parasitemia (WHO, 2020). Na última década, estudos direcionados a sorologia da malária ganharam importância e ensaios de citometria de fluxo multiplexados combinados às esferas mostraram-se como um método promissor para o diagnóstico da malária (ROGIER et al., 2019). Estes apresentam vantagens

específicas que incluem a detecção de analitos em níveis mínimos de concentração, a capacidade de detectar vários alvos em um único teste, a redução no tempo de processamento da amostra devido à cinética do ensaio e a diminuição dos custos envolvidos (SHAPIRO; ULRICH, 2010; ONDIGO et al., 2019).

A obtenção de anticorpos contra antígenos maláricos para o desenvolvimento de testes sorológicos é de grande interesse para a comunidade científica, uma vez que esses podem ser aplicados em diversas abordagens diagnósticas (PLUCINSKI; AIDOO; ROGIER, 2021). Parte dos estudos realizados pela nossa equipe concentraram esforços no desenvolvimento e na produção local de anticorpos aplicáveis a diversos tipos de imunodiagnósticos.

Neste estudo desenvolvimento de um método diagnóstico para a malária utilizando a citometria de fluxo baseada em microesferas de látex para detecção da proteína *Pv*LDH, empregando anticorpos policlonais obtidos de coelhos e camundongos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa febril aguda, causada por parasitos apicomplexos do gênero *Plasmodium ssp.* e apresenta-se de forma sistêmica e não contagiosa (MENDIS et al., 2001). Foram identificadas cinco espécies de *Plasmodium* como patogênicas para o homem e que causam diferentes tipos de malária: *P. ovale* (com duas subespécies *P. ovale* Curtisi e *P. ovale* Wallikeri), *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo as duas últimas espécies responsáveis pela maioria dos casos clínicos e mortes no mundo (CALDERARO et al., 2013; ZHOU et al., 2019). Além destes, nos últimos anos a transmissão natural de malária causada pelo *Plasmodium cynomolgi* a humanos já foi demonstrada em alguns estudos (IMWONG et al., 2019; TA et al., 2014).

A malária é transmitida ao homem principalmente por via vetorial, pela picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* (KHAN; WATERS, 2004). Apesar de ocorrer com menos frequência, a doença pode ser transmitida por meio do contato direto com o sangue de uma pessoa infectada, por meio de transfusões sanguíneas, transplante de órgãos ou ainda pelo compartilhamento de seringas (AHMADPOUR et al., 2019; MANGANO et al., 2019). Outra forma de transmissão, mais rara, é a congênita, passada da mãe para o filho (JAIN et al., 2005). Os indivíduos infectados, mesmo que não apresentem sintomas (assintomáticos), podem abrigar formas sexuais dos parasitos, tornando-se reservatórios para infecção de mosquitos (CHEAVEAU et al., 2019).

As manifestações clínicas que definem um evento de malária são febres intermitentes (até 40º ou mais), calafrios com tremores e sudorese excessiva generalizada (FERREIRA, 2004). Estes episódios febris se apresentam em intervalos de 48 horas (febre terçã) ou 72 horas (febre quartã): Os parasitos *P. vivax* e *P. ovale* causam a febre terçã benigna e os parasitos *P. falciparum* causam a febre terçã maligna. Já o parasito *P. malariae* é o causador da febre quartã (SIROMA; FERRANI; RIGO, 2016).

Outros sintomas da infecção malárica podem incluir náuseas, vômitos, cefaléia e mialgia (HENRY, 2008). A intensidade dos sintomas varia de acordo com fatores como a espécie do parasito causador da infecção, os níveis de parasitemia e a imunidade da pessoa infectada. Indivíduos em condições específicas, como grávidas, lactantes e crianças podem ser particularmente vulneráveis (LAISHRAN et al., 2012; MILNER et al., 2018).

As formas mais graves de malária, que podem ser fatais, são causadas pelo parasito *Plasmodium falciparum* (DE SOUZA; RILEY, 2002). Este possui a capacidade de infectar as hemácias em qualquer estágio de maturação, elevando assim a carga parasitária e causando manifestações clínicas mais agudas (GREENHALGH; CHANDWANI, 2020; WHITE, 2018). Além disso, esta espécie de *Plasmodium* é capaz de provocar complicações graves durante a infecção, como malária cerebral, síndrome do desconforto respiratório agudo, pressão arterial baixa, lesão renal aguda, hipoglicemia e anemia grave (GREENHALGH; CHANDWANI, 2020).

O *P. vivax* e o *P. ovale* tem afinidade por eritrócitos jovens, os reticulócitos, fato que explica a carga parasitária menor e os sintomas clínicos geralmente mais brandos (MILLER, 2002). No entanto, alguns casos relacionados à malária *vivax* apresentam sintomas mais graves, como anemia grave e plaquetopenia, resultando em taxas de morbidade e de mortalidade elevadas (ANTONELLI et al.,2020). Outras manifestações clínicas graves decorrentes da malária causada pelo *P. vivax*, menos frequentes, são a ocorrência de malária cerebral, síndrome nefrótica, edema agudo de pulmão e coma (MILNER, 2018). Diferentemente das outras espécies, o *P. Malariae* causa a chamada malária benigna, pois apresenta afinidade por hemácias maduras, com manifestações clínicas leves (SUTHERLAND, 2016).

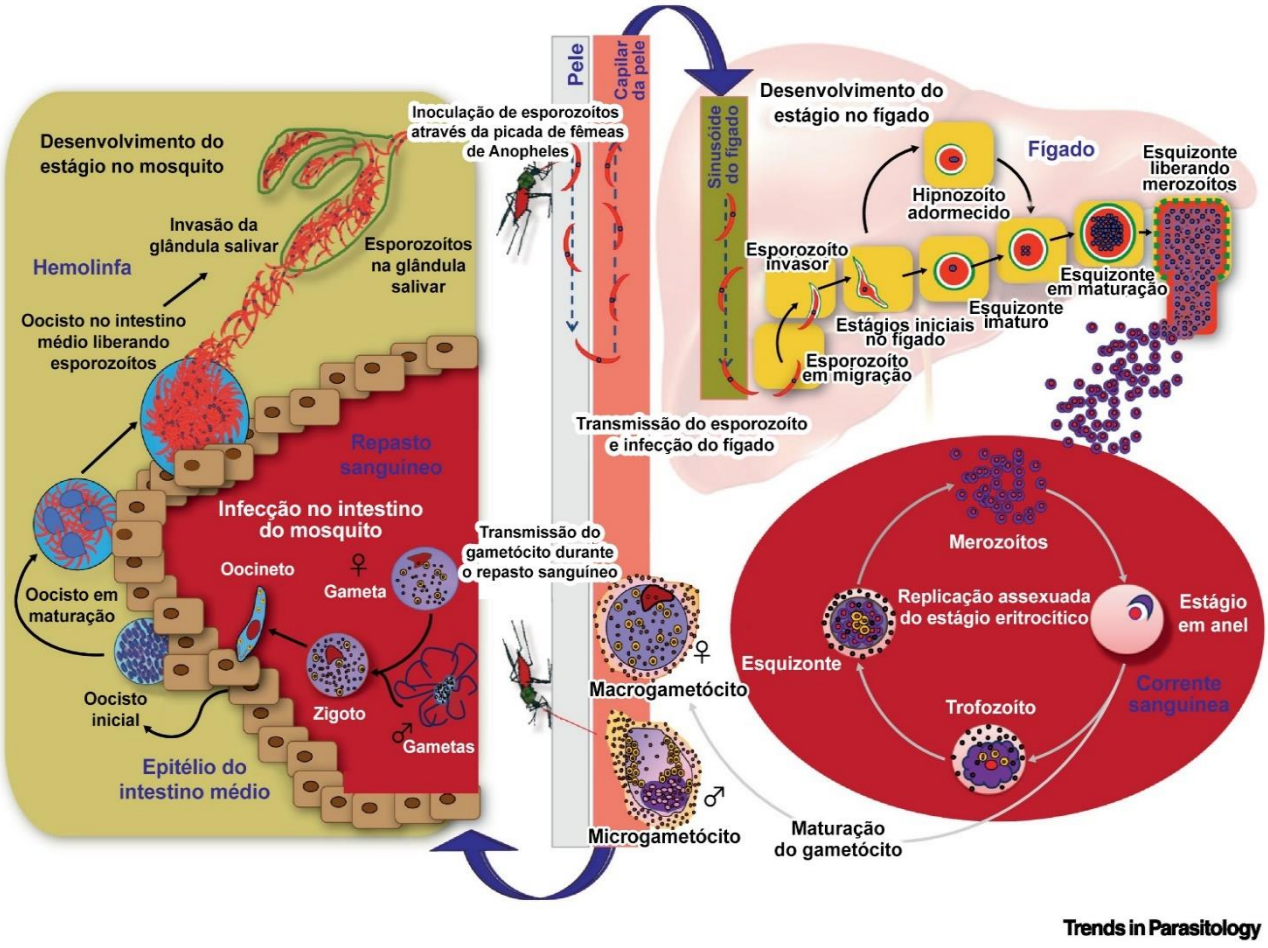
O impacto que a malária exerce sobre a população de áreas endêmicas, além dos males causados à saúde das pessoas, pode ser verificado nos quadros socioeconômicos das regiões afetadas (WHO, 2016). Sintomas e sequelas debilitantes que podem se manifestar por longos períodos, impedindo os indivíduos de atuarem normalmente nas dinâmicas de trabalho, e o alto custo de assistência à saúde, indispensável nas áreas em situação mais crítica, podem aprofundar instabilidades sociais e dificuldades econômicas (DUNKEL; ALEXANDER, 2020).

Como forma de concretizar os objetivos relacionados ao combate da malária, ainda em 2016 a WHO estabeleceu ações para a prevenção e tratamento da doença. Foi recomendada a adoção de diversas medidas em áreas endêmicas, como o uso de inseticidas; aplicação de medicamentos antimaláricos em crianças e mulheres grávidas, utilização de mosquiteiros tratados com inseticida (MTI); diagnóstico na fase inicial de casos suspeitos por meio de microscopia e/ou teste de diagnóstico rápido (TDR) e celeridade no tratamento com as drogas corretas para a espécie de parasito causadora da infecção.

1.2 CICLO DE VIDA DO *Plasmodium sp.*

O *Plasmodium* apresenta um ciclo evolutivo complexo, passando por uma série de ciclos celulares em diferentes tipos de células hospedeiras e por durações variadas (COWMAN et al., 2016). Em relação à reprodução do parasito, são identificadas duas fases: Fase assexuada, que ocorre em humanos ou em outros animais vertebrados, considerados os hospedeiros intermediários, e fase sexuada, que ocorre nas fêmeas do mosquito *Anopheles*, considerado o hospedeiro definitivo (BRUCE et al., 1990) (Figura 1).

Figura 1- Ciclo de vida do *Plasmodium vivax.*



Fonte: Adaptado de FLANNERY; MARKUS; VAUGHAN, 2019.

No momento do repasto sanguíneo das fêmeas infectadas do mosquito *Anopheles*, são inoculados no hospedeiro intermediário os esporozoítos, presentes nas glândulas salivares, dando início à reprodução assexuada (MILLER et al., 2002). Após permanecer um curto período na derme, os esporozoítos alcançam a corrente sanguínea e são conduzidos até o fígado, onde infectam exclusivamente os hepatócitos, células hepáticas pelas quais o parasito apresenta

tropismo (COWMAN, 2016; DUNDAS, 2019). Este processo é rápido e, em torno de 30 minutos após a infecção, já não há mais esporozoítos na corrente sanguínea. (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Nos hepatócitos ocorre a fase de esquizogonia pré-eritrocítica, que pode durar de 9 a 16 dias, dependendo da espécie de plasmódio (ANTONELLI et al., 2020). Os esporozoítos transformam-se em esquizontes e estes multiplicam-se. Após a completa maturação, promovem o rompimento dos hepatócitos, liberando numerosos merozoítos na corrente sanguínea que, por sua vez, irão infectar os eritrócitos em um processo rápido, dinâmico e com várias etapas. (MILLER et al., 2002). Existem esporozoítos que podem permanecer em condições de latência como hipnozoítos por vários meses ou, em alguns casos, por anos. Estes são característicos de *P. vivax e ovale* e possuem a capacidade de voltar ao estado de esquizontes, despertando novamente os sintomas da doença (MILLER et al., 2013; CAPUTO et al., 2016).

A esquizogonia eritrocítica começa quando os merozoítos que infectaram as hemácias multiplicam-se em seu interior utilizando a hemoglobina para obtenção de energia, gerando trofozoítos que, em seguida, transformam-se em esquizontes (DUNDAS, 2019). Estes, por sua vez, passam por processos de divisão e dão origem entre 16 a 32 merozoítos, provocando a ruptura sincrônica de eritrócitos, o que ocasiona o surgimento das manifestações clínicas, e libera os parasitos para infectarem novas hemácias, iniciando um novo ciclo eritrocítico (COWMAN, 2012). Este momento é ideal para a realização do diagnóstico, pois os antígenos parasitários estão em maior quantidade na corrente sanguínea. Nesta fase também ocorre a formação de precursores sexuais, com a diferenciação de alguns trofozoítos em gametócitos masculinos e femininos, que serão infectantes no vetor para o momento do repasto sanguíneo (BAKER, 2010; BRUCE et al., 1990).

A duração do ciclo eritrocítico varia de acordo com a espécie de *Plasmodium* e determina a periodicidade das manifestações clínicas da malária. Para as espécies *P. vivax e P. falciparum* essa duração é de 48 horas. Para a espécie *P. malariae* a duração é de 72 horas (MILLER et al., 2002).

O ciclo de vida do parasito da malária também compreende uma fase de reprodução sexual que ocorre no mosquito, mas a mudança real para o desenvolvimento sexual ocorre no hospedeiro vertebrado, com a formação de precursores de gametas masculinos e femininos (gametócitos), e é um pré-requisito para transmissão de doenças (BAKER, 2010**).**

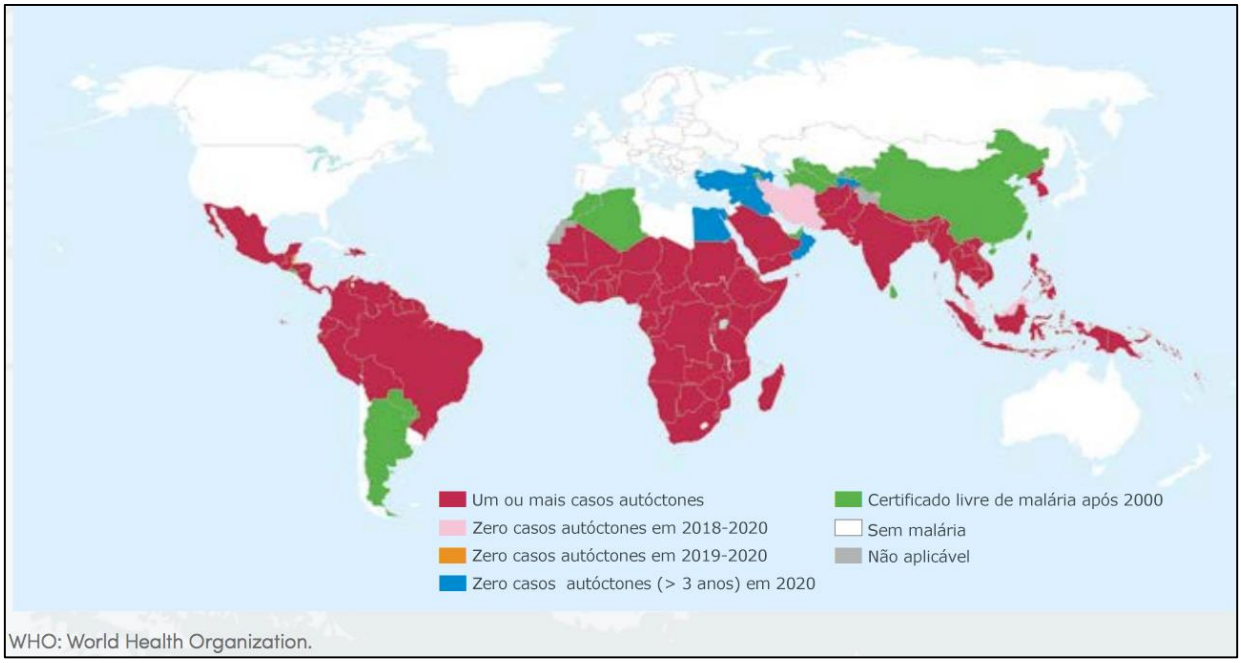
Quando as hemácias contendo os gametócitos são ingeridas pelo vetor no momento do repasto sanguíneo e alcançam o trato digestivo do inseto, inicia-se a reprodução sexuada. Os gametócitos masculinos sofrem exflagelação e originam 8 microgametas (MEIBALAN; MARTI, 2017). Estes fecundam os gametócitos femininos (macrogametócitos), formando assim o oocineto que, após atravessar as células epiteliais do intestino, transforma-se em oocisto (HALDAR et al., 2007). Durante sua maturação, este fixa-se no intestino, passando por modificações e multiplicações de numerosos esporozoítos até provocar a ruptura e liberação dos mesmos na hemolinfa. Logo após, os esporozoítos migram para as glândulas salivares do mosquito e são inoculados em outro hospedeiro intermediário durante o repasto sanguíneo (MEIBALAN; MARTI, 2017).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A malária é prevalente em países de clima tropical e subtropical. Em 2020, foram registrados aproximadamente 241 milhões de casos de malária e cerca de 627 mil mortes relacionadas à doença em todo o mundo (WHO, 2021) (Figura 2). Estima-se que houve mais de 14 milhões de casos e 47.000 mortes a mais em 2020 em comparação com 2019, devido a interrupção de ações relacionadas ao controle e prevenção da doença durante a pandemia (WHO,2021). A maioria dos casos, 95% dos registros, ocorreu na África, continente que também é o mais afetado por casos fatais, com 96% das mortes.

As crianças com menos de cinco anos são o grupo mais vulnerável à doença (ASHLEY; POESPOPRODJO, 2020, FORGIE et al., 2022): em 2020, representaram 77% (482.000) de todas as mortes por malária em todo o mundo. Destas, 80% ocorreram na região africana.

Figura 2- Mapa de risco de infecção por malária no Mundo em 2020.



Países com casos autóctones em 2000 e seu status em 2020. Países com zero casos autóctones nos últimos 3 anos consecutivos são considerados como tendo eliminado a malária. Em 2020, a República Islâmica do Irã e a Malásia relataram zero casos autóctones pelo terceiro ano consecutivo, e Belize e Cabo Verde relataram zero casos autóctones pela segunda vez. A China e El Salvador foram certificados como livres de malária em 2021, após 4 anos de zero casos de malária.

Fonte: Adaptado de WHO, 2021.

A espécie de *P. falciparum* é responsável pela vasta maioria dos casos de Malária no mundo (VARO; CHACCOUR; BASSAT, 2020), em 2020, por quase 100% dos casos de malária na região africana, por 74% dos casos na região do Mediterrâneo Oriental, 60% no sudeste da Ásia e 70% na região do Pacífico Ocidental (WHO, 2020). A segunda espécie mais prevalente é a *P. vivax*, sendo predominante na região das Américas (ASHLEY; PYAE-PHYO; WOODROW, 2018), onde representa 75% dos casos, e no sudeste asiático, representando 39% dos casos (WHO, 2020).

A taxa de incidência da malária no mundo declinou entre 2000 e 2015, de 81 para 59 casos para cada 1000 indivíduos de populações em risco. Em 2019 esta taxa baixou para 56/1000 hab., e aumentou novamente para 59/1000 hab. em 2020, um aumento de 5% em relação ao ano anterior. Entre 2000 e 2015 a taxa de mortalidade por malária no mundo caiu pela metade, de cerca de 30/1000 hab. em 2000 para 15/1000 hab. em 2015, caindo para 13/1000 hab. em 2019. Em 2020, como consequência da pandemia de COVID-19, a taxa de mortalidade aumentou para 15/1000 habitantes. (WHO, 2020).

Nas regiões das Américas o combate e controle da malária foram afetados nos últimos anos devido ao grande aumento do número de casos na Venezuela, que apresentou cerca de 35.500 casos em 2000, subindo para mais de 467.000 em 2019. (GABALDÓN-FIGUEIRA et al., 2020). Em 2020, no entanto, o país apresentou menos da metade de casos em relação ao ano anterior, 232 mil, em parte devido às restrições de circulação durante a pandemia de COVID-19 (WHO, 2021). Essas restrições também podem ter afetado o acesso aos serviços de saúde, reduzindo o número de casos notificados.

Dezoito países da Região das Américas da OMS estão em risco de transmissão de malária. Em 2020, a região registrou 602.476 casos da doença e 108 mortes – quedas de 11% e 43% em relação a 2010, respectivamente. Três países responderam por 77% de todos os casos estimados: a República Bolivariana da Venezuela (35%), Brasil (26%) e Colômbia (16).

Em 2016 a *World Health Organization* (WHO) lançou uma estratégia para acelerar o progresso no controle e eliminação da malária no mundo. Esta iniciativa é composta por três marcos interligados e com prazos determinados para o alcance das metas estabelecidas: *Global technical strategy for malaria 2016–2030* (GTS), *Action and investment to defeat malaria 2016-2030* (AIM) e *Sustainable Development Goals* (SDGs). As metas estabelecidas, além da erradicação da doença em pelo menos 35 países, visam a redução no número de casos de malária, em relação aos números de 2015, em pelo menos 40% até 2020, 75% até 2025 e 90% até 2030 (WHO, 2017).

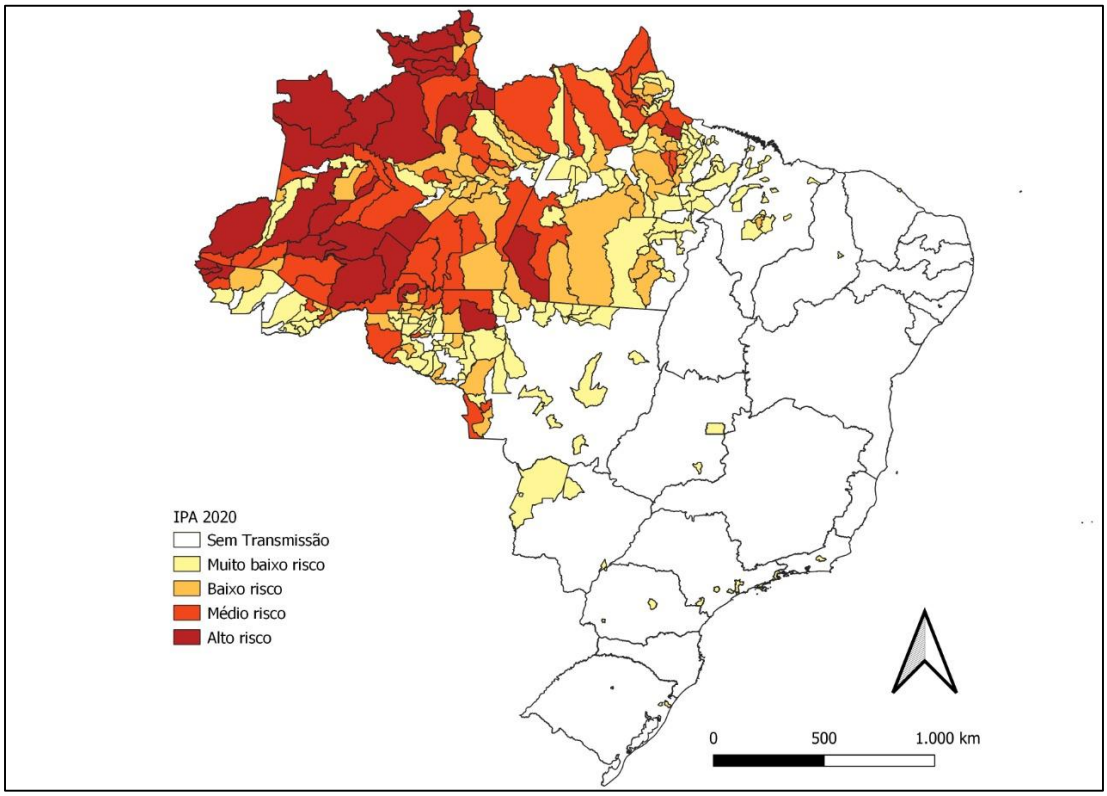
Apesar do avanço mundial considerável nas ações de controle e eliminação da doença, alguns países endêmicos, em 2020, não alcançaram a meta estabelecida para morbidade e mortalidade. A incidência esperada para 1000 habitantes em risco em 2020 está 40% maior do que o previsto para este ano. Embora a taxa de mortalidade tenha tido um progresso superior aos casos de incidência, a meta também não foi alcançada, com 42% além do proposto pela estratégia. Em muitos países a pandemia dificultou o alcance da meta, pois afetou diretamente os serviços de saúde direcionados a malária. Em muitos casos, a falta de financiamento foi o fator que limitou a implementação dos planos estratégicos, assim como o envolvimento insuficiente da comunidade e a falta de sistemas de vigilância aprimorados.

Dos dezenove países endêmicos da região das Américas classificados para participar da iniciativa global da WHO, doze registraram aumento na incidência de malária em 2020 em comparação com 2015: Brasil, Venezuela, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Guiana, Haiti, Nicarágua, Panamá, Bolívia e Suriname. A incidência de casos de malária nesta região está atualmente 42% maior do que esperado, com um aumento de 3% na incidência de casos em 2020 em relação a 2015.

1.3.1 Malária no Brasil

A malária é considerada a infecção parasitária mais prevalente no Brasil, constituindo dois quadros epidemiológicos: baixa endemicidade na região extra-amazônica e alta endemicidade na região Amazônica, que concentra 99,9% dos casos registrados (BRASIL, 2021) (Figura 3). Em 2020, a malária foi responsável por 44 óbitos no país e o número de casos registrados foi de aproximadamente 145 mil. O *P. vivax* foi responsável por cerca de 85% do total de casos, seguido das infecções por *P. falciparum*, com 15%, e infecções por *P. malariae*, com 0,01% dos casos (SIVEP-MALÁRIA, 2021).

Figura 3- Mapa de risco de infecção por malária no Brasil em 2020, por município.



Fonte: BRASIL, 2021.

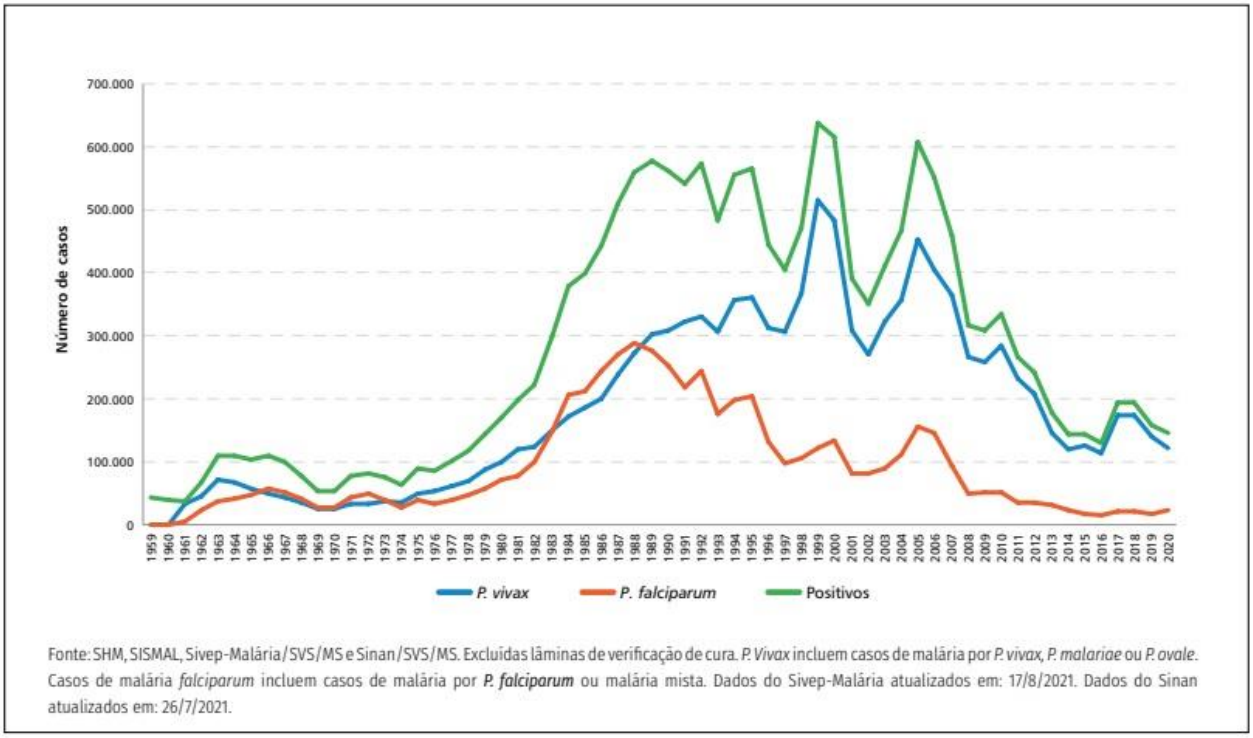
O estado do Amazonas concentra a maior ocorrência da doença, mantendo-se líder no número de casos por 9 anos. Em 2020, aproximadamente 80% dos casos de malária ocorreram em 41 municípios: 16 no Amazonas (41,1%), 8 no Pará (17,1%), 7 em Roraima (20,5%), 4 no Amapá (2,3%), 3 no Acre (8,1%), 2 em Rondônia (8,2%) e 1 no Mato Grosso (2,5%) (BRASIL, 2021).

Os mosquitos do gênero Anopheles são os principais vetores da malária no Brasil. Das 54 espécies conhecidas do mosquito no país, a *Anopheles darling* é a maior responsável pela transmissão da doença. (BAIA-DA-SILVA et al., 2019). As características geográficas e

ecológicas da região Amazônica contribuem para a proliferação dos vetores o ano todo, pois oferecem condições substanciais para sua reprodução, como temperatura, umidade e vegetação local (WOLFARTH-COUTO; SILVA; FILIZOLA, 2019). Além disso, a ocupação de áreas urbanas em regiões que são habitat natural do mosquito transmissor e os aspectos socioeconômicos, epidemiológicos e ambientais da região favorecem a alta transmissibilidade da doença (FERREIRA; CASTRO, 2019).

As variações no número de casos de malária no Brasil ao longo dos anos são atribuídas, principalmente, a ondas de desenvolvimento econômico; construção de ferrovias, rodovias e barragens hidrelétricas; atividades relacionadas ao garimpo; políticas de deslocamento de população e ocupação do solo (BAIA-DA-SILVA, et al., 2019) (Figura4).

Figura 4- Histórico de casos de malária notificados no Brasil, 1959 a 2020.



Fonte: BRASIL, 2021.

No Brasil, o Programa Nacional de Controle da Malária (PNCM) lançou, em 2016, o Plano de Eliminação da Malária no Brasil, visando alcançar a meta estabelecida pela *World Health Organization* (WHO). Este plano propõe estratégias para o controle da transmissão da doença, como: controle de vetores, investigação epidemiológica, tratamento adequado, conscientização e mobilização social (BRASIL, 2017). Além destes, o diagnóstico sensível e

específico nos estágios iniciais da doença figura como uma medida necessária, pois contribui para a interrupção da cadeia de transmissão. Quanto mais cedo o paciente for tratado, menor será a disseminação da doença. (BRASIL, 2020) (TABELA 1).

Tabela 1- Plano de Eliminação da Malária no Brasil – Diagnóstico.

Alta e média transmissão	Pré-eliminação	Eliminação	Prevenção à reintrodução
Pontos de diagnóstico próximos às comunidades afetadas.	Pontos de diagnóstico próximos às comunidades afetadas.	Definição de unidade de referência municipal.	Definição de unidade de referência estadual. (*)
Oferta de diagnóstico de malária no pré-natal.	Oferta de diagnóstico de malária no pré-natal.		
Envolvimento dos Agentes comunitários de Saúde na detecção e acompanhamento de casos no seu território de atuação.	Envolvimento dos Agentes comunitários de Saúde na detecção e acompanhamento de casos no seu território de atuação.		

Fonte: BRASIL, 2016.

Apesar dos esforços já mencionados para o combate à doença, a erradicação e controle da malária no Brasil ainda permanecem como um desafio devido à falta de controle do vetor e à imigração de populações de países de fronteira (BRASIL, 2020). O relatório de 2021 da *World Health Organization* mostra o aumento dos casos de malária no país em relação a 2015, evidenciando que a meta estabelecida não foi alcançada.

A pandemia de COVID-19 interrompeu os serviços de diagnóstico, levando a diminuição de 32% no registro de casos suspeitos de malária em 2020 em comparação com 2019. Em seis países (Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guiana, México e Panamá), embora o número de testes positivos para a doença tenha aumentado em 2020 em comparação com 2019, o número de pessoas testadas diminuiu em pelo menos 25%.

Além disso, o diagnóstico tardio ou errôneo, a resistência crescente dos parasitos aos antimaláricos, regiões de garimpo e o turismo em regiões endêmicas contribuem para a dificuldade na eliminação desta doença (BRASIL, 2020). Mesmo que seja alcançada a erradicação da malária pelo bloqueio da transmissão vetorial e com a redução da incidência de

infecções à zero, ainda serão necessárias, por tempo indefinido, ações de combate e controle o para evitar novos contágios (BRASIL, 2017).

1.4 DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

O diagnóstico e o tratamento adequado na fase inicial da doença são componentes essenciais na estratégia para o controle da malária no mundo, pois impedem que as infecções progridam para casos mais graves, possibilitam a interrupção da cadeia de transmissão e a consequente diminuição do número de casos e óbitos (WHO, 2017). Um dos objetivos do desenvolvimento de novos imunoensaios é superar as deficiências na detecção precoce e precisa da doença.

Em 2017 foi preconizada pela OMS que, antes da administração de antimaláricos, seja realizada a confirmação de todos os casos suspeitos de malária por meio da microscopia ou testes de diagnóstico rápido (TDR). Tal recomendação visa a administração correta da medicação à cada espécie de *Plasmodium*, permitindo a redução de possíveis erros no tratamento e a diminuição de resistência à antimaláricos (WHO, 2017).

O método diagnóstico mais utilizado para a verificação de infecções maláricas é a microscopia (MURPHY et al., 2013). No entanto, existem vários outros métodos de detecção que podem ser aplicados, como: diagnósticos moleculares, testes sorológicos, testes imunocromatrográficos de fluxo, biossensores e outros.

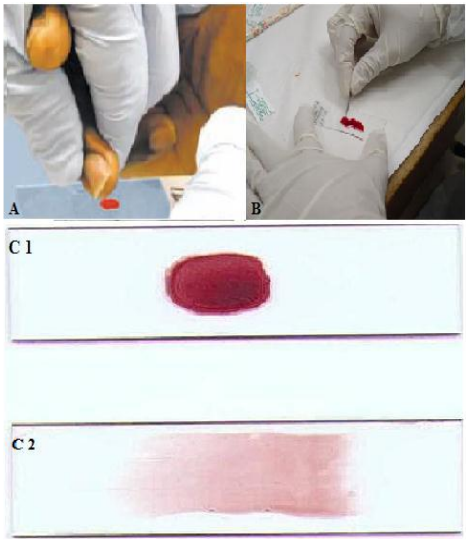
1.4.1 Diagnóstico por Microscopia

A microscopia apresenta algumas vantagens relacionadas ao seu uso para diagnóstico de malária, como a diferenciação de espécies, seu baixo custo e alta sensibilidade. Deste modo, ela continua sendo o padrão-ouro para detecção de malária e a referência para o desenvolvimento de quaisquer outras metodologias de diagnóstico de malária (BATWALA; MAGNUSSEN; NUWAHA, 2011).

Para realização deste tipo de diagnóstico, é executada a técnica do esfregaço delgado ou gota espessa (FIGURA 7), primeiramente descrita por Ross em 1903 (GONTIJO, 1995). Entre as duas abordagens, a gota espessa é mais comumente empregada, pois a concentração do sangue torna mais fácil a visualização de parasitos (BRASIL, 2009).

Tal metodologia consiste na coleta de sangue periférico de indivíduos com suspeitas de malária para o preparo de lâminas coradas com Giemsa (entre outros corantes) seguida de análise ao microscópio óptico, pela qual é possível diferenciar as espécies de parasitos e também quantificar a parasitemia, possuindo assim a caraterística de ser quantitativo e qualitativo (BRASIL, 2009).

Figura 5- Diagnóstico de malária por microscopia.



A) Punção digital; **B)** Preparação de lâminas; **C1)** Gota espessa e **C2)** Esfregaço sanguíneo.

Fonte: www.rph.wa.gov.au/malaria/diagnosis.

A microscopia pode captar de 5-10 parasitos/µL, entretanto, isso pode variar de acordo com a experiência do responsável pela execução do teste. Em condições menos controladas, como a aplicação dessa metodologia em campo, esse número sobe para 100 parasitos/ µL. Em média, este teste leva um total de 60 minutos para ser realizado (BRASIL, 2005).

Em contrapartida aos pontos positivos apresentados, se faz necessário uma atenção maior em relação à execução da metodologia e à capacitação dos técnicos envolvidos na análise. Muitas variáveis podem atrapalhar o sucesso deste método, como preparo inadequado das lâminas, erros na identificação das espécies, lise de hemácias, entre outros (HÄNSCHEID, 2003; PROUX et al., 2011).

Em 2018, Diallo e colaboradores avaliaram a eficácia de diagnóstico de malária por microscopia no Senegal e constatou que, apesar das performances terem sido, no geral, boas, ainda há uma necessidade de melhorar as habilidades técnicas na detecção de infecções causadas por outros parasitos além do *P. falciparum*.

Com isso, temos claro que este método de diagnóstico exige mão de obra qualificada para execução e interpretação dos exames, além de uma infraestrutura que garanta a as melhores condições para realização do teste (MANGOLD et al., 2005).

1.4.2 Biossensores

Para atingir maiores sensibilidades e estabilidades em condições de campo, tem se buscado o desenvolvimento de novas tecnologias *point-of-care*. Os sensores eletroquímicos são uma alternativa para criação de novas metodologias que podem ser aplicadas em campo. Estes sensores baseiam-se na transferência de carga de um eletrodo para outra fase, podendo ser sólida ou líquida, e essa variação de comportamento de elétrons pode ser medida pelo dispositivo. No caso dos biosensores, o elemento de reconhecimento utilizado tem natureza biológica, podendo ser anticorpos, DNA, metabólitos, entre outros (JANATA, 2009; WANG et al., 2008; YOON, 2013).

A alta sensibilidade dos biossensores abre espaço para utilização de amostras provenientes de coletas menos invasivas, como a saliva de pacientes, uma vez que já foram reportadas baixas concentrações de antígenos de malária (GBOTOSHO et al., 2010). Ainda assim, há um longo caminho até que os biossensores alcancem as características ideais para sua aplicação rotineira e *point-of-care*, uma vez que ainda necessitam de estudos que os adaptem para sua utilização fora do ambiente laboratorial.

1.4.3 Diagnóstico Molecular

Ao longo dos anos, o diagnóstico molecular tem sido uma ferramenta poderosa na detecção de doenças infecciosas (MESSACAR et al., 2017). Waters & McCutchan, em 1989, foram os primeiros a descrever a reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico de malária, utilizando a subunidade menor de RNA ribossomal (18S rRNA) de plasmódio como alvo para amplificação.

Desde então, outras metodologias com outros alvos foram elaboradas, como demonstrado por Cunha e colaboradores (2009), que usaram o DNA mitocondrial como alvo para detecção de *P. vivax* e *P. falciparum*.

Em uma variação mais sensível e específica, a PCR em tempo real, ainda permanece como o método consolidado para detecção de infecções assintomáticas, onde os níveis de

parasitemia são muito baixos para serem detectáveis por outras metodologias. Por se mostrar tão sensível e também fazer a diferenciação de espécies de plasmódio, a PCR em tempo real é a metodologia empregada para *screening* em bancos de sangue (ALI et al., 2005; ALMEIDA-DE-OLIVEIRA et al., 2019).

Mesmo com todas as vantagens apresentadas pelo diagnóstico molecular, ainda não foi possível a sua adaptação para ser empregado de maneira eficaz fora de laboratórios, uma vez que possui alto custo, requer infraestrutura adequada e profissionais qualificados.

1.4.4 Diagnóstico Sorológico

Testes sorológicos se caracterizam pela detecção de anticorpos a partir do reconhecimento de antígenos do parasito em sangue de pacientes. Apesar de serem metodologias no geral eficazes para detecção de malária, não são recomendadas para aplicação em rotina, sendo utilizados para avaliação de pacientes febris que viajaram para áreas endêmicas e para segunda confirmação em casos onde os pacientes com febre recorrente apresentam resultados negativos no diagnóstico por microscopia (MATHISON; PRITT, 2017; WILKINS; NUTMAN, 2016).

As proteínas produzidas durante a infecção humana causada por *Plasmodium* podem ser identificadas, caracterizadas e aplicadas em diversos métodos nas áreas de pesquisa e diagnóstico e em investigações epidemiológicas da malária. Métodos sorológicos que foram desenvolvidos visando à detecção dessas proteínas forneceram novas ferramentas que auxiliam no controle e eliminação dessa patologia (PLUCINSKI et al., 2021).

1.4.4.1 Biomarcadores de infecção malárica aplicados em testes sorológicos

Os biomarcadores maláricos podem se apresentar conservados em todas as espécies do parasito, considerados marcadores pan-específicos, ou podem ser específicos para uma determinada espécie (JAIN et al., 2014). A maioria dos métodos sorológicos que objetivam a de detecção de antígenos específicos utilizam como biomarcadores as seguintes proteínas: aldolases do plasmódio, lactato desidrogenase de plasmódio (pLDH), Glutamato desidrogenase de plasmódio (pGDH) para a detecção pan-específica ou específica de P. *falciparum* ou P. *vivax*; e a proteína 2 rica em histidina (HRP-2) para diagnóstico específico para *P. falciparum* (ESCALANTE; PACHECO, 2019; KRAMPA et al., 2020; KORI; VALECHA; ANVICAR, 2019).

As aldolases são enzimas que atuam diretamente no ciclo glicolítico do *Plasmodium* e são liberadas no sangue durante a infecção malárica ou podem ser encontrada no citoplasma do parasito em formas solúveis (DZAKAH et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 1990). A reação reversível de catálise da clivagem de frutose -1,6-bifosfato em gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfatada é realizada por essas enzimas (SRIVASTAVA et al., 1990). Os parasitos do gênero *Plasmodium* só expressam um tipo de aldolase, que apresentam uma alta proporção das sequências de aminoácidos conservadas em todas as espécies, tornando-a um antígeno alvo pan-específico para detecção da infecção (DZAKAH et al., 2013; DOBELI et al., 1990).

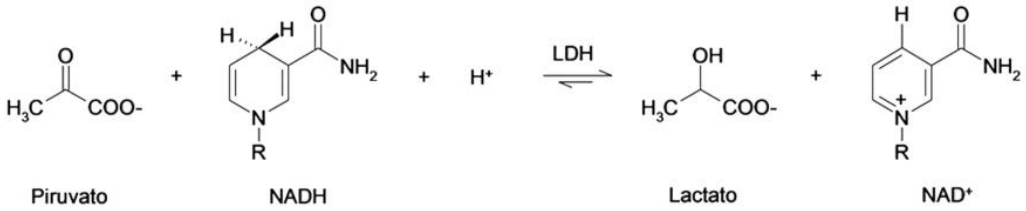
As HRPs, do inglês *Histidine-rich proteins*, são proteínas produzidas durante o estágio do parasito e apresentam em sua composição 73% de histidina. A HRP2 é considerada um biomarcador exclusivo do *P. falciparum* e pode ser encontrada no soro, fluido cerebrospinal e na urina de pacientes infetados com este parasito (GENTON et al., 1998; KIFUDE et al., 2008). Em testes sorológicos e de diagnóstico rápido, a HRP2 é o marcador mais empregado para *P. falciparum*, pois apresenta uma alta sensibilidade (HOUZE et al., 2009; JAIN et al., 2014). Entretanto, esta proteína pode persistir em pacientes por várias semanas após a resolução da infecção, podendo causar resultados falsos positivos, afetando assim, a especificidade do teste. Em alguns isolados de *P. falciparum* foram reportadas deleções no gene, podendo gerar resultados falsos negativos, fato que compromete a eficácia dos testes (AGABA et al., 2019; BHARTI et al., 2016).

As enzimas glutamato desidrogenases (pGDHs) fazem parte do metabolismo redox do parasito da malária e estão nas rotas do carbono e nitrogênio. Sugere-se que elas são fonte de NADPH no parasito e, geralmente, envolvem a assimilação de amônia (GDHs dependente do NADP) ou catabolismo do glutamato (GDHs dependente do NAD) (WAGNER et al., 1998). O potencial desta enzima como biomarcador está ligado a características estruturais das GDHs de plasmódio que não são encontradas em enzimas humanas, como o fato desta possuir um resíduo que estende a região N-terminal. Além disso, enzimas GDHs não são encontradas em hemácias de hospedeiros, o que as torna bons marcadores de infecção (WAGNER et al., 1998).

A LDH de plasmódio (pLDH) é uma proteína tetramérica (com quatro subunidades) e é composta por 316 aminoácidos (MOODY, 2002). Esta enzima está presente em todas as fases do ciclo do *Plasmodium* e expressa em todas as espécies. A pLDH realiza a mesma função biológica que a LDH humana, porém apresenta propriedades estruturais, imunológicas e níveis de expressão diferentes em cada organismo (WIWANITKIT, 2007).

Esta enzima é responsável por catalisar a via glicolítica e durante as fases intra-eritrocíticas permite que os eritrócitos aumentem o consumo de glicose em até 100 vezes em relação a hemácias não infectadas (PREUSS; JORTZIK; BECKER, 2012; PODLASEK; MCPHERSON, 1989; WALLQVIST et al., 2016). Durante a glicólise anaeróbica, a LDH converte piruvato a lactato, e novamente em piruvato, formando NAD+ .(FIGURA 6). Como a glicólise anaeróbica do *Plasmodium* ocorre dentro das hemácias, este mecanismo fornece a energia necessária para o crescimento intracelular dos parasitos (BERWAL et al., 2006).

Figura 6- Reação catalisada pela enzima LDH



Fonte: OLIVEIRA e FRANÇA, 2016.

A *p*LDH apresenta várias vantagens para o uso como biomarcador de infeção malárica pois, além de ser uma enzima chave do metabolismo do parasito (sendo assim essencial), no caso da LDH de *P. falciparum*, sua concentração no sangue de paciente pode ser relacionada ao nível de parasitemia (MAKLER; HINRICHS, 1993; VAN GENDEREN et al., 2005).

As proteínas *p*LDH das diferentes espécies possuem sequências de aminoácidos conservadas, possibilitando a criação de marcadores que detectem várias espécies ao mesmo tempo. Outra vantagem é o fato de não haver detecção dessas enzimas uma semana após a cura da doença (HOUZE et al., 2009; MBABAZI et al., 2015).

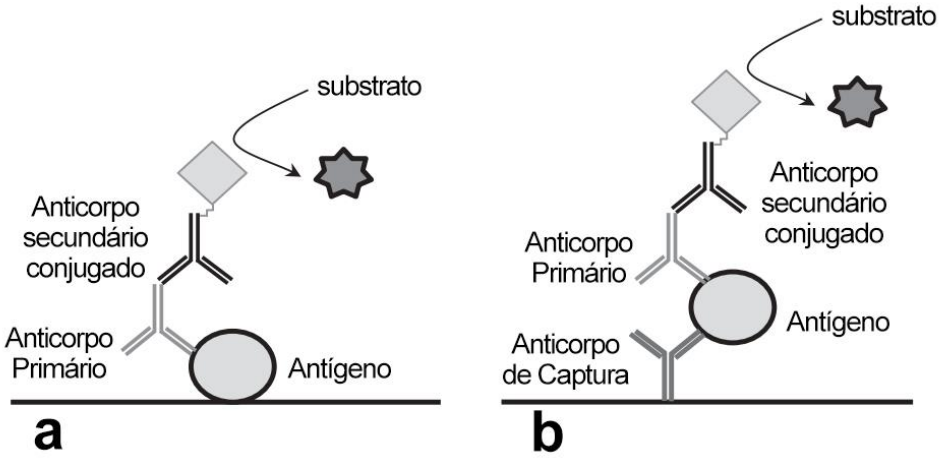
1.4.4.2 Ensaio de imunoabsorção ligado à Enzima (ELISA)

O ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), é o diagnóstico sorológico mais utilizado em laboratório de pesquisa científica. O ELISA do tipo indireto se baseia na fixação de antígenos em superfície sólida para captura de anticorpos específicos, os quais irão se ligar a anticorpos (conjugados à enzima peroxidase) contra a espécie de origem dos anticorpos a serem capturados. Caso, depois das devidas etapas de lavagens e incubações, tenha ocorrido ligação dos anticorpos ao antígeno impregnado na superfície sólida, ao ser adicionada a substância cromatogênica adequada e o substrato da enzima, haverá mudança de cor nas

amostras testadas, podendo então ser medida a quantidade de anticorpos através de espectrofotometria (FIGURA 8A). Este tipo de teste é frequentemente utilizado em estudos soro epidemiológicos (DRAME et al., 2010; POINSIGNON et al., 2008).

Já no ELISA sanduíche são utilizados anticorpos, chamados de anticorpos de captura, que tem a capacidade de se ligar a antígenos em determinadas amostras, seguidos de incubação com anticorpos que também se ligam ao antígeno alvo, formando o "sanduíche" (KONSTANTINOU, 2017). As reações subsequentes acontecem como o descrito abaixo (FIGURA 8B).

Figura 7- Princípios básicos do ELISA.



A) ELISA indireto. B) ELISA sanduíche.

Fonte: Adaptado de KONSTANTINOU, 2017.

1.4.4.3 Testes de Diagnóstico Rápido

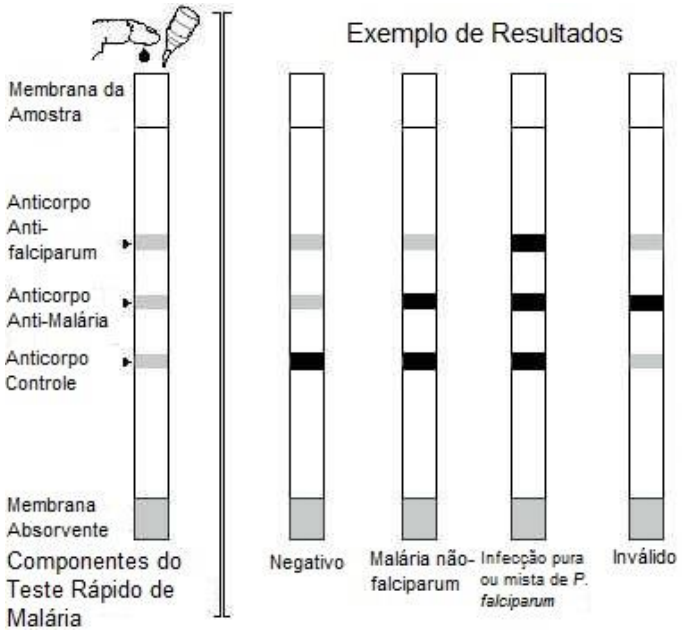
A microscopia é uma técnica que exige tempo de execução, alta qualidade de materiais, alto nível de qualificação dos profissionais envolvidos e infraestrutura adequada, principalmente energia elétrica. Por essas características, é uma técnica difícil de ser executada em determinadas regiões. Nestes casos, os testes de diagnóstico rápido são uma alternativa com execução relativamente simples e fornecem resultados precisos em menos de 30 minutos (MOODY, 2002; WHO, 2016).

Os TDRs são ensaios imunocromatográficos que combinam propriedades imunológicas com base no reconhecimento do antígeno-anticorpo e cromatografia em um teste diagnóstico (figura 9). Os TDRs são direcionados para a detecção de três antígenos, dependendo de sua finalidade: proteína 2 rica em histidina do *Plasmódio* (*Pf*HRP2), lactato desidrogenase do *plasmódio* (pLDH) e aldolase (MOUATCHO; GOLDRING, 2013). Sua execução deve ser

acompanhada por um sistema de controle de qualidade, pois os testes rápidos são sensíveis a altas temperaturas e à umidade, e sua especificidade e sensibilidade variam (HOUZÉ, 2017).

A WHO estabeleceu, em 2000, que a eficácia dos testes na detecção de *P. falciparum* e de *P. vivax* deve ser maior ou igual a 50% para uma densidade de 200 parasitos/µL e, idealmente, deve ser maior em áreas de baixa transmissão. A taxa de falso positivo deve ser menor que 10% e, a taxa de testes inválidos, menor que 5%. Em 2012, esses critérios se tornaram mais rígidos, devendo ser maior ou igual a 75% em testes com densidade parasitária de 200 parasitos/µL para as duas espécies de plasmódio e em todas as áreas de transmissão (WHO, 2013). Além disso, os testes não devem reagir a produtos antigênicos do parasito em infecções não ativas e, preferencialmente, devem ser capazes de monitorar a resposta de pacientes a antimaláricos (WHO, 2013).

Figura 8- Componentes e interpretações para ensaio imunocromatográfico para malária.



Fonte: Adaptado de http://www.malariasite.com/

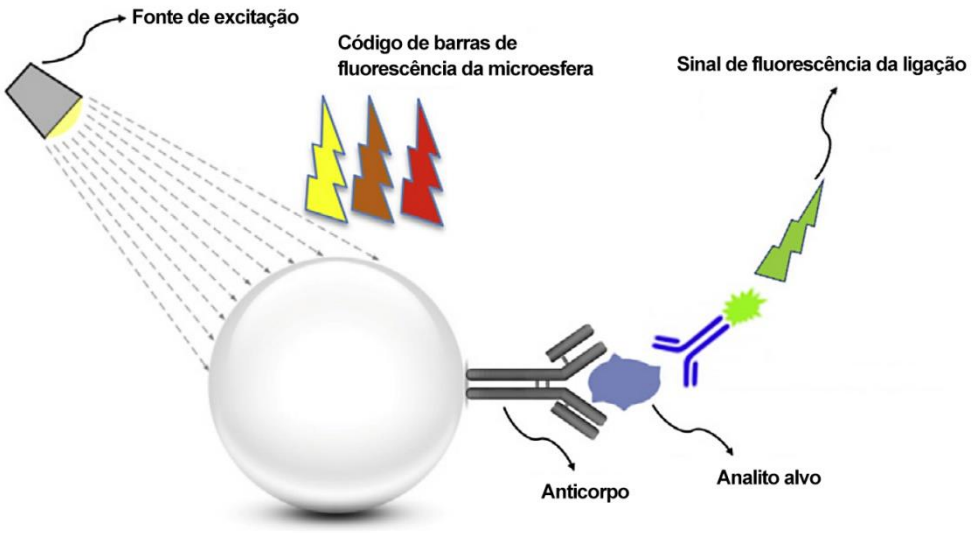
Apesar de auxiliarem no diagnóstico célere em regiões onde a microscopia não é acessível, estes testes ainda apresentam baixa sensibilidade e especificidade em comparação com os métodos moleculares e a própria microscopia, não podendo ser utilizado para detecção de infecções assintomáticas e nem triagem de bancos de sangue (MALTHA; GILLET; JACOBS, 2013), como é o caso de algumas técnicas que estão sendo desenvolvidas para o diagnóstico de malária, dentre as quais podemos citar a citometria de fluxo, discutida a seguir.

1.4.4.4 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo tornou-se um método amplamente empregado para diagnóstico clínico e pesquisa básica. Além da capacidade de realizar a caracterização celular, os citômetros também podem detectar microesferas de acordo com seus tamanhos, formas, estabilidade e capacidade de absorver e reter corantes fluorescentes. Isso permitiu o desenvolvimento de diversos tipos de ensaios citométricos de fluxo, simples ou multiplex (PARSA et al.,2018; KELLAR; IANNONE, 2002, MORGAN et al., 2004).

Desde a década de 1970, a citometria vem sendo aplicada para análises relacionadas à malária (SHAPIRO; ULRICH, 2010). Nos últimos dez anos vários estudos foram direcionados para o desenvolvimento de imunoensaios, principalmente para ensaios multiplexados combinados a esferas, com a finalidade de fornecer uma alternativa confiável para o diagnóstico da doença (ONDIGO et al., 2019). Um dos princípios de detecção de ensaios baseados em esferas mais empregados em métodos sorológicos é o ensaio tipo sanduíche, que pode atingir o mais alto nível de sensibilidade (KINGSMORE, 2006). Uma vez que o ensaio sanduíche envolve a ligação de dois anticorpos específicos à detecção do antígeno, este teste é mais sensível e específico do que os ensaio indiretos. Por esse motivo, o ensaio em sanduíche é uma das técnicas mais sensíveis e populares no diagnóstico precoce de diversas patologias (PARSA et al., 2018).

Figura 9- Princípio do Ensaio de Citometria de fluxo com base em esfera.



Fonte: Adaptado de PARSA et al., 2018.

Em 2012, Ondigo et al. padronizaram e validaram um ensaio de “Cytometry *beads* assay” (CBA) de anticorpos para antígenos de *P. falciparum,* visando estabelecer os parâmetros adequados para um teste multiplex e comparar os resultados com os do método ELISA. Os resultados evidenciaram as vantagens associadas ao CBA quando comparado ao ELISA, que incluem a conservação da amostra, a detecção de vários analitos em um único teste, a redução no tempo de processamento da amostra devido à cinética do método e custos menores.

Por fornecer evidências de infecção ativa ou recente de malária causada por *P. falciparum,* a detecção da HRP2 é amplamente utilizada para fins de diagnóstico e estudos epidemiológicos. No entanto, o aprimoramento dos ensaios sorológicos disponíveis ainda enfrenta algumas dificuldades, como a baixa sensibilidade dos testes e altos custos. Visando a detecção de HRP2 em níveis de sub-picogramas, Rogier et. al (2017) desenvolveram um novo imunoensaio de citometria de fluxo baseada em esferas. O método foi aplicado para avaliar os resultados dos testes de diagnóstico rápido para HRP2 em diversas circunstâncias de transmissão de *P. falciparum* e em diferentes países endêmicos para a doença. O teste forneceu a verdadeira estimativa do desempenho em campo dos testes rápidos, apresentando alta sensibilidade e especificidade.

A metodologia adotada por este imunoensaio foi utilizada em outros trabalhos, como: a avaliação dos níveis de HRP2 em pacientes ao término do tratamento (PLUCINSKI et al., 2018), detecção em indivíduos que não apresentavam sintomas da doença (PLUCINSKI et al.2019), associação de febre à malária (PLUCINSKI et al., 2019), verificação da deleção de genes de Pfhrp2 e Pfhrp3 (HERMAM et al., 2019) e pesquisa de sorovigilância (ROGIER et al., 2019).

Um alvo específico de *Plasmodium vivax,* a lactato desidrogenase do *Plasmodium vivax* (*Pv*LDH), foi intregado a um teste multiplex já existente para detecção de antígenos de malária na plataforma Luminex (ROGIER et al., 2020). O imunoensaio já incluía alvos pan-específicos, a aldolase e a lactato desidrogenase do *Plasmodium* (LDH), e também a HRP2 para o *Plasmodium falciparum.* A sensibilidade do teste foi de 91,7% em amostras positivas confirmadas previamente por PCR, a especificidade contra um painel de pessoas sadias foi de 100%, e a especificidade contra um painel de infecções por *P. falciparum, Plasmodium malariae* ou *Plasmodium ovale* foi de 90,2%. A adição deste marcador no painel multiplex para a detecção de antígenos da malária permitiu uma triagem sensível para identificação de espécies de *P. falciparum* e *P. vivax.*

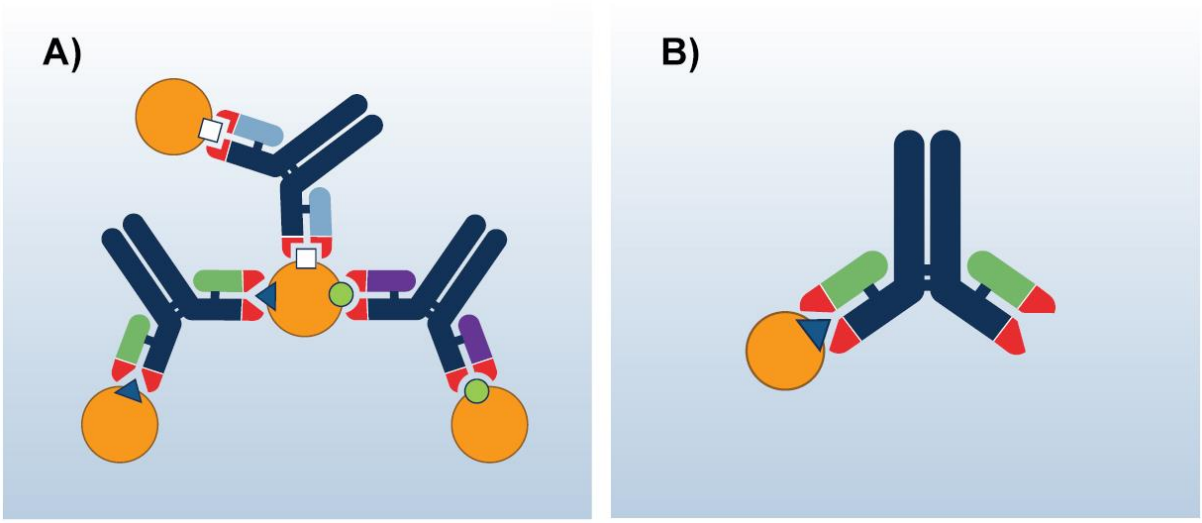
A citometria de fluxo, por ser um método de alta sensibilidade e especificidade, mostra-se como uma alternativa confiável para análises sorológicas e com potencial para ser aplicada, como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico, em bancos de sangue, tendo em vista que os citômetros são equipamentos necessários para as análises de imunofenotipagem celular. Além disso, como o valor deste aparelho representa a maior parcela dos custos envolvidos na utilização do método diagnóstico em questão, este se torna financeiramente viável para ser empregado em bancos de sangue.

1.5 UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA O DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

Anticorpos monoclonais (mAbs) e policlonais (pAbs) são amplamente empregados em aplicações terapêuticas, em diagnóstico clínico e em pesquisa (Figura 10). Nos diagnósticos sorológicos são comumente utilizados em ensaios, como citometria, biossensores, ELISA e RTDs (ASCOLI;AGGELER, 2018). Para o diagnóstico de malária, apresentam-se como um recurso auxiliar ao PCR e à microscopia (LINH et al., 2017). Apesar dos anticorpos monoclonais serem considerados mais específicos, os policlonais apresentam especificidade aceitável e seu processo de produção é muito mais simples e econômico. Dessa forma, tem se tornado uma abordagem vantajosa em testes diagnósticos para diversas doenças (LIPMAN et al, 2005; ASCOLI;AGGELER, 2018).

Todos os animais que apresentam uma resposta imune podem produzir anticorpos policlonais. A escolha do animal hospedeiro é baseada em vários fatores, sendo o mais importante a quantidade pretendida de anticorpos. Para a maioria dos trabalhos, os quais necessitam de uma quantidade inferior a 100 mL, o coelho é a espécie mais comumente utilizada para a produção de anticorpos policlonais (NAKAZAWA et al., 2016).

Figura 10 - Anticorpo policlonal e monoclonal.



A) Os anticorpos policlonais (pAb) exibem propriedades de ligação de múltiplos epítopos que tornam esses reagentes idealmente adequados para muitas aplicações. A diversidade clonal e biofísica de pAbs permite maior sensibilidade e utilidade em certos tipos de aplicações. B) Os anticorpos monoclonais baseados em hibridoma (mAb) são o produto de fusões de esplenócitos e células de mieloma, que são produzidos usando protocolos convencionais. Embora os mAbs exibam propriedades de ligação precisas e reproduzíveis de lote a lote, é necessário tempo, custo e expertise consideráveis para produzi-los. Os mAbs são frequentemente preferidos em aplicações que requerem aprovação regulamentar. Fonte: adaptado de ASCOLI;AGGELER, 2018.

Em um trabalho anterior, realizado pelo nosso grupo, Sousa *et al*. (2014) desenvolveu um novo teste ELISA sanduíche aplicando anticorpos policlonais contra *Pv*LDH. O imunoensaio apresentou a capacidade de detectar amostras infectadas com P. *vivax* e não foi observada reação cruzada com *P. falciparum*. O teste apresenta-se com uma estratégia viável e com uma relação custo-benefício interessante para o diagnóstico e pesquisas relacionados ao *P. vivax*. A pesquisa destaca que mais estudos devem ser realizados para verificar a aplicabilidade desses anticorpos para o diagnóstico da malária. O teste de citometria de fluxo que estamos propondo utilizou os anticorpos policlonais produzidos neste trabalho, obtidos a partir de coelhos e camundongo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar um teste de diagnóstico para malária causada por *Plasmodium vivax* utilizando a citometria de fluxo baseada em microesferas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento bibliográfico sobre a técnica de citometria utilizando microesferas para diagnóstico de doenças;
- Padronizar ensaios de citometria de fluxo utilizando microesferas e anticorpos contra lactato desidrogenase de *Plasmodium vivax*;
- Realizar os testes de citometria em amostras de sangue de pacientes;
- Determinar a sensibilidade e especificidade dos testes desenvolvidos.

3. METODOLOGIA

3.1 LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Neste estudo foi realizada a coleta de amostras de sangue provenientes de pacientes do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/ SESAU), Porto Velho - RO. Foram aceitos pacientes com idade entre 0 anos e 70 anos, com diagnóstico confirmado de monoinfecção por *Plasmodium vivax* e sem complicações.

Aos pacientes que preencheram os critérios de inclusão abaixo especificados e concordarem participar do estudo, foi solicitado a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou do termo de assentimento por seu responsável, caso seja menor de idade.

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Inclusão: Pacientes de ambos os sexos; Idade a partir de 0 anos a 70 anos; Ausência de sinais de malária grave; Temperatura axilar ≥ 37,5 ºC ou história de febre nas últimas 48 horas; Exame da gota espessa positivo para *P. vivax*, com parasitemia ≥ 100 e <100.00 parasitos assexuados/µL; Possibilidade de ser acompanhado durante o período de seguimento clínico parasitológico.

Exclusão: Infecção malárica mista; antecedente de malária nos últimos 06 meses; Gravidez; Histórico de hipersensibilidade aos antimaláricos ou aos medicamentos do mesmo grupo químico do estudo; antecedente do uso de medicamentos com potencial ação antimalárica nos últimos 60 dias.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

As amostras de sangue utilizadas foram provenientes de coletas, sob o comitê de ética de número CAAE: 28823719.4.1001.0005.

3.3 PROCEDIMENTOS

3.3.1 Obtenção de Anticorpos policlonais Anti-*Pv*LDH de coelho e camundongo

Os anticorpos policlonais anti-*Pv*LDH de coelho e camundongo utilizados neste estudo foram obtidos pelo nosso grupo em um trabalho anterior realizado por Sousa e colaboradores

(2014). Sendo assim, neste estudo, empregamos os PAbs anti-*Pv*LDH de coelho como anticorpos de captura para o reconhecimento de um fragmento (*Pv*LDH 1-43 aa). Como anticorpos primários foram usados os PAbs anti-LDH de camundongo para o reconhecimento da LDH de *Plasmodium* em sua quase totalidade (fragmento *Pv*LDH 35-305aa).

3.3.2 Citometria de fluxo

3.3.2.1 Ativação das *beads*

As *beads* de látex foram ativadas com a adição de 1 µL de *beads* de látex em 0,57µg/µL de EDAC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] e 2 mM/µL de NHS (N-hidroxissuccinimida), diluídas em 1/100 em PBS1x filtrado, e incubadas por 3 horas a 22 ºC sob agitação de 950 RPM.

3.3.2.2 Acoplamento ao anticorpo de captura

Após a ativação, foram adicionados os anticorpos policlonais anti- *Pv*LDH 1-43aa na concentração de 1 µg de anticorpo para 1 µL de *beads*, diluídas 1/1000 em PBS1x, em seguida foram incubadas nas especificações descritas anteriormente por 16 horas para possibilitar a ligação covalente às *beads*.

3.3.2.3 Bloqueio

Para realizar o bloqueio as *beads* foram centrifugadas a 2500 RPM a 15 ºC por 7 minutos. Descartou-se os sobrenadantes e as *beads* de látex foram lavadas uma vez com PBS-1x filtrado + BSA 0,5% por centrifugação de 2500 RPM, ressuspendidas em tampão de bloqueio (PBS1x filtrado + BSA 5%) e incubadas nas mesmas condições já descritas por 2 horas. Em seguida foi executado 1 ciclo de lavagem adicionando 500 µL PBS-1x filtrado + BSA 0,5% em centrifugação de 2500 RPM e posteriormente foi distribuído em 100 µL de solução de *beads* em cada tubo.

3.3.2.4 Testes com amostra de sangue dos pacientes utilizando anti-*Pv*LDH de coelho como captura e anti-*Pv*LDH de camundongo como primário

Após a realização das etapas descritas acima, as amostras foram preparadas adicionando 100 µL das hemácias + 100 µL de PBS1x pH 7,4 + Triton 0,1%, seguido de incubação de 10

minutos. Logo após foram distribuídas em seus respectivos tubos contendo 100 µL *beads*. O controle negativo foi feito utilizando amostras de sangue (hemácias) de pacientes sadios e o controle positivo foi feito utilizando 1 µg de proteína recombinante *Pv*LDH. Em seguida, foi incubado por *overnight*, em agitação de 950 RPM, a 4 °C. Seguidamente, foi realizado um ciclo de lavagem, conforme anteriormente descrito.

Logo após, realizou-se adição de 100µL do anticorpo primário proveniente de camundongo na concentração de 1 µg de anticorpo para 1 µL de *beads*, seguida de incubação por 1 hora, conforme já descrito e 1 ciclo de lavagem. A etapa seguinte foi a incubação por 1 hora com 100 µL de anticorpo secundário anti-mouse fluorescente Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific) diluído 1/2000. Logo depois foi realizado 1 ciclo de lavagem, seguido pela ressuspenção em PBS1x filtrado e pela leitura em citômetro de fluxo FACSCanto II™ (BD Biosciences ™).

3.3.2.5 Análise de sensibilidade e especificidade do teste

Os dados de sensibilidade e especificidade do teste foram obtidos por meio das seguintes fórmulas:

Sensibilidade = a/(a+c)
Especificidade = d/(b+d)
Valor preditivo positivo = a/(a+b)
Valor preditivo negativo = d/(c+d)

Onde,

	Positivo verdadeiro	Negativo verdadeiro
Teste positivo	A	B
Teste negativo	C	D

Para as demais análises dos resultados da citometria de fluxo e analises estatísticas, foram utilizados os programas FlowJo® e R studio versão 1.1.4.

CAPÍTULO I

ARTIGO DE REVISÃO

Neste capítulo da dissertação apresentamos um artigo de revisão produzido pelo nosso grupo de pesquisa no ano de 2022, traduzido para o português. Publicado na revista EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE; Fator de impacto: 3,6. DOI: doi.org/10.1177/15353702221113856.

APLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS DA CITOMETRIA DE FLUXO BASEADA EM MICROESFERAS: UMA REVISÃO

Adélia Marques de Figueiredo[1], Juliane Correa Glória[1], Yury Oliveira Chaves [2,3], Walter Luiz Lima Neves[4] e Luis André Morais Mariúba[1,2,4].

1- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, 69067-005, Brazil.
2- Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brazil.
3- Programa de Pós-graduação em biologia parasitária, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Manaus, AM, 21040-360, Brasil
4- Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-00, Brazil.

RESUMO

A citometria de fluxo baseada em microesferas é uma tecnologia emergente para a detecção sensível e específica de antígenos, anticorpos e ácidos nucléicos de interesse para análises clínicas. Nesta revisão foram analisados estudos voltados para a aplicação da citometria de fluxo como alternativa viável para a investigação de doenças infeciosas, destacando pesquisas voltadas para vigilância epidemiológica, candidatos vacinais e diagnóstico precoce, e para doenças não infecciosas, especificamente o câncer, enfatizando a detecção simultânea de biomarcadores para diagnóstico precoce, com resultados precisos e de forma não invasiva. A possibilidade de realização de ensaios multiplexados confere a esta técnica alta versatilidade e rendimento, evidenciados em uma série de estudos clínicos que verificaram a capacidade de detecção de diversas moléculas em baixas concentrações e com volume mínimo de amostras. Com isso, demonstramos que a citometria de fluxo baseada em microesferas apresenta-se como uma técnica promissora, podendo ser adotada como elemento fundamental no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico para doenças de importância médica.

ABSTRACT

Bead-based flow cytometry is an emerging technology for sensitive and specific detection of antigens, antibodies and nucleic acids of interest for clinical analysis. In this review, studies focused on the application of flow cytometry as a viable alternative for the investigation of infectious diseases were analyzed, highlighting research aimed at epidemiological surveillance, vaccine candidates and early diagnosis, and for non-infectious diseases,

specifically cancer, emphasizing simultaneous detection of biomarkers for early diagnosis, with accurate results in a non-invasive approach. The possibility of carrying out multiplexed assays gives this technique high versatility and performance, evidenced in a series of clinical studies that verified the ability to detect several molecules in low concentrations and with minimum sample volume. In this way, we demonstrate that *bead*-based flow cytometry presents itself as a promising technique, which can be adopted as a fundamental element in the development of new diagnostic methods for diseases of medical importance.

INTRODUÇÃO

A citometria de fluxo é uma técnica amplamente difundida e consolidada para diagnóstico clínico, além de ser empregada em estudos de hemovigilância, análises ambientais, desenvolvimento de vacinas, padronização de testes clínicos, entre outros. Inicialmente foi desenvolvida para a caracterização celular, no entanto a capacidade do método em detectar microesferas de acordo com suas propriedades propiciou a expansão de sua área de aplicação.[1-4]

O desenvolvimento de ensaios de citometria de fluxo utilizando microesferas ganhou notoriedade por apresentar características valiosas, como a alta sensibilidade, especificidade, precisão, produtividade, alto rendimento e por possibilitar triagem simultânea de múltiplos analitos em uma única amostra. O teste pode ser executado com um baixo volume de amostra, utilizando reagentes que são facilmente produzidos em laboratório. Além disso, o painel de analitos pode ser alterado com facilidade, conferindo uma grande flexibilidade ao teste.[3,5]

As microesferas possuem uma série de propriedades, como variedade de tamanhos e formas, estabilidade e capacidade de absorver e reter corantes fluorescentes, que são úteis em diversos tipos de análises citométricas de fluxo, simples ou multiplex. Outra característica importante para o diagnóstico é a presença de grupos funcionais (amino ou carboxila) nas microesferas, que permitem ligações não-covalentes e covalentes em suas superfícies por meio das interações moleculares, possibilitando o acoplamento químico ou adsorção de proteínas, oligonucleotídeos, polissacarídeos, lipídios ou peptídeos.[2,4-5]

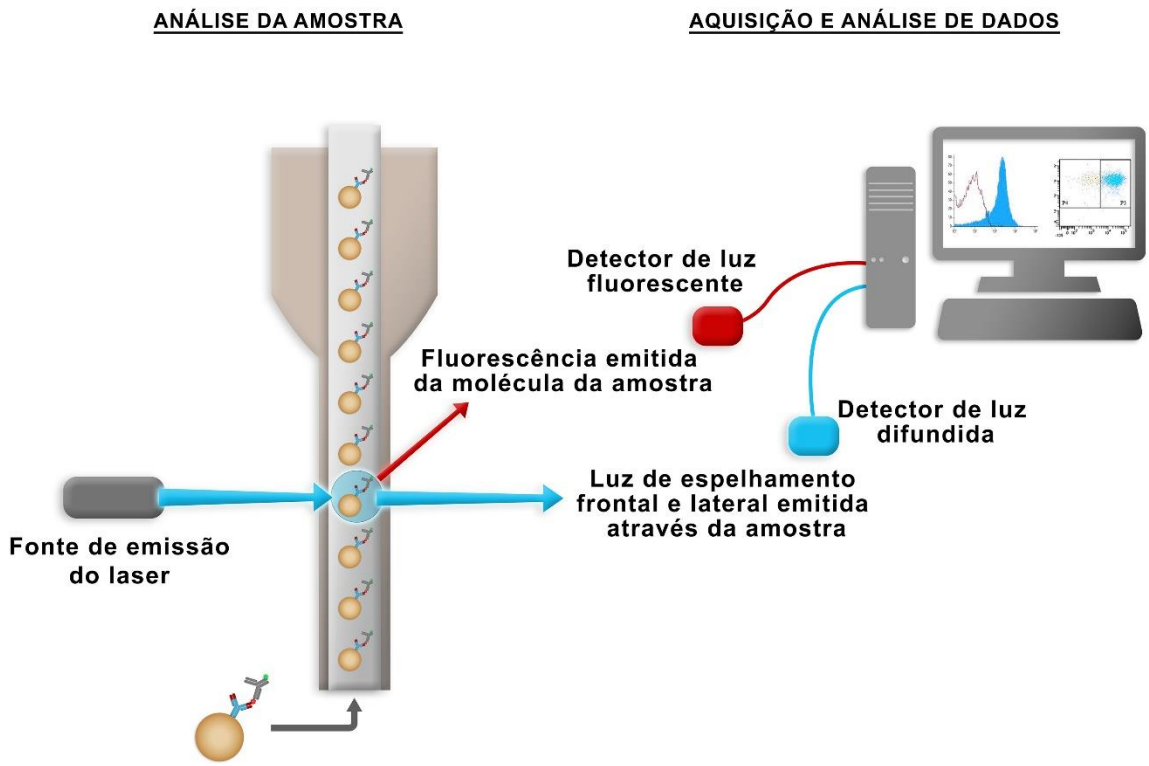
Ao longo dos últimos vinte e cinco anos diversos tipos de microesferas foram desenvolvidos para a aplicação em métodos diagnósticos que utilizam a citometria de fluxo. Podem ser customizados facilmente pelos pesquisadores de acordo com o objetivo da pesquisa ou estes podem optar pelo uso de microesferas previamente desenvolvidas já disponíveis comercialmente.[5]

Nesta revisão, objetivamos apresentar o panorama atual da aplicação das microesferas em citometria de fluxo para a detecção de doenças, como doenças infecciosas (bacterianas, virais e parasitárias) e não-infecciosas, dando ênfase às diferentes metodologias utilizadas e a eficácia da citometria de fluxo em diagnósticos sensíveis e específicos.

PRINCÍPIO E MECANISMO DE ENSAIOS DE CITOMETRIA BASEADOS EM MICROESFERAS

O citômetro de fluxo pode analisar simultaneamente vários parâmetros de partículas biológicas e não biológicas em suspensão. Em seu funcionamento, o sistema de fluxo alinha as partículas para que sejam interceptadas uma a uma por lasers. Em seguida, a emissão de luz e fluorescência dessas partículas é detectada pelo sistema ótico formado por filtros e espelhos. Os dados obtidos são interpretados pelo sistema eletrônico para que possam ser analisados graficamente (Figura 1).[1-3]

Figura 1- Funcionamento da técnica de Citometria de Fluxo.

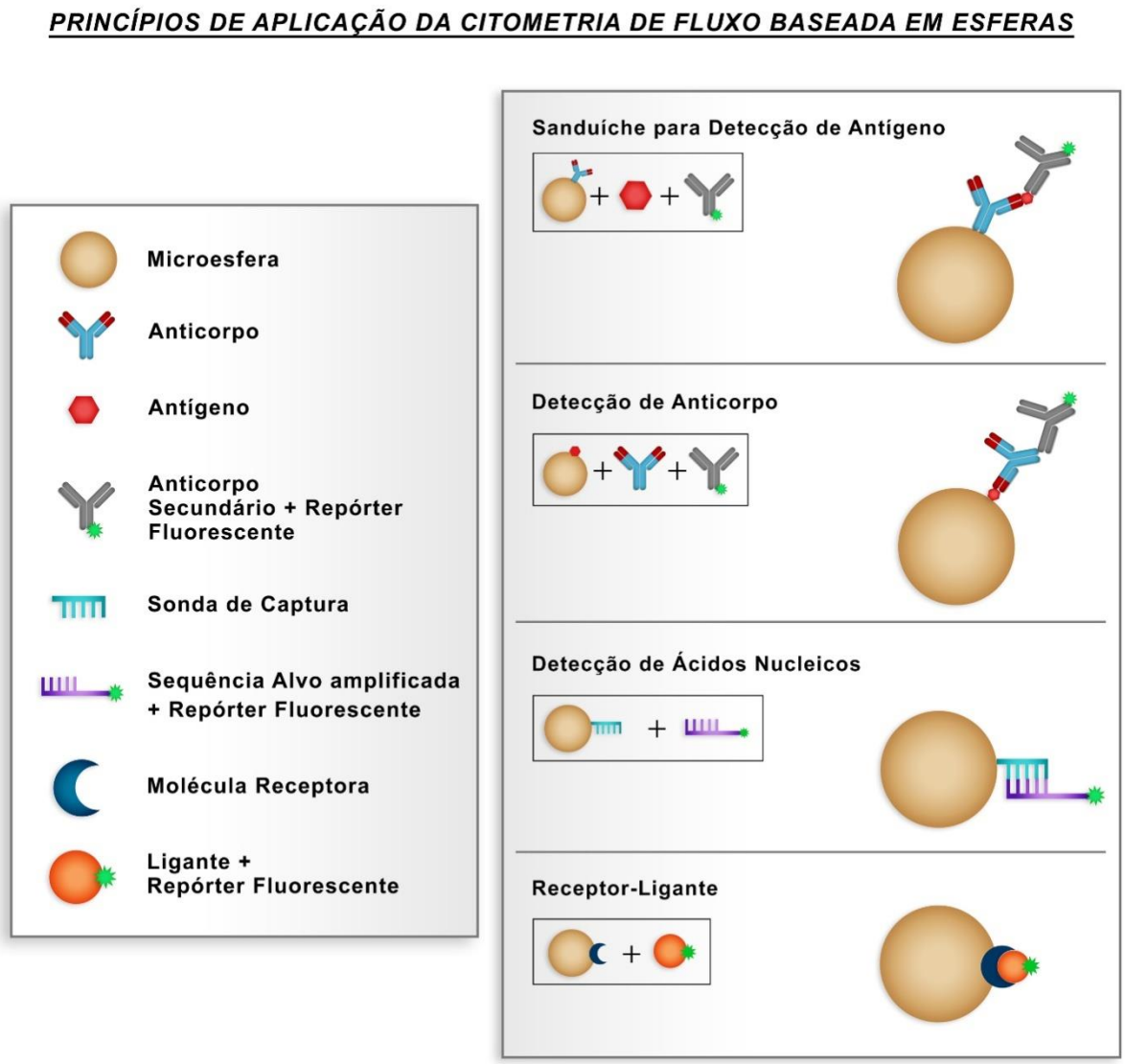


Câmara de fluxo para onde a suspensão é aspirada para sistema de espelhos e fotossensores e direcionada a um sistema de captação de luz, onde posteriormente o sistema computacional converte em dados digitais para análises.

A maioria das aplicações de microesferas em citometria de fluxo ocorre na forma de imunoensaios para determinação de proteínas, principalmente ensaios sanduíche e competitivos, nos quais o anticorpo de captura acoplado às microesferas permite a ligação do antígeno e este possibilita a ligação do anticorpo de detecção marcado com um repórter fluorescente (Figura 2(a)). A detecção de anticorpos também é possível usando microesferas com um antígeno específico acoplado, e também permite a ligação de anticorpos de detecção que são marcados com um repórter fluorescente (Figura 2(b)).[6,7]

As microesferas também são utilizadas em ensaios receptor-ligante, método já consolidado, e as microesferas acopladas à molécula receptora permitem interações com moléculas ligantes associadas ao repórter fluorescente. Aliada à técnica de citometria de fluxo de alto rendimento, a aplicação de microesferas para a detecção de ácidos nucléicos ganhou destaque nos últimos anos devido à sua capacidade de identificar diferentes tipos de microrganismos em nível molecular. Para a detecção de ácidos nucleicos, uma sonda de captura imobilizada na superfície de uma população de microesferas se liga a um produto amplificado que possui sequências complementares à sonda (Figuras 2(c) e 2(d)).[6,7]

Figura 2- Princípios de aplicação da citometria de fluxo baseada em esferas



Principais arranjos de imunoensaios de citometria de fluxo com base em microesferas. Em cada tipo de arranjo a análise de citometria de fluxo identifica a população das microesferas e o sinal da molécula fluorescente. **A)** Detecção de antígeno pelo método sanduíche, onde o anticorpo de captura acoplado a microesfera permite a ligação do antígeno e este possibilita a ligação do anticorpo de detecção marcado com um repórter fluorescente. **B)** Detecção de anticorpos utilizando microesferascom um antígeno específico acoplado,permitindo assim a ligação de anticorpos de detecção marcados com um repórter fluorescente. **C)** Na detecção de ácidos nucleicos uma sonda de captura imobilizada na superfície de uma população de microesferas liga-se a um produto amplificadoque possui sequências complementares à sonda. **D)** As microesferas acopladas à molécula receptora permitem a interação com moléculas ligantes associadas ao repórter fluorescente.

APLICAÇÕES DIAGNÓSTICAS

Doenças infecciosas

As doenças bacterianas, virais e parasitárias são graves problemas de saúde pública e demandam ações constantes para sua prevenção, diagnóstico e tratamento. A detecção de microrganismos e seus biomarcadores de forma rápida, precisa e econômica ainda é um desafio para centros de pesquisa e iniciativas de vigilância epidemiológica.[1] A aplicação da citometria de fluxo baseada em esferas para a detecção e identificação de doenças infeciosas tem sido utilizada em imunoensaios promissores, sendo a análise simultânea de patógenos diversos objeto de desenvolvimento de novos métodos diagnósticos.[5] Vários exemplos são mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Ensaios Multiplexados para agentes infecciosos

Microrganismos detectados simultaneamente	Princípio do Teste	Autor/Ano
Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Haemophilus influenza, Mycoplasma pneumoniae, Legionella spp., Pseudomonas aeruginosa e *Klebsiella pneumoniae*	Método multiplex de PCR-Luminex	JIANG et al.[8]
Mycobacterium tuberculosis, Cryptococcus neoformans, Streptococcus pneumoniae, eherpes simplex virus types 1 and 2	Método multiplex de PCR-Luminex	ZHOU et al.[9]
Adenovirus, rotavirus, norovirus, Salmonella spp., Campylobacter spp., Shigella spp., Clostridium difficile, Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Vibrio cholerae, Giardia lamblia, Entamoeba histolytica e *Cryptosporidium spp.*	Método multiplex de PCR-Luminex	CLAUSS et al.[10]
Shigella spp., Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae, Legionella pneumophila, e *Clostridium botulinum*	Método multiplex de PCR-Luminex	ZHAO et al.[11]
Papilomavirus humano, Helicobacter pylori, vírus da hepatite C e Poliomavírus JC	Imunoensaio Luminex	WATERBOER et al.[12]
Norovírus GI e GII, rotavírus, astrovírus, sapovírus e adenovírus	Método multiplex de PCR-Luminex	LIU et al.[13]

Cryptosporidium spp., Giardia intestinalis, Entamoeba histolytica, Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides, Necator americanus e*Strongyloides stercoralis*	Método multiplex de PCR-Luminex	TANIUCHI et al.[14]
Toxoplasma gondii, rubella e *cytomegalovirus*	Imunoensaio Luminex	BINNICKER et al.[15]

Infecções Bacterianas

O desenvolvimento de métodos precisos, sensíveis e confiáveis para identificação de bactérias, antígenos e anticorpos relacionados, é uma das estratégias mais vantajosas nas áreas de pesquisa, diagnóstico e vigilância epidemiológica de infecções bacterianas.

Dentre os métodos modernos de grande uso na atualidade, a citometria de fluxo se destaca como uma técnica confiável para tornar possível a análise de células bacterianas em condições individuais e populacionais. A evolução dos processos e dos aparelhos utilizados permitiu o aperfeiçoamento da contagem de células bacterianas viáveis e inviáveis, com o fornecimento de informações celulares multiparamétricas que seriam impossíveis de serem obtidas com o método tradicional de contagem em placas.[16-18]

Diferentes estudos demonstram a possibilidade de aplicação da citometria de fluxo para testes bacterianos, sendo o uso de esferas e a multiplexação de ensaios formas de ampliar o espectro de utilização desta técnica. Além das interações antígenos- anticorpo e detecção de bactérias, existem variações da técnica que são voltadas para o estudo de interações com receptor-ligante, interações enzima-substrato, assim como detecção de ácidos nucleicos com sondas de hibridização especiais.[6-7] Como exemplo dessa abordagem pode ser citado o estudo de Zeng et al.,[19] que combinou um sistema de citometria de fluxo com esferas e sondas oligonucleotídicas direcionadas ao RNA bacteriano.

No estudo de Ou et al.,[18] um método de citometria de fluxo baseado em esferas foi avaliado e otimizado para quantificar proporções variáveis de *Escherichia coli* vivas e mortas, em citômetros de fluxo básicos. Métodos de contagem de placas foram realizados simultaneamente com medições de citometria de fluxo para obter a concentração de bactérias vivas nas amostras finais. Os resultados obtidos foram significativos e evidenciaram uma relação linear entre os dois métodos de contagem de bactérias vivas e mortas, com resultados variando de 10^8 a 10^4 bactérias por mililitro. Além disso, o estudo demonstrou que a citometria de fluxo pode ser aplicada na análise de outras espécies bacterianas.

A detecção de células bacterianas também pode ser realizada utilizando-se a citometria de fluxo com base em esferas combinada com técnicas de biologia molecular. Um exemplo que pode ser citado é adetecção de *Neisseria meningitidis* no líquido cefalorraquidiano utilizando um sistema de PCR Multiplex e a Tecnologia de detecção Luminex.[20] Outro exemplo é um método inovador de detecção de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* que foi desenvolvido empregando uma combinação de sondas oligonucleotídicas direcionadas ao rRNA 16S e um sistema de citometria de fluxo com uso de esferas. O RNA total foi extraído e transcrito em cDNA e, em seguida, foi amplificado com o objetivo de gerar DNA alvo de fita simples. Uma parte do DNA alvo foi capturada por uma sonda de captura imobilizada em microesferas magnéticas e a outra parte foi hibridizada com uma sonda sinal marcada com fluorescência. O complexo formado foi então analisado por citometria de fluxo. O limite de detecção alcançado pelo teste foi de 180 UFC/ml e mostrou grande potencial para a análise simultânea de mais de uma espécie bacteriana.[19]

Uma parcela dos estudos sobre infecções bacterianas focou seus esforços na identificação e na quantificação de antígenos estafilocócicos e anticorpos IgG, IgM e IgA contra estes antígenos, com o objetivo de elaborar novos métodos de diagnóstico e de soroepidemiologia.[21,22]

Verkaik, et al.[21] caracterizaram a heterogeneidade da resposta imune humoral por *S. aureus e*, com o objetivo de detectar um antígeno com o potencial para atuar em vacinas, desenvolveram um ensaio multiplexado de citometria com base em esferas com 19 antígenos estafilocócicos simultaneamente, para detectar os níveis de IgG, IgA e IgM. Os resultados mostraram que cada paciente apresentou uma resposta imune única e, portanto, vacinas com múltiplos componentes são as mais indicadas. Den Reijer et al.,[22] com a mesma metodologia do estudo anterior, caracterizaram os níveis séricos de anticorpos IgG e IgA contra 56 antígenos estafilocócicos. Seus resultados apontaram uma heterogeneidade na resposta imune para os antígenos estafilocócicos testados.

Para a identificação de antígenos estafilococos, Simonova et al.[23] desenvolveram um ensaio multiplex com microesferas para detecção de três toxinas estafilocócicas - enterotoxinas A e B e toxina da síndrome do choque tóxico – obtidas de sobrenadantes de culturas de diferentes cepas de *S. aureus*. Os limites de detecção foram 10, 1000 e 5 pg/mL, respectivamente. A alta eficácia do teste evidenciou que o mesmo pode ser utilizado para diagnóstico clínico e na análise ambiental e de alimentos. Sharma et al.[24] apresentaram um ensaio de citometria de fluxo multiplex de duas cores com base em esferas, usando domínios proteicos únicos da cadeia beta de receptores de células T com alta afinidade para três toxinas

estafilocócicas e duas estreptocócicas. As sensibilidades alcançadas pelos testes foram de 4 a 80 vezes maiores quando comparados ao ELISA, com a vantagem de utilizar menos reagentes e um volume menor da amostra.

Estudos experimentais envolvendo antígenos pneumocócicos também foram objetos de análise de diversos grupos de pesquisa, principalmente com o objetivo de determinar os antígenos que poderiam ser candidatos vacinais contra pneumococos e para monitorar sua eficácia. Alguns estudos aplicaram imunoensaios de citometria de fluxo multiplex com base em esferas contra antígenos pneumocócicos.[25–27] A mesma tecnologia Multiplex para a detecção de anticorpos contra as proteínas *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis* foi utilizada para o acompanhamento de respostas humorais em pacientes infantis com até 13 anos de vida[27] e em crianças com pneumonia adquirida na comunidade.[25] Um ensaio automatizado com uma combinação de testes multiplex baseados em anticorpos monoclonais e em PCR foi desenvolvido usando a tecnologia de Citometria de fluxo com base em esferas da Luminex para realização da sorotipagem de isolados pneumocócicos.[28]

Infecções Virais

As infecções virais são um grave problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo o mundo. Novos métodos de diagnósticos sensíveis e específicos são ferramentas indispensáveis para reduzir o número de casos. Nas últimas décadas os ensaios de citometria de fluxo baseados em esferas emergiram como uma alternativa viável para o diagnóstico de diversas doenças virais.[1,29]

Recentemente, houve um aumento significativo no número de estudos relacionados à virometria, uma tecnologia promissora e altamente sensível, capaz de detectar e classificar partículas virais com auxílio de anticorpos específicos fluorescentes acoplados a esferas. Este complexo é analisado por citômetros de fluxo, permitindo assim a quantificação e a caracterização fenotípica de partículas virais únicas em sobrenadantes, fluidos corporais ou tecidos.[30-32] A detecção de vírus por citometria de fluxo é possível devido à otimização dos citômetros de fluxo comerciais, que possuem lasers avançados e um sistema de foco digital e óptica aperfeiçoados, fornecendo a classificação com base nos arranjos entre os parâmetros de dispersão da luz e os canais fluorescentes.[33-35]

Para o diagnóstico de Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), diversas abordagens utilizando a citometria de fluxo estão sendo desenvolvidas.[32] Um novo método de diagnóstico com potencial para simplificar o monitoramento do HIV foi desenvolvido por Yufenyuy e Parekh[36] a partir de um ensaio multiplex com grânulos acoplados a uma proteína de fusão p24-

gp41 do HIV-1 e peptídeo do HIV-2 da região imunodominante da glicoproteína gp36 para detectar a sorotipagem de HIV e HIV-2, respectivamente. Os resultados mostraram alta reprodutibilidade e capacidade de diagnosticar a infecção pelo HIV, realizar a sorotipagem, detectar e distinguir entre infecções recentes e de longa duração em um único teste.[36] Também foram desenvolvidos testes para a detecção da proteína p24 em vários subtipos de HIV-1.[37,38] Os resultados mostraram que o método é 91% mais sensível que o teste ELISA padrão e também tem um custo menor.[37]

Fonseca et al.,[39] desenvolveu um novo imunoensaio multiplex baseado em esferas para detecção da Hepatite C (HCV), empregando individualmente no ensaio simplex os antígenos recombinantes NS3, NS4 E NS5 do HCV e a combinação dos mesmos no ensaio multiplex. Neste, o estudo apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, tendo o potencial de se tornar uma alternativa possível para o diagnóstico de HCV e com um custo de 2 a 4 vezes menor do que os testes usualmente empregados. Podemos citar também o trabalho de Neves et al.,[40] que realizou um teste de citometria de fluxo utilizando esferas magnéticas com capacidade de detectar IgG humana contra proteínas do Core e NS5a do HCV. A sensibilidade deste imunoensaio foi de 93,3% quando empregadas esferas com as proteínas recombinante do CORE e NS5a, e apresentou especificidade de 100% e 96,67% para a detecção de anti- rCore e anti- rctNS5a, respectivamente.Outra alternativa de utilização de citometria de fluxo para diagnóstico de HCV foi desenvolvida por Yang et al.,[41] com a realização do ensaio de genotipagem multiplex para determinar os seis tipos de genótipos de HCV. Foi utilizada uma matriz de esferas em suspensão analisadas por citometria de fluxo, evidenciando a confiabilidade, rapidez e eficiência da análise. A principal vantagem demostrada foi o baixo volume de amostra necessário para a sua execução.

Com base nas vantagens da análise multiplexada, foi desenvolvido um novo teste para a subtipagem do vírus da influenza aviária (AIV). Este novo método pode ser explorado para a determinação rápida de respostas imunes ao AIV em uma variedade de sistemas complexos. A sensibilidade do teste permite a detecção de ácidos nucleicos das cepas AIV H5N1 e H9N2 em um limiar de 74 e 1 pg, respectivamente.[42]

Infecções parasitárias

Apesar dos importantes avanços no controle das infecções parasitárias, ainda há um grande número de casos em todo o mundo. Diante desse cenário, diversas frentes de pesquisa buscam novos métodos de diagnóstico, com alta sensibilidade e especificidade, a fim de

diagnosticar, principalmente, pacientes semi-imunes e com baixa parasitemia.[43] A citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada para estudos relacionados à malária,[44] mas apenas nos últimos 10 anos ganharam força estudos voltados para o diagnóstico etiológico e, com isso, os ensaios multiplexados combinados com esferas surgiram como uma alternativa confiável para a sorologia da malária.[45]

A padronização e validação de um CBA de anticorpos para antígenos de *P. falciparum*, mostrou-se um teste com potencial para diagnóstico de malária e fornece vantagens específicas quando comparado ao ELISA, que incluem a conservação da amostra, a capacidade de detectar vários analitos em um único teste, a diminuição no tempo de processamento da amostra devido à cinética do ensaio e a diminuição de custos.[46]

Em um estudo realizado em regiões endêmicas do Brasil e Papua Nova Guiné, que tinha como objetivo avaliar respostas humorais adquiridas naturalmente, foi validado o ensaio multiplex para quantificar anticorpos IgG contra a proteína 1 de superfície de merozoíto de *P. vivax*.[47] Para a detecção de anticorpos de cinco candidatos à vacina para *P. falciparum*, foi realizado um CBA comparativo com esferas magnéticas e não-magnéticas, mostrando que o ensaio com esferas magnéticas são uma alternativa viável na sorologia de anticorpos da malária.[45]

Um novo imunoensaio capaz de detectar a proteína 2 rica em histidina (HRP2), um importante marcador de infecções por *Plasmodium falciparum*, em níveis de sub-picogramas, foi desenvolvido com o uso de um sistema de citometria de fluxo baseada em esferas. O ensaio apresentado é altamente específico e econômico, permitindo o processamento e a triagem de expressiva quantidade de amostras.[48] O sistema foi utilizado para avaliar os resultados dos testes de diagnóstico rápido para HRP2 em diferentes condições de transmissão de *P. falciparum*, gerando estimativas para o verdadeiro desempenho em campo.[48] Também foi adotado este sistema para avaliar a concentração de HRP2 em pacientes após o tratamento,[49] em indivíduos assintomáticos com malária,[50] para atribuir febre à malária,[51] para pesquisa de deleção de genes de Pfhrp2 e Pfhrp3[52] e em estudo para sorovigilância.[53]

Um teste inovador foi proposto por Lloyd et al.,[54] um ensaio citométrico simples e de alto fluxo, que realiza a leitura em um citômetro de fluxo de células THP-1 e esferas fluorescentes acopladas covalentemente ao antígeno da malária VAR2CSA, que fornece a porcentagem total de fagocitose mediada por anticorpo e semi-quantifica o número de esferas acopladas ao antígeno internalizadas. Apresenta grandes vantagens devido à estabilidade das esferas por longos períodos, necessidade de pouco antígeno acoplado e pelo fato de não requerer culturas de parasitos.

Demais aplicações de CBA para outras infecções parasitárias também foram encontradas, como o ensaio multiplex para a identificação de anticorpos IgM e IgG para *Toxaplasma gondii*. O teste mostrou-se de alto rendimento e eficiência para a análise, no entanto, indicava que mais estudos precisavam ser realizados para validar os resultados.[15] O desempenho deste imunoensaio foi avaliado em casos críticos de sorodiagnóstico de toxoplasmose, por Guigue et al.,[55] e demonstraram que o método é suficientemente sensível (97,8%) e específico (91,3%) para detecção de IgG e altamente específico (97,4%) para anticorpos IgM contra *T. gondii*.

Os parasitos intestinais também são objeto de muitas pesquisas, principalmente sobre novas abordagens diagnósticas. É comum que parasitoses intestinais sejam causadas por mais de uma espécie de parasito, portanto, ensaios multiplex com a finalidade de detectar mais de um patógeno em um único teste são importantes para estudos epidemiológicos e de sorovigilância.[14] Um estudo utilizando a combinação de PCR multiplex e a detecção baseada em sonda com esferas Luminex foi desenvolvido para identificação de sete parasitos intestinais: *Cryptosporidium spp., Giardia intestinalis, Entamoeba histolytica, Ancylostoma duodenale, Ascaris lumbricoides, Necator americanus e Strongyloides stercoralis*. Os resultados apresentaram alta sensibilidade e especificidade, garantindo ao teste um alto rendimento para detecção de vários parasitos intestinais.[14]

Câncer

Nesse tópico abordaremos o uso da citometria de fluxo baseada em esferas para a detecção e identificação de doenças não infecciosas. Essa tecnologia tem sido amplamente aplicada para o diagnóstico de doenças graves, como: o câncer, doenças imunológicas e cerobrovasculares. Permitindo a detecção em estágios iniciais de desenvolvimento, além de ser mais interessante economicamente quando comparada aos métodos tradicionais de diagnóstico. Além disso, os processos envolvidos são pouco invasivos e tem a vantagem de não necessitarem de uma grande quantidade de amostra para sua realização.

O câncer é uma doença que apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A análise de biomarcadores diagnósticos ou prognósticos é objeto de diversas frentes de pesquisa, que buscam estabelecer métodos eficazes para a identificação da doença em seus estágios iniciais, aumentando a probabilidade de sucesso do tratamento. Os ensaios multiplexados com base em esferas são considerados uma ferramenta valiosa a para

identificação precoce e simultânea de diferentes tipos de biomarcadores de tumores: colorretais, de mama, ovário, pulmão, pâncreas e melanomas.[3,56]

Câncer de Mama

O sucesso no tratamento do câncer de mama está relacionado ao diagnóstico precoce da doença, pois possibilita que a ressecção cirúrgica ocorra em uma fase inicial, quando a chance de sobrevivência dos pacientes é maior. O câncer de mama possui um comportamento heterogêneo e a utilização de mais de um biomarcador é apropriada para a sua identificação.[3]

O desempenho diagnóstico de um painel de teste de câncer multiplex foi avaliado por Hermann et al.[57] Vinte e quatro parâmetros associados ao tumor foram analisados em soros de pacientes com câncer de mama e controles saudáveis. Os autores relataram uma sensibilidade de 33,8% com especificidade de 95% para a discriminação entre tumores de câncer de mama benignos e malignos. O antígeno de câncer 15-3 foi o mais relevante para o diagnóstico diferencial.

Opstal-van Winden et al.[58] desenvolveram um imunoensaio multiplex baseado em esferas para avaliar simultaneamente 10 biomarcadores séricos de câncer de mama nos estágios iniciais de desenvolvimento. Os resultados deste estudo mostraram que o painel de biomarcadores utilizado não teve valor para o diagnóstico precoce; entretanto, recomendava-se que combinações de outras proteínas pudessem apresentar resultados mais satisfatórios.

Markou et al.[59] desenvolveram um arranjo de esferas líquidas acoplado a PCR multiplexado, que foi realizado usando CTC-mRNA. Produtos de PCR biotinilados foram hibridados contra microesferas fluorescentes modificadas com sondas de captura gene-específicas e desenvolvidas com estreptavidina-ficoeritrina, que foram analisadas por citometria de fluxo Luminex. Esse ensaio molecular mostrou-se específico para cada gene e proporcionou a detecção molecular simultânea de seis genes CTC em um volume amostral limitado, o que diminuiu o custo e o tempo de execução quando comparado ao RT-qPCR. O teste pode ser otimizado para a detecção simultânea de até 100 genes.

Câncer de Pâncreas

Foram propostos ensaios com alta sensibilidade e precisão para o diagnóstico de câncer de pâncreas, um dos mais agressivos, com altas taxas de mortalidade e o qual não possui testes

aceitos para detecção precoce com base na análise de amostras de sangue.[60] Um dos estudos realizados para o diagnóstico inicial do câncer pancreático foi elaborado por Li et al.,[61] que executaram um ensaio multiplex sanduíche para determinar os padrões de glicosilação de lecitinas no soro de pacientes com esse tipo de tumor, identificando um biomarcador capaz de distinguir pacientes com pancreatite crônica daqueles com câncer de pâncreas.

Usando uma abordagem diferente, Lux et al.[60] visaram identificação de exossomos liberados por carcinomas pancreáticos que expressam C-met e PD-L1 em suas membranas. Os exossomos foram isolados de culturas, acoplados a esferas, corados com anticorpos específicos e analisados por citometria de fluxo. Foi evidenciado neste estudo que PD-L1 não possui valor diagnóstico para tumores pancreáticos, no entanto C-met obteve a sensibilidade de 70% e especificidade de 85%. Sugeriu-se para um estudo futuro, visando melhorar a especificidade, a combinação do teste com um antígeno específico estabelecido e pesquisas com um maior número de pacientes.

Câncer de Pulmão

Em 2018, o câncer de pulmão foi responsável por 1,7 milhão de mortes em todo mundo. Considerado o câncer mais comum, seu diagnóstico em fase inicial é crucial, porém a maioria dos pacientes é diagnosticada tardiamente.[62] Visando a detecção precoce do tipo mais comum de câncer de pulmão, o de células não pequenas, um novo imunoensaio citométrico baseado em esferas multiplex foi desenvolvido por Lee et al.[63] para a caracterização de biomarcadores séricos relacionados à doença. A partir da análise de uma matriz multiplex de 30 marcadores séricos e, com a utilização de um algoritmo de classificação, foi estabelecido que a detecção de 5 biomarcadores (A1AT, CYFRA 21-1, IGF-1, RANTES, AFP) permitia a realização de diagnóstico com alta precisão, possibilitando a distinção entre pacientes saudáveis e pacientes com câncer pulmonar.

Outro estudo, realizado por Goebel et al.,[64] aplicou a mesma metodologia para o diagnóstico de pacientes com câncer assintomáticos, porém a análise foi realizada com 82 biomarcadores e, destes, 33 apresentaram valor diagnóstico para o estágio inicial da doença. A precisão do método foi de 90%, a sensibilidade de 80% e a especificidade de 95%. Como continuação deste estudo, com o objetivo de reduzir o número de biomarcadores utilizados e ainda assim manter a alta sensibilidade, precisão e especificidade do teste, foi realizada a validação de 21 biomarcadores com um modelo estatístico (Lung Cancer Detector Test 1),

apresentando 95,6% de precisão, 89,1% de sensibilidade e 97,7% de especificidade. Além de aperfeiçoar a análise, alcançaram também a diminuição no custo do procedimento.[65]

Síndrome inflamatória

Os ensaios de citometria de fluxo baseados em microesferas foram aplicados ao diagnóstico de muitas outras doenças. Von Bahr Greenwood et al.66 aplicaram essa técnica para detecção de CD25 em amostras de soro de pacientes e associaram altos níveis da molécula e ferritina com linfohistiocitose hemofagocítica (LHF) secundária (adquirida).

De maneira semelhante, usando CBA, Maruoka et al.67 identificaram a proteína 10 induzida por interferon (IP-10)/CXCL10 e a monocina induzida por interferon gama (MIG)/CXCL9 como marcadores úteis para o diagnóstico de síndrome hemofagocítica associada a linfoma. Os autores também sugeriram o uso desse método para fins terapêuticos, gravidade da LAHS e diferenciação de sepse.

Com técnicas de ensaio citométrico de microesferas, Chen et al.68 analisaram se o perfil de citocinas Th1/Th2 poderia ser usado para distinguir HLH primária de secundária. Os autores relataram que níveis mais baixos de IL-4 e IFN-γ em pacientes com HLH estão associados com HLH primária, demonstrando assim que o CBA pode ser usado como ferramenta adicional para o diagnóstico diferencial de HLH.

A medição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) usando CBA foi realizada por Maier et al.69 em diabéticos e não diabéticos, com relatos de elevação desse marcador in vitro. Essa técnica poderia ser aplicada para a síndrome de polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal e anormalidades cutâneas (POEMS), que é uma doença paraneoplásica multissistêmica rara com discrasia de células plasmáticas70, uma vez que o aumento dos níveis circulantes de VEGF foi relatado em pacientes com POEMS.71,72,73 Provavelmente também poderia ser útil no acompanhamento de pacientes com síndrome POEMS como um biomarcador de resposta ao tratamento.73,74,75

A medição da relação IL-10 e IL-10:IL-6 usando CBA também tem sido útil para os valores diagnósticos e prognósticos do líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes com linfoma primário difuso de grandes células B do sistema nervoso central (PCNSL).76 Da mesma forma, esta técnica tem sido utilizada para monitorar a curva de variação de múltiplas citocinas em amostras de sangue periférico de pacientes com síndrome de liberação de citocinas

(SRC) após terapia com células T quiméricas de receptores de antígenos (CAR-T). Nguyen-Them et al.77 relataram que a detecção do nível de IL-10 é uma ferramenta útil para o diagnóstico de PCNSL.

Reações alérgicas

As alergias representam as doenças não infecciosas mais prevalentes em todo o mundo, destacando-se as alergias alimentares, que vêm aumentando nas últimas décadas. Assim, o desenvolvimento de ferramentas de monitoramento de alérgenos alimentares é necessário para garantir a segurança do consumidor. Vários estudos têm verificado a eficiência do uso de microesferas acopladas a antígenos para verificar a presença do alérgeno ou para a detecção de anticorpos IgE. Uma vez que a disponibilidade de moléculas alergênicas e microtecnologias de alto rendimento permitem a coleta de um grande número de resultados IgE, podendo assim ser realizada e aplicada na rotina diagnóstica.[78-79] Este tipo de abordagem é possível graças ao uso de componentes naturais ou recombinantes, seja utilizando um único reagente para cada espécime (singleplex) ou através de um painel mais complexo de moléculas a serem testadas no mesmo teste, podendo ser reveladas por citometria de fluxo.[80]

A capacidade de detectar múltiplos alérgenos alimentares em diferentes tipos de alimentos tem sido avaliada ao longo do tempo, resultando na implementação de métodos mais sensíveis, rápidos e de menor custo, como o uso de microesferas e a citometria. Gomaa & Boye[81] compararam ELISA, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e métodos de citometria de fluxo multiplex para a detecção de múltiplos alérgenos incorridos simultaneamente em um sistema alimentar modelo onde a citometria de fluxo foi realizada de forma semelhante aos testes ELISA. Além disso, Pomponi et al.[82] relataram características para a implementação de imunoensaios baseados em microesferas e citometria, sendo possível observar boa reprodutibilidade da sensibilidade em um ensaio para detecção de IgE em sistema multiplex utilizando moléculas alergênicas e microesferas fluorescentes analisadas por citometria de fluxo.[82]

A detecção simultânea em diferentes fontes alimentares foi demonstrada por Otto et al.[83] que relataram a detecção de cinco alérgenos com concentrações inibitórias medianas (IC_{50}) que variaram de 2,5 a 15 mg/kg de acordo com o alérgeno a ser detectado. Maeimaridou et al.[84] desenvolveram um imunoensaio baseado em citometria de fluxo usando tecnologia de microesferas codificadas por cores para detectar benzo[a]pireno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em tampões e extratos de alimentos, enquanto Zhou et al.[85] observaram

hipersensibilidade mediada por IgE ao polietileno glicol e o risco de anafilaxia pelo consumo deste produto. Esses resultados reforçam a importância dos sistemas de triagem e identificação para alérgenos alimentares emergentes conhecidos ou mesmo desconhecidos.

Reações clínicas de hipersensibilidade contra L-asparaginase foram relatadas durante o tratamento de leucemia linfoblástica aguda em até 70% dos pacientes. Usando CBA, Rathod et al.[86] relataram a detecção de anticorpos anti-asparaginase IgG1 e IgE em camundongos imunizados com asparaginase, que apresentaram reações graves de hipersensibilidade após contato com asparaginase. Os autores destacam a importância de monitorar esses anticorpos em pacientes e que os ensaios baseados em microesferas são uma alternativa viável para isso.

CONCLUSÃO

Nos últimos anos a citometria de fluxo foi potencializada com a aplicação de microesferas codificadas e com o aperfeiçoamento dos equipamentos utilizados, possibilitando a realização de imunoensaios multiplexados voltados para a detecção de infecções bacterianas, virais e parasitárias, além do diagnóstico de doenças não-infecciosas. Tendo em vista os resultados majoritariamente positivos levantados por esta revisão, que demostraram a alta sensibilidade e especificidade da técnica, a citometria de fluxo baseada em microesferas tem o potencial de figurar como eixo central de novas abordagens para pesquisa e diagnóstico. Esta tecnologia apresenta-se como uma alternativa viável e promissora que, apesar de ainda não ter sido aplicada em larga escala, possui as características necessárias para tal, principalmente em centros de pesquisa e diagnóstico que já trabalham com citômetros.

REFERÊNCIAS

1. Engin ED. The use of multiplexing technology in the immunodiagnosis of infectious agents. *J Immunoassay Immunochem* 2019;**40**:109–22

2. Kellar KL, Iannone MA. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. *Exp Hematol* 2002;**30**:1227–37

3. Parsa SF, Vafajoo A, Rostami A, Salarian R, Rabiee M, Rabiee N, Rabiee G, Tahriri M, Yadegari A, Vashaee D, Tayebi L, Hamblin MR. Early diagnosis of disease using microbead array technology: a review. *Anal Chim Acta* 2018;**1032**:1–17

4. Morgan E, Varro R, Sepulveda H, Ember JA, Apgar J, Wilson J, Lowe L, Chen R, Shivraj L, Agadir A, Campos R, Ernst D, Gaur A. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin Immunol* 2004;**110**:252–66

5. Graham H, Chandler DJ, Dunbar SA. The genesis and evolution of bead-based multiplexing. *Methods* 2019;**158**:2–11

6. Antal-Szalmás P, Nagy B Jr, Debreceni IB, Kappelmayer J. Measurement of soluble biomarkers by flow cytometry. *EJIFCC* 2013;**23**:135–42

7. Ou F, McGoverin C, White J, Swift S, Vanholsbeeck F. Bead-based flow-cytometric cell counting of live and dead bacteria. *Methods Mol Biol* 2019;**1968**:123–34

8. Jiang L, Ren H, Zhou H, Qin T, Chen Y. Simultaneous detection of nine key bacterial respiratory pathogens using Luminex xTAG® technology. *Int J Environ Res Public Health* 2017;**14**:223–38

9. Zhou L, Wu R, Shi X, Feng D, Feng G, Yang Y, Dai W, Bian T, Liu T, He Y, Shi M, Zhao G. Simultaneous detection of five pathogens from cerebrospinal fluid specimens using luminex technology. *Int J Environ Res Public Health* 2016;**13**:193–204

10. Claas EC, Burnham CA, Mazzulli T, Templeton K, Topin F. Performance of the xTAG® gastrointestinal pathogen panel, a multiplex molecular assay for simultaneous detection of bacterial, viral, and parasitic causes of infectious gastroenteritis. *J Microbiol Biotechnol* 2013;**23**:1041–5

11. Zhao J, Kang L, Hu R, Gao S, Xin W, Chen W, Wang J. Rapid oligonucleotide suspension array-based multiplex detection of bacterial pathogens. *Foodborne Pathog Dis* 2013;**10**:896–903

12. Waterboer T, Dondog B, Michael KM, Michel A, Schmitt M, Vaccarella S, Franceschi S, Clifford G, Pawlita M. Dried blood spot samples for seroepidemiology of infections with human papillomaviruses, *Helicobacter pylori*, Hepatitis C Virus, and JC Virus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;**21**:287–93

13. Liu J, Kibiki G, Maro V, Maro A, Kumburu H, Swai N, Taniuchi M, Gratz J, Toney D, Kang G, Houpt E. Multiplex reverse transcription PCR Luminex assay for detection and quantitation of viral agents of gastroenteritis. *J Clin Virol* 2011;**50**:308–13

14. Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout Lv, Petri WA Jr, Haque R, Houpt ER. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am J Trop Med Hyg* 2011;**84**:332–7

15. Binnicker MJ, Jespersen DJ, Harring JA. Multiplex detection of IgM and IgG class antibodies to *Toxoplasma gondii*, rubella virus, and cytomegalovirus using a novel multiplex flow immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2010;**17**:1734–8

16. Buzatu DA, Moskal TJ, Williams AJ, Cooper WM, Mattes WB, Wilkes JG. An integrated flow cytometry-based system for real-time, high sensitivity bacterial detection and identification. *PLoS ONE* 2014;**9**:e94254

17. Hildebrandt P, Surmann K, Salazar MG, Normann N, Völker U, Schmidt F. Alternative fluorescent labeling strategies for characterizing gram-positive pathogenic bacteria: flow cytometry supported counting, sorting, and proteome analysis of *Staphylococcus aureus* retrieved from infected host cells. *Cytometry A* 2016;**89**:932–40

18. Ou F, McGoverin C, Swift S, Vanholsbeeck F. Absolute bacterial cell enumeration using flow cytometry. *J Appl Microbiol* 2017;**123**:464–77

19. Zeng Y, Zhang D, Qi P. Combination of a flow cytometric bead system with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for bacteria detection. *Anal Bioanal Chem* 2019;**411**:2161–8

20. Miller F, Lécuyer H, Join-Lambert O, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X, Coureuil M. Neisseria meningitidis colonization of the brain endothelium and cerebrospinal fluid invasion. *Cell Microbiol* 2013;**15**:512–9

21. Verkaik NJ, Boelens HA, de Vogel CP, Tavakol M, Bode LG, Verbrugh HA, van Belkum A, van Wamel WJ. Heterogeneity of the humoral immune response following *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;**29**:509–18

22. Den Reijer PM, Lemmens-den Toom N, Kant S, Snijders SV, Boelens H, Tavakol M, Verkaik NJ, van Belkum A, Verbrugh HA, van Wamel WJ. Characterization of the humoral immune response during *Staphylococcus aureus* bacteremia and global gene expression by *Staphylococcus aureus* in human blood. *PLoS ONE* 2013;**8**:e53391

23. Simonova MA, Petrova EE, Dmitrenko OA, Komaleva RL, Shoshina NS, Samokhvalova LV, Valyakina TI, Grishin EV. xMAP-based analysis of three most prevalent staphylococcal toxins in *Staphylococcus aureus* cultures. *Anal Bioanal Chem* 2014;**406**:6447–52

24. Sharma P, Wang N, Chervin AS, Quinn CL, Stone JD, Kranz DM. A Multiplex assay for detection of staphylococcal and streptococcal exotoxins. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0135986

25. Borges IC, Andrade DC, Vilas-Boas AL, Fontoura MS, Laitinen H, Ekström N, Adrian PV, Meinke A, Cardoso MR, Barral A, Ruuskanen O, Käyhty H, Nascimento Carvalho CM. Detection of antibody responses against *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* proteins in children with community-acquired pneumonia: effects of combining pneumococcal antigens, pre existing antibody levels, sampling interval, age, and duration of illness. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;**34**:1551–7

26. Andrade DC, Borges IC, Laitinen H, Ekström N, Adrian PV, Meinke A, Barral A, Nascimento-Carvalho CM, Käyhty H. A fluorescent multiplexed bead-based immunoassay (FMIA) for quantitation of IgG against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* protein antigens. *J Immunol Methods* 2014;**405**:130–43

27. Borges IC, Andrade DC, Cardoso MR, Toppari J, Vähä-Mäkilä M, Ilonen J, Knip M, Hyöty H, Veijola R, Simell O, Jartti T, Käyhty H, Ruuskanen O, Nascimento-Carvalho CM. Natural development of antibodies against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* protein antigens during the first 13 years of life. *Clin Vaccine Immunol* 2016;**23**:878–83

28. Yu J, Lin J, Kim KH, Benjamin WH Jr, Nahm MH. Development of na automated and multiplexed serotyping assay for *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Vaccine Immunol* 2011;**18**:1900–7

29. Filomena A, Pessler F, Akmatov M, Krause G, Duffy D, Gärtner B, Gerhard M, Albert ML, Joos TO, Schneiderhan-Marra N. Development of a bead-based multiplex assay for the analysis of the serological response against the six pathogens HAV, HBV, HCV, CMV, *T. gondii*, and *H. pylori*. *High-Throughput* 2017;**6**:1–14

30. Lippé R. Flow virometry: a powerful tool to functionally characterize viruses. *J Virol* 2017;**92**:e01765–10117

31. Musich T, Jones JC, Keele BF, Jenkins LMM, Demberg T, Uldrick TS, Yarchoan R, Robert-Guroff M. Flow virometric sorting and analysis of HIV quasispecies from plasma. *JCI Insight* 2017;**2**:1–13

32. Niessl J, Baxter AE, Kaufmann DE. Tools for visualizing HIV in cure research. *Curr HIV/AIDS Rep* 2018;**15**:39–48

33. Gaudin R, Barteneva NS. Sorting of small infectious virus particles by flow virometry reveals distinct infectivity profiles. *Nat Commun* 2015; **6**:6022

34. Zamora JLR, Aguilar HC. Flow virometry as a tool to study viruses. *Methods* 2018;**134–5**:87–97

35. Arakelyan A, Fitzgerald W, Margolis L, Grivel JC. Nanoparticle-based flow virometry for the analysis of individual virions. *J Clin Invest* 2013; **123**:3716–27

36. Yufenyuy EL, Parekh BS. Development of a multiplex assay for concurrent diagnoses and detection of HIV-1, HIV-2, and recent HIV-1 infection in a single test. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2018;**34**:1017–27

37. Merbah M, Onkar S, Grivel JC, Vanpouille C, Biancotto A, Bonar L, Sanders-Buell E, Kijak G, Michael N, Robb M, Kim JH, Tovanabutra S, Chenine AL. Standardization of a cytometric p24-capture bead-assay for the detection of main HIV-1 subtypes. *J Virol Methods* 2016;**230**:45–52

38. Biancotto A, Brichacek B, Chen SS, Fitzgerald W, Lisco A, Vanpouille C, Margolis L, Grivel JC. A highly sensitive and dynamic immunofluorescent cytometric bead assay for the detection of HIV-1 p24. *J Virol Methods* 2009;**157**:98–101

39. Fonseca BP, Marques CF, Nascimento LD, Mello MB, Silva LB, Rubim NM, Foti L, Silva ED, Ferreira AG, Krieger MA. Development of a multiplex bead-based assay for detection of hepatitis C virus. *Clin Vaccine Immunol* 2011;**18**:802–6

40. Neves WLL, Mariuba LAM, Alves KCS, Coelho KF, Tarragô AM, Costa AG, Chaves YO, Victoria FS, Victoria MB, Malheiro A. Development of an immunoassay for the detection of human IgG against hepatites C virus proteins using magnetic beads and flow cytometry. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2021;**35**:103–10

41. Yang CM, Yoon JC, Park JH, Lee JM. Hepatitis C virus impairs natural killer cell activity via viral serine protease NS3. *PLoS ONE* 2017;**12**:1–16

42. Zhang F, Zou M, Li J, Xue Q. Cytometric microsphere array for subtyping avian influenza virus. *Viral Immunol* 2011;**24**:403–7

43. WHO Global. World malaria report 2021. Brazzaville, Congo: WHO Regional Office for Africa, 2021

44. Shapiro HM, Ulrich H. Cytometry in malaria: from research tool to practical diagnostic approach. *Cytometry A* 2010;**77**:500–1

45. Ondigo BN, Park GS, Ayieko C, Nyangahu DD, Wasswa R, John CC. Comparison of non-magnetic and magnetic beads multiplex assay for assessment of *Plasmodium falciparum* antibodies. *PeerJ* 2019;**7**:1–16

46. Ondigo BN, Park GS, Gose SO, Ho BM, Ochola LA, Ayodo GO, Ofulla AV, John CC. Standardization and validation of a cytometric bead assay to assess antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* recombinant antigens. *Malar J* 2012;**11**:427–44

47. Fernandez-Becerra C, Sanz S, Brucet M, Stanisic DI, Alves FP, Camargo EP, Alonso PL, Mueller I, del Portillo HA. Naturally-acquired humoral immune responses against the N- and C-termini of the *Plasmodium vivax* MSP1 protein in endemic regions of Brazil and Papua New Guinea using a multiplex assay. *Malar J* 2010;**9**:29–37

48. Rogier E, Plucinski M, Lucchi N, Mace K, Chang M, Lemoine JF, Candrinho B, Colborn J, Dimbu R, Fortes F, Udhayakumar V, Barnwell J. Bead-based immunoassay allows sub-picogram detection of histidinerich protein 2 from Plasmodium falciparum and estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. *PLoS ONE* 2017;**12**:e0172139

49. Plucinski MM, Dimbu PR, Fortes F, Abdulla S, Ahmed S, Gutman J, Kachur SP, Badiane A, Ndiaye D, Talundzic E, Lucchi N, Aidoo M, Udhayakumar V, Halsey E, Rogier E. Posttreatment HRP2 clearance in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 2018;**217**:685–92

50. Plucinski MM, Herman C, Jones S, Dimbu R, Fortes F, Ljolje D, Lucchi N, Murphy SC, Smith NT, Cruz KR, Seilie AM, Halsey ES, Udhayakumar V, Aidoo M, Rogier E. Screening for Pfhrp2/3-deleted *Plasmodium falciparum*, non-falciparum, and low-density malaria infections by a multiplex antigen assay. *J Infect Dis* 2019;**219**:437–47

51. Plucinski MM, Rogier E, Dimbu PR, Fortes F, Halsey ES, Aidoo M, Smith T. Performance of antigen concentration thresholds for attributing fever to malaria among outpatients in Angola. *J Clin Microbiol* 2019; **57**:e01901–18

52. Herman C, Huber CS, Jones S, Steinhardt L, Plucinski MM, Lemoine JF, Chang M, Barnwell JW, Udhayakumar V, Rogier E. Multiplex malária antigen detection by bead-based assay and molecular confirmation by PCR shows no evidence of Pfhrp2 and Pfhrp3 deletion in Haiti. *Malar J* 2019;**18**:380–90

53. Rogier E, van den Hoogen L, Herman C, Gurrala K, Joseph V, Stresman G, Presume J, Romilus I, Mondelus G, Elisme T, Ashton R, Chang M, Lemoine JF, Druetz T, Eisele TP, Existe A, Boncy J, Drakeley C, Udhayakumar V. High-throughput malaria serosurveillance using a one-step multiplex bead assay. *Malar J* 2019;**18**:402–12

54. Lloyd YM, Ngati EP, Salanti A, Leke RGF, Taylor DW. A versatile, high through-put, bead-based phagocytosis assay for *Plasmodium falciparum. Sci Rep* 2017;**7**:14705

55. Guigue N, Menotti J, Hamane S, Derouin F, Garin YJ. Performance of the BioPlex 2200 flow immunoassay in critical cases of serodiagnosis of toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol* 2014;**21**:496–500

56. Vostrý M. Multiplex immunoassays: chips and beads. *EJIFCC* 2010;**20**: 162–5

57. Hermann N, Dressen K, Schroeder L, Debald M, Schildberg FA, Walgenbach-Bruenagel G, Hettwer K, Uhlig S, Kuhn W, Hartmann G, Holdenrieder S. Diagnostic relevance of a novel multiplex immunoassay panel in breast cancer. *Tumour Biol* 2017;**39**:1–11

58. Opstal-van Winden AW, Rodenburg W, Pennings JL, van Oostrom CT, Beijnen JH, Peeters PH, van Gils CH, de Vries A. A bead-based multiplexed immunoassay to evaluate breast cancer biomarkers for early detection in pre-diagnostic serum. *Int J Mol Sci* 2012;**13**: 13587–604

59. Markou A, Strati A, Malamos N, Georgoulias V, Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer by a liquid bead array hybridization assay. *Clin Chem* 2011;**57**:421–30

60. Lux A, Kahlert C, Grützmann R, Pilarsky C. C-Met and PD-L1 on circulating exosomes as diagnostic and prognostic markers for pancreatic cancer. *Int J Mol Sci* 2019;**20**:3305–17

61. Li C, Zolotarevsky E, Thompson I, Anderson MA, Simeone DM, Casper JM, Mullenix MC, Lubman DM. A multiplexed bead assay for profiling glycosylation patterns on serum protein biomarkers of pancreatic cancer. Electrophoresis 2011;32:2028–35

62. World Health Organization (WHO). Lung cancer. In: The cancer atlas, 2020, https://canceratlas.cancer.org/the-burden/lung-cancer/

63. Lee HJ, Kim YT, Park PJ, Shin YS, Kang KN, Kim Y, Kim CW. A novel detection method of non-small cell lung cancer using multiplexed bead-based serum biomarker profiling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;**143**:421–7

64. Goebel C, Louden CL, McKenna R Jr, Onugha O, Wachtel A, Long T. Diagnosis of non-small cell lung cancer for early stage asymptomatic patients. *Cancer Genomics Proteomics* 2019;**16**:229–44

65. Goebel C, Louden CL, McKenna R, Onugha O, Wachtel A, Long T. Blood test shows high accuracy in detecting stage I non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2020;**20**:1–11

66. Von Bahr Greenwood T, Palmkvist-Kaijser K, Chiang SC, Tesi B, Bryceson YT, Hjelmqvist H, Henter JI. Elevated ferritin and soluble CD25 in critically ill patients are associated with parameters of (hyper) inflammation and lymphocyte cytotoxicity. *Minerva Anestesiol* 2019;**85**:1289–98

67. Maruoka H, Inoue D, Takiuchi Y, Nagano S, Arima H, Tabata S, Matsushita A, Ishikawa T, Oita T, Takahashi T. IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 as novel markers for the diagnosis of lymphoma-associated hemophagocytic syndrome. *Ann Hematol* 2014;**93**:393–401

68. Chen Y, Wang Z, Luo Z, Zhao N, Yang S, Tang Y. Comparison of Th1/ Th2 cytokine profiles between primary and secondary haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Ital J Pediatr* 2016;**42**:50–61

69. Maier R, Weger M, Haller-Schober EM, El-Shabrawi Y, Theisl A, Barth A, Aigner R, Haas A. Application of multiplex cytometric bead array technology for the measurement of angiogenic factors in the vitreous. *Mol Vis* 2006;**12**:1143–7

70. Dispenzieri A. POEMS Syndrome: 2019 Update on diagnosis, riskstratification, and management. *Am J Hematol* 2019;**94**:812–27

71. Watanabe O, Arimura K, Kitajima I, Osame M, Maruyama I. Greatly raised vascular endothelial growth factor (VEGF) in POEMS syndrome. *Lancet* 1996;**347**:702

72. Watanabe O, Maruyama I, Arimura K, Kitajima I, Arimura H, Hanatani M, Matsuo K, Arisato T, Osame M. Overproduction of vascular endothelial growth factor/vascular

permeability factor is causative in Crow-Fukase (POEMS) syndrome. *Muscle Nerve* 1998;**21**:1390–7

73. D'Souza A, Hayman SR, Buadi F, Mauermann M, Lacy MQ, Gertz MA, Kyle RA, Kumar S, Greipp PR, Lust JA, Russell SJ, Zeldenrust S, Dingli D, Witzig TE, Rajkumar SV, Dispenzieri A. The utility of plasma vascular endothelial growth factor levels in the diagnosis and follow-up of patients with POEMS syndrome. *Blood* 2011;**118**:4663–5

74. Dispenzieri A. POEMS syndrome. *Blood Rev* 2007;**21**:285–99

75. D'Souza A, Lacy M, Gertz M, Kumar S, Buadi F, Hayman S, Dingli D, Zeldenrust S, Kyle R, Ansell S, Inwards D, Johnston P, Micallef I, Porrata L, Litzow M, Gastineau D, Hogan W, Dispenzieri A. Longterm outcomes after autologous stem cell transplantation for patients with POEMS syndrome (osteosclerotic myeloma): a single-center experience. *Blood* 2012;**120**:56–62

76. Nguyen L, Costopoulos M, Tanguy ML, Houillier C, Choquet S, Bennani H, Elias-Shamieh R, Armand M, Faivre G, Glaisner S, Malak S, Vargaftig J, Hoang-Xuan K, Ahle G, Touitou V, Cassoux N, Davi F, Merle-Béral H, Le arff-Tavernier GM, Soussain C. IL10 and IL10: IL6 ratio in CSF is useful at diagnosis but also in the assessment of therapeutic response in patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Blood* 2014;**124**:1619

77. Nguyen-Them L, Costopoulos M, Tanguy ML, Houillier C, Choquet S, Benanni H, Elias-Shamieh R, Armand M, Faivre G, Glaisner S, Malak S, Vargaftig J, Hoang-Xuan K, Ahle G, Touitou V, Cassoux N, Davi F, Merle-Béral H, Le Garff-Tavernier M, Soussain C, French LOC Network for CNS Lymphoma. The CSF IL-10 concentration is an effective diagnostic marker in immunocompetent primary CNS lymphoma and a potential prognostic biomarker in treatment-responsive patients. *Eur J Cancer* 2016;**61**:69–76

78. Scala E, Alessandri C, Bernardi ML, Ferrara R, Palazzo P, Pomponi D, Quaratino D, Rasi C, Zaffiro A, Zennaro D, Mari A. Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23,077 subjects using na allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:911–21

79. Scala E, Pomponi D, Giani M. Allergen microbead arrays: the future of allergy diagnostics? *Expert Rev Clin Immunol* 2013;**9**:13

80. Hiller R, Laffer S, Harwanegg C, Huber M, Schmidt WM, Twardosz A, Barletta B, Becker WM, Blaser K, Breiteneder H, Chapman M, Crameri R, Duchêne M, Ferreira F, Fiebig H, Hoffmann-Sommergruber K, King TP, Kleber-Janke T, Kurup VP, Lehrer SB, Lidholm J, Müller U, Pini C, Reese G, Scheiner O, Scheynius A, Shen HD, Spitzauer S, Suck R, Swoboda I, Thomas W, Tinghino R, Van Hage-Hamsten M, Virtanen T, Kraft D, Müller MW, Valenta R. Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *FASEB J* 2002;**16**:414–6

81. Gomaa A, Boye J. Simultaneous detection of multi-allergens in na incurred food matrix using ELISA, multiplex flow cytometry and liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). *Food Chem* 2015;**175**: 585–92

82. Pomponi D, Bernardi ML, Liso M, Palazzo P, Tuppo L, Rafaiani C, Santoro M, Labrada A, Ciardiello MA, Mari A, Scala E. Allergen micro-bead array for IgE detection: a feasibility study using allergenic molecules tested on a flexible multiplex flow cytometric immunoassay. *PLoS ONE* 2012;**7**:e35697

83. Otto G, Lamote A, Deckers E, Dumont V, Delahaut P, Scippo ML, Pleck J, Hillairet C, Gillard N. A flow-cytometry-based method for detecting simultaneously five allergens in a complex food matrix. *J Food Sci Technol* 2016;**53**:4179–86

84. Meimaridou A, Haasnoot W, Noteboom L, Mintzas D, Pulkrabova J, Hajslová J, Nielen MW. Color encoded microbeads-based flow cytometric immunoassay for polycyclic aromatic hydrocarbons in food. *Anal Chim Acta* 2010;**672**:9–14

85. Zhou ZH, Stone CA Jr, Jakubovic B, Phillips EJ, Sussman G, Park J, Hoang U, Kirshner SL, Levin R, Kozlowski S. Anti-PEG IgE in anaphylaxis associated with polyethylene glycol. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2021;**9**:1731–3

86. Rathod S, Ramsey M, Relling MV, Finkelman FD, Fernandez CA. Hypersensitivity reactions to asparaginase in mice are mediated by anti-asparaginase IgE and IgG and the immunoglobulin receptors FcεRI and FcγRIII. *Haematologica* 2019;**104**:319–29

CAPÍTULO II

ARTIGO ORIGINAL – *Short Communication*

No segundo capítulo da dissertação apresentamos um artigo original, no formato de short communication, que será submetido à revista BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPAMENT; Fator de impacto: 1,632

Uso de microesferas de látex para detecção de lactato desidrogenase de *Plasmodium vivax* utilizando citometria de fluxo

Adélia Marques de Figueiredo[1], Juliane Correa Glória[1], Yury Oliveira Chaves [2,4], Luis André Morais Mariúba[1,2,3].

[1]Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, AM, 69067-005, Brazil.

[2]Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus, AM, 69057-070, Brazil.

[3]Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, 69067-00, Brazil.

[4]Programa de Pós-graduação em biologia parasitária, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Manaus, AM, 21040-360, Brasil

RESUMO

A malária é uma doença parasitária de grande relevância na saúde pública mundial. O desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico de alto rendimento, sensíveis e específicos continua sendo um desafio para auxiliar na erradicação da doença. Neste estudo, desenvolvemos um teste de citometria de fluxo utilizando microesferas de látex e anticorpos policlonais obtidos de coelhos e camundongos, visando a detecção do antígeno lactato desidrogenase de *P. vivax* (*Pv*LDH). Foram processadas 50 amostras de pacientes diagnosticados com malária causada por *P. vivax* e 40 amostras de indivíduos sadios. O ensaio apresentou sensibilidade de 64%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo de 97% e o valor preditivo negativo de 57% quando analisado pelo método de porcentagem da marcação de fluorescência. Sob o método de análise pela média de intensidade de fluorescência (MFI), a sensibilidade foi de 53%, especificidade de 89%, valor preditivo positivo de 95% e o valor preditivo negativo de 33%. Em ambos os métodos de análise observamos diferença estatística significativa entre os grupos analisados (valor-p < 0,0001). Foi observada uma alta correlação (0,60) entre os dois métodos e uma baixa correlação *entre a* concentração de *Pv*LDH e a densidade parasitária. O teste foi capaz de detectar a proteína *Pv*LDH com alta especificidade, no entanto, a sensibilidade ainda deve ser otimizada. Resultados mais promissores foram observados quando analisados pela porcentagem de marcação de fluorescência. O

aprimoramento do ensaio possibilitaria a sua aplicação como teste sorológico para a detecção de pacientes assintomáticos e para validação de testes de diagnóstico rápido.

INTRODUÇÃO

A malária continua sendo um sério problema da saúde pública mundial, apresentando elevados números de casos e alta taxa de mortalidade. Em 2020, foram registrados aproximadamente 241 milhões de casos de malária e cerca de 627 mil mortes relacionadas à doença em todo o mundo[1]. O diagnóstico precoce é uma das medidas de controle para diminuir o impacto da doença, o que leva à necessidade contínua de aprimoramento e desenvolvimento de imunoensaios para a sua correta detecção[2].

Em áreas onde a malária é endêmica, o diagnóstico de infecções parasitárias de pacientes assintomáticos ainda é um desafio para acelerar e medir o progresso da eliminação da doença, uma vez que estes indivíduos contribuem para a perpetuação da cadeia de transmissão[3]. Logo, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, com alta sensibilidade e especificidade, torna-se crucial na eliminação desta patologia.

Imunoensaios em citometria de fluxo baseada em esferas, simplex ou multiplex, apresentam propriedades valiosas em relação ao custo, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos, principalmente em ensaios para a detecção simultânea de diferentes antígenos[4,5]. Esta alternativa de diagnóstico tem sido empregada para a identificação e confirmação de antígenos maláricos, como demonstrou Rogier *et al*.[6-7] ao desenvolverem um teste em citometria de fluxo baseada em microesferas de poliestireno e magnéticas utilizando anticorpos monoclonais comerciais para detecção da proteína HRP2 de *Plasmodium falciparum* e LDH de *P. vivax* usando a plataforma Luminex®.

Neste estudo propomos o desenvolvimento de um método diagnóstico para a malária utilizando a citometria de fluxo baseada em esferas de látex para detecção da proteína *p*LDH, empregando anticorpos policlonais anti-*Pv*LDH obtidos de coelhos e camundongos produzidos contra proteínas recombinantes desse marcador de infecção malárica. Desta forma, desenvolvemos uma abordagem alternativa de diagnóstico para malária causada por *P. vivax*, com o potencial para ser aprimorada de maneira a possibilitar o diagnóstico sensível e específico utilizando anticorpos policlonais.

METODOLOGIA

Coleta de amostras

A coleta das amostras foi realizada no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/ SESAU), Porto Velho - RO, sob o comitê de ética de número CAAE: 28823719.4.1001.0005. Os pacientes com o diagnóstico por microscopia positivo para malária causada por *Plasmodium vivax* foram convidados a participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto aprovado. Foram incluídos ambos os sexos, com idades entre 18 e 70 anos, com ausência de sinais de malária grave; com exame da gota espessa positivo para *P. vivax*, com parasitemia ≥ 100 e <100.00 parasitos assexuados/µL. Não foram incluídas amostras de pacientes com infecção malárica mista; antecedente de malária nos últimos 06 meses; gravidez; com hipersensibilidade aos antimaláricos e uso de antimaláricos nos últimos 60 dias. O grupo controle incluiu amostras de indivíduos que não residiam em áreas de risco e não apresentavam sintomas de malária nos últimos 6 meses, as quais foram coletadas no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD - FIOCRUZ AMAZÔNIA). Os testes de citometria foram realizados em 50 amostras de malaria vivax positivas e 40 amostras de indivíduos sadios.

Obtenção de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais anti-*Pv*LDH de coelho e camundongo utilizados neste estudo foram obtidos pelo nosso grupo em um trabalho anterior realizado por Sousa *et al.*[8] Sendo assim, neste estudo, empregamos os PAbs anti-*Pv*LDH de coelho como anticorpos de captura para o reconhecimento de um fragmento *Pv*LDH 1-43 aa). Como anticorpos primários foram usados os PAbs *Pv*LDH 35-305aa obtidos em camundongo para o reconhecimento da LDH de *Plasmodium vivax* em sua quase totalidade.

Preparo das beads

A ativação das beads de látex (CML Latex Beads, 4% w/v, 4 µm – Invitrogen®) foi realizada quando colocadas na presença de 0,57µg/µL de EDAC [1-Ethyl-3-(3′-dimethylaminopropyl) carbodiimide] e de 2 mM/µL deSulfo-NHS [N-hydroxysulfosuccinimide] diluídas em PBS-1x e incubadas por 3 horas a 22 ºC sob agitação de 950 RPM. Logo em seguida foram adicionados os anticorpos policlonais anti- *Pv*LDH 1-43aa, seguindo a concentração de 1 µg de anticorpo para 1 µL de beads, e deixados sob agitação leve por 16 horas para possibilitar a ligação covalente às beads.

As beads acopladas foram bloqueadas com o tampão de bloqueio (PBS-1x com 5% de BSA) sob agitação leve por 2 horas, para evitar a ligação de proteínas não específicas. Após o período de bloqueio, a solução foi lavada duas vezes com tampão de lavagem de PBS-1x filtrado + BSA 0,5% e armazenada a 4 °C até o seu uso.

Testes de Citometria

As amostras de sangue foram preparadas diluindo 100 µL em 100 µL de PBS-1x pH 7,4 + Triton 0,1% e incubadas por 10 minutos. Logo em seguida foram incubadas overnight em 100 µL de beads acopladas sob agitação de 950 RPM, a 4 °C. A seguir, foi realizado um ciclo de lavagem, conforme anteriormente descrito. Logo após, realizou-se adição de 100µL do anticorpo primário anti-*Pv*LDH 35-305aa proveniente de camundongo, na mesma concentração do anticorpo de captura. Incubou-se por 1 hora, sob agitação leve, a 22 °C, seguido de 1 ciclo de lavagem. A etapa seguinte foi a incubação por 30 minutos com 100 µL de anticorpo secundário anti-*mouse* Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific) diluído 1/2000. Logo depois foi realizado 1 ciclo de lavagem, seguido pela ressuspensão em PBS-1x filtrado e realizada leitura em citômetro de fluxo FACSCanto II™ (BD Biosciences ™), para análises dos dados foram obtidos 50.000 eventos.

Os dados foram analisados utilizando o programa Flow-Jo versão 10 e levados em consideração os parâmetros de tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) além de analises de porcentagem de fluorescência e a Média de Intensidade de Fluorescência (MFI), para determinação de eventos positivos nas amostras que ficaram acima do “cut off” em relação as amostras controle negativo.

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com o software R versão 4.0.2 e R studio versão 1.1.4 e GraphicPad Prism Versão 9. O ponto de corte (cut off) foi calculado com a média dos controles negativos mais duas vezes do seu desvio padrão. O teste de Mann-Whitney foi realizado nos parâmetros de medida com $p < 0,0001$ em ambos.

RESULTADOS

A avaliação da imobilização dos anticorpos foi obtida através da análise de porcentagem de acoplamento em látex. Nossos resultados demonstraram uma média de 96% de microesferas

acopladas (Figura 1a). Diferentes populações de microesferas foram observadas apresentando entre elas tamanho e complexidade distintos, sendo todas estas selecionadas para as análises de *single-cells* e detecção de fluorescência (figura 1a, b e c).

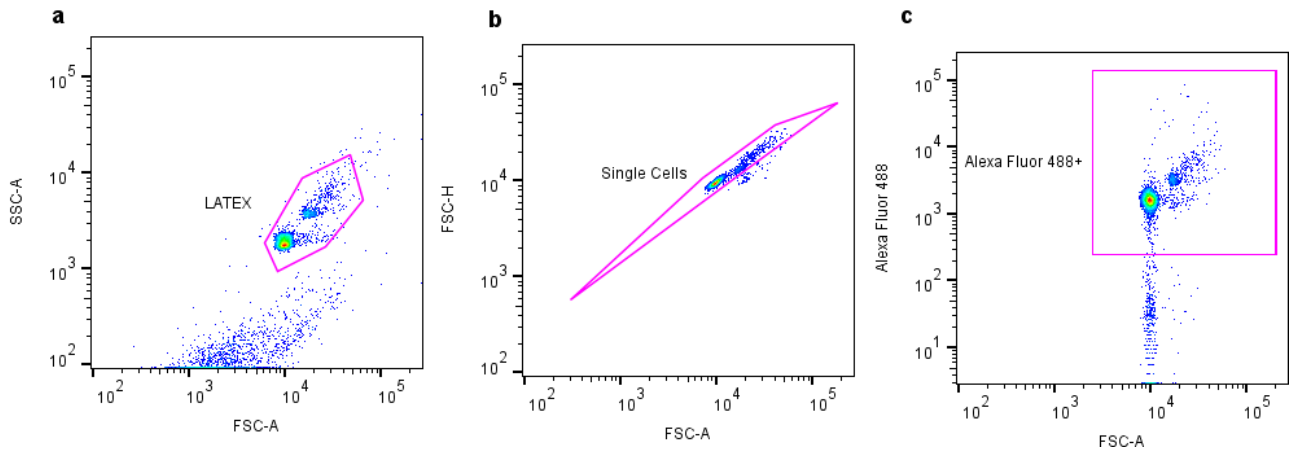


Figura 1. Determinação do acoplamento de anticorpos em látex por citometria de fluxo (a) Análise morfométrica de tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) de partículas de látex, (b) análise de célula única, (c) gráfico de pontos de partículas de látex com anticorpos acoplados.

Após a padronização de acoplamento de anticorpos em látex, foi realizada a determinação da sensibilidade de reconhecimento de anti-*Pv*LDH em amostras biológicas, onde foi possível distinguir a diferença entre as amostras com a presença de níveis plasmáticos da proteína *P*vLDH e as sem a presença de níveis plasmáticos de *Pv*LDH nos sistemas de detecção (figura 2a,b,c,d).

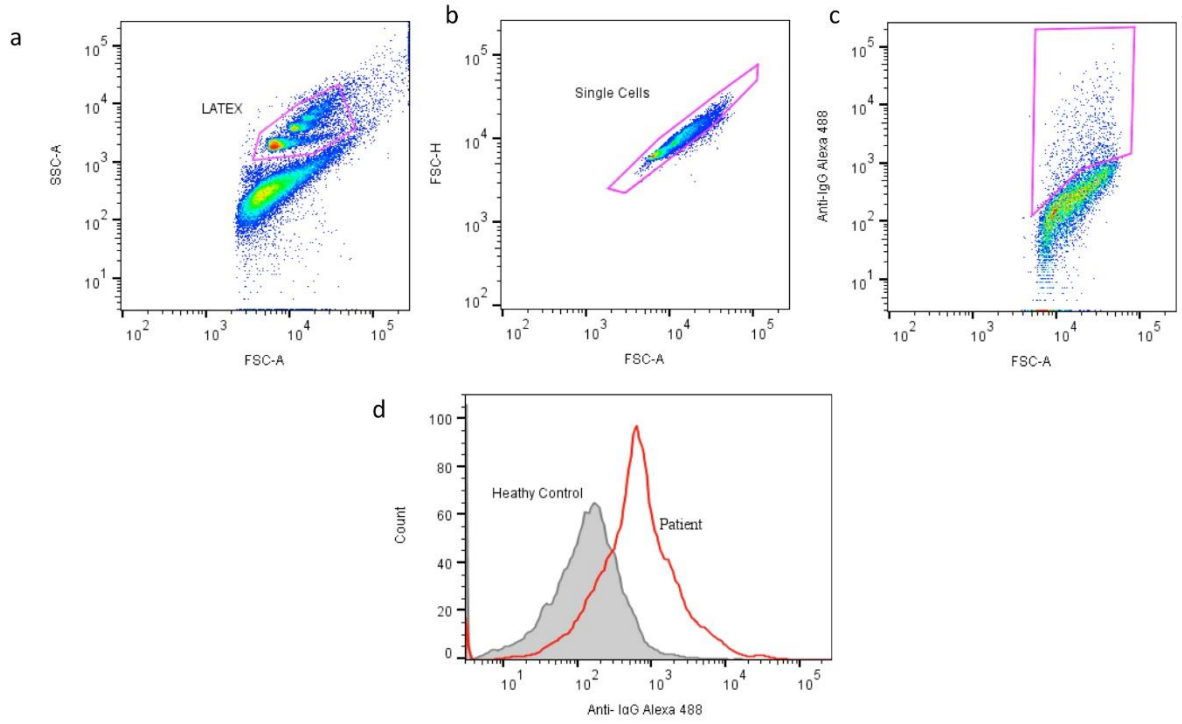


Figura 2. Determinação da sensibilidade de reconhecimento de anti-*Pv*LDH por citometria de fluxo (a) Análise morfométrica de tamanho (FSC-A) e complexidade (SSC-A) de partículas de látex, (b) análise de célula única, (c) gráfico de pontos de anti-*Pv*LDH IgG em partículas de látex, (d) determinação da média de intensidade de fluorescência entre o grupo controle e pacientes.

Para determinar qual melhor parâmetro determina melhor sensibilidade e especificidade, foi realizada a análise por porcentagem e média de intensidade de fluorescência, onde a análise das amostras testadas por porcentagem de marcação de fluorescência dos eventos detectados apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados (valor-p < 0,0001, **gráfico 1**), sensibilidade de 64%, especificidade de 97%, valor preditivo positivo 97% e o valor preditivo negativo 57%, sendo considerados positivos valores acima de 7%.

De maneira similar, a análise pela média de intensidade de fluorescência (MFI) apresentou diferença estatística significativa entre os grupos analisados (valor-p < 0,0001, **gráfico 2**), sensibilidade do ensaio foi de 53%, especificidade de 89%, valor preditivo positivo 95% e o valor preditivo negativo 33%, sendo considerados positivos valores de MFI acima de 659. Além disso, foi observada uma alta correlação (0,60) entre os dois métodos de análise (g**ráfico** 3), não havendo correlação destes com a densidade parasitária presente nas amostras testadas.

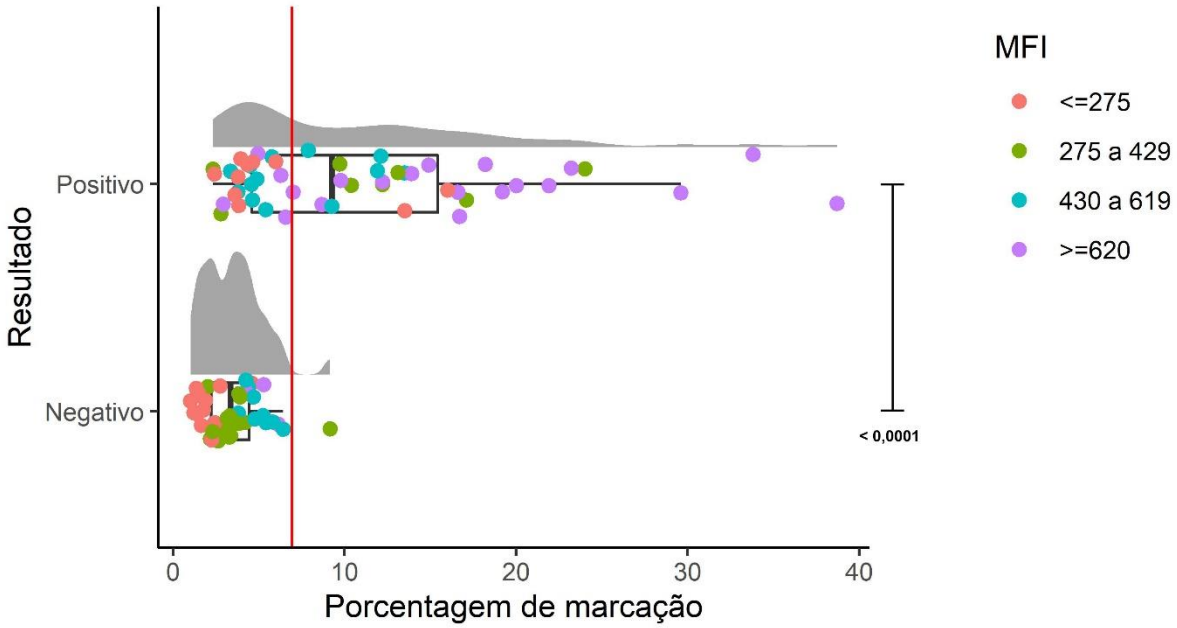


Gráfico 1. Gráfico de Raincloud para análise de porcentagem de fluorescência de eventos contabilizados de anti-*Pv*LDH. Os resultados observados no gráfico são referentes à porcentagem de eventos identificados da ligação do anticorpo anti-*Pv*LDH acoplado a microesferas de látex para o reconhecimento do antígeno LDH presente nas amostras de sangue. No eixo Y estão separados os dois grupos de amostras (positiva n=50; negativa n=40), no eixo X a porcentagem de marcação de fluorescência. A linha vermelha vertical em 7% de marcação de fluorescência representa a linha de corte. O MFI das amostras está separado em quartis, representados em *dots* na cor vermelha MFI de ≤ 275, a cor verde de 275 a 429, a cor azul de 430 a 619 e a cor lilás de ≥ 620. Quando comparados, os dois grupos apresentaram diferença estatística de valor-p <0,0001.

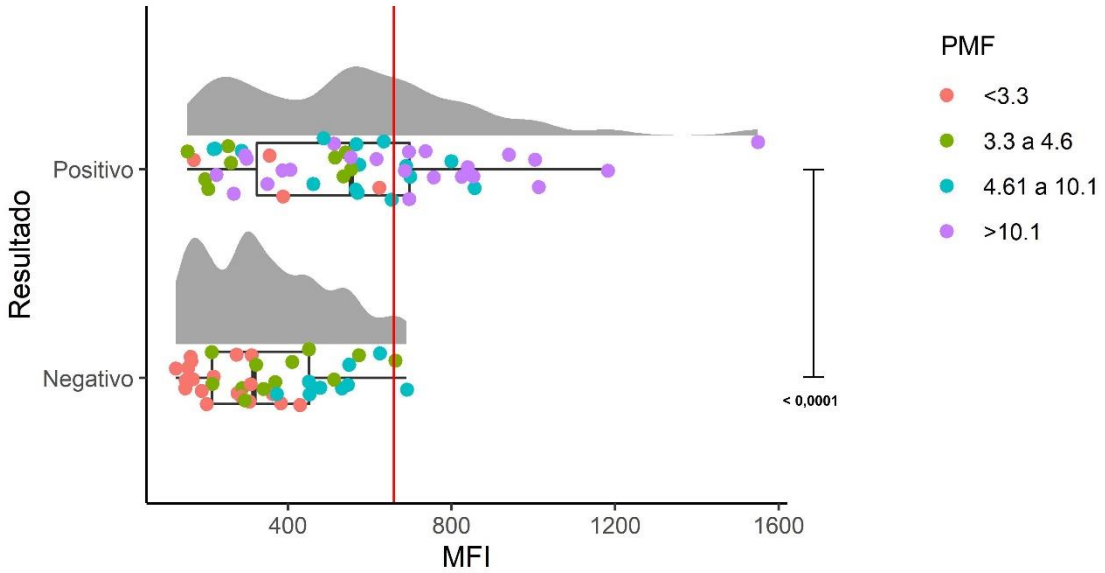


Gráfico 2. Gráfico de Raincloud para análise da Média de Intensidade de Fluorescência. Os resultados observados no gráfico são referentes à média de intensidade de fluorescência identificada da ligação do anticorpo anti-*Pv*LDH acoplado às microesferas de látex para o reconhecimento do antígeno LDH presente nas amostras de sangue. No eixo Y estão separados os dois grupos de amostras (positiva n=50; negativa n=40), no eixo X a Média de Intensidade de fluorescência. A linha vermelha vertical em 659 de MFI representa a linha de corte. A porcentagem de marcação de fluorescência (PMF) das amostras está separada em quartis, representados em *dots* na cor vermelha de ≤ 3.3%, a cor verde de 3,3 a 4,6%, a cor azul de 4,61 a 10,1% e a cor lilás de ≥ 10,1%. Quando comparados, os dois grupos apresentaram diferença estatística de valor-p <0,0001.

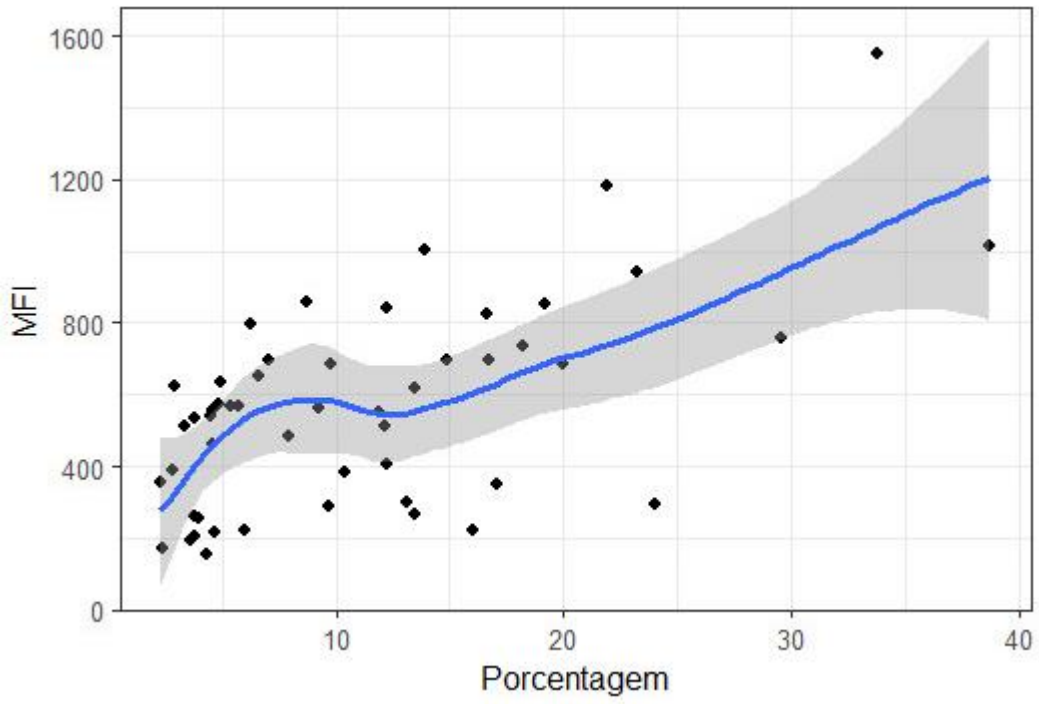


Gráfico 3. Representação gráfica dos valores esperados para a relação entre a MFI e a porcentagem de marcação da fluorescência. No eixo Y estão representados os dados em MFI e no eixo X a porcentagem de marcação de fluorescência. Os pontos na cor preta estão representando as amostras. A banda em cinza representa o erro padrão e a linha azul o valor esperado.

DISCUSSÃO

Os imunoensaios em citometria de fluxo baseada em esferas são utilizados com sucesso nas mais variadas aplicações, como a detecção precoce do SARS-CoV-2,[9] detecção precoce de biomarcadores simultâneos para vários tipos de cânceres[10-11] e identificação de vesículas extracelulares.[12] Para os diagnósticos de antígenos maláricos mostrou-se como uma ferramenta

promissora por apresentar alta sensibilidade e especificidade, sendo aplicado com sucesso para a validação de testes rápidos, comumente empregados em áreas remotas de difícil acesso e para estudos epidemiológicos pelo mundo.[13]

No presente estudo, a utilização dos anticorpos policlonais de captura e detecção mostrou-se apropriada para testes sorológicos, assim como demonstrado por Souza et al.[8] ao utilizar os mesmos anticorpos policlonais em um teste de ELISA para a detecção de malária vivax. Neste ensaio, foi alcançado o valor preditivo positivo (VPP) de 99% e o valor preditivo negativo (VPN) de 45%. No presente estudo, foram obtidos *valores superiores para o VPN (64%) e um resultado aproximado para VPP (97%)*.

Jang et al.[14] desenvolveu um teste multiplex para a detecção de 4 antígenos maláricos (específicos e pan-específico) simultaneamente: HRP2, *Pf* LDH, *Pv*LDH, e o pLDH. O ensaio apresentou especificidade de 99% e sensibilidade reduzida em todos os antígenos avaliados, alcançando o valor mais baixo para *Pv*LDH de 46,1%. Nosso teste apresentou da mesma forma uma alta especificidade (97%) e uma sensibilidade ainda maior que a relatada por Jang et al.[14] (64%) quando analisada pela porcentagem de fluorescência. A baixa sensibilidade para este antígeno também é relatada em testes diagnóstico rápido voltados para a identificação de *P. vivax*[15], tornando-se um desafio para novas abordagens diagnósticas o aumento da sensibilidade deste biomarcador. Rogier *et al*.[7] relatou uma alta especificidade (100%) e sensibilidade (91,7%) alcançadas na detecção de *Pv*LDH de um teste multiplex de citometria de fluxo, entretanto foi observada uma reatividade cruzada em algumas amostras de pacientes com malária causada por *P. falciparum.* Martiáñez-Vendrell *et al*.[16] descreveu outro ensaio de CBA direcionado para detectar o antígeno *pLDH*, um biomarcador pan-específico, apresentando alta especificidade e sensibilidade. No entanto, os ensaios alcançaram resultados inferiores de sensibilidade ao serem aplicados em amostras de *P. vivax*, reportando maior sensibilidade para a detecção em pacientes com *P. falciparum* e demonstrando mais uma vez a grande dificuldade na detecção específica da *Pv*LDH.

A baixa correlação entre a concentração de *Pv*LDH e a densidade parasitária observada neste estudo já foi relatada por Warkwalter et al.[17] ao avaliar um ensaio para detecção de pLDH utilizando ELISA associada a microesferas. Acredita-se que fatores biológicos, como o estágio do ciclo de vida do parasita, possam afetar potencialmente a expressão do antígeno, ocasionando a baixa força da correlação observada.[18] A correlação positiva observada entre os valores obtidos pela MFI e a porcentagem de marcação de fluorescência era esperada, e provavelmente se deve ao fato destas possuírem a mesma origem de detecção. No entanto, ao

analisarmos as amostras individualmente, se observa uma dispersão na distribuição destas, visto que há a presença de amostras com alta porcentagem de marcação de fluorescência e baixo MIF, vice-versa. Trabalhos posteriores buscarão aprimorar o método visando o aumento das correlações descritas.

Apesar da alta especificidade observada no teste aqui descrito, estudos futuros buscarão elevar a sensibilidade do ensaio. Acreditamos que a alta presença de impurezas nas amostras mesmo após longos processos de lavagem interferiu na obtenção de melhores resultados. A avaliação futura do uso de outros tipos de microesferas como poliestireno, poliacrilamida, vidro, magnetizadas ou não, pode ser um caminho para esta melhora de performance do ensaio. Tais modificações podem levar ao aumento da pureza da amostra a ser analisada; obtenção de populações únicas de microesferas para análise; e influenciar positivamente na correlação das análises de fluorescência com a densidade parasitária presente nos pacientes.

Logo, o protótipo de ensaio de citometria de fluxo utilizando microesferas de látex desenvolvido neste estudo mostrou-se promissor para a detecção de malária causada por *P. vivax*. Ensaios futuros poderão ser realizados buscando melhora de sensibilidade do ensaio ou mesmo aplicar o método aqui descrito para a detecção de outras doenças. Futuramente, estes ensaios poderão compor um teste multiplex visando o diagnóstico simultâneo de diversas doenças.

Referências

1. WHO Global. World malaria report 2021. WHO Regional Office for Africa. 2021

2. Petersen E, Grobusch MP. Accurate Malaria Diagnosis: Not Only Essential for Malaria Case Management, But Prerequisite for Managing Febrile Disease in the Tropics. *Clin Infect Dis* 2021;**73**:e1168-e1169

3. Prusty D, Gupta N, Upadhyay A, Dar A, Naik B, Kumar N, Prajapati VK. Asymptomatic malaria infection prevailing risks for human health and malaria elimination. *Infect Genet Evol* 2021;**93**:104987

4. Egia-Mendikute L, Bosch A, Prieto-Fernández E, Lee SY, Jiménez-Lasheras B, García Del Río A, Antoñana-Vildosola A, Bruzzone C, Bizkarguenaga M, Embade N, Gil-Redondo R, Martínez-Chantar ML, López-Hoyos M, Abrescia NGA, Mato JM, Millet Ó, Palazón A. Sensitive detection of *SARS-CoV-2* seroconversion by flow cytometry reveals the presence of nucleoprotein-reactive antibodies in unexposed individuals. *Commun Biol* 2021;**4:**486

5. Neves WLL, Mariuba LAM, Alves KCS, Coelho KF, Tarragô AM, Costa AG, Chaves YO, Victoria FS, Victoria MB, Malheiro, A. Development of an immunoassay for the detection of human IgG against *hepatitis C virus* proteins using magnetic beads and flow cytometry. *Biotechnol & Biotechnol Eq* 2021;**35**:103-110

6. Rogier E, Plucinski M, Lucchi N, Mace K, Chang M, Lemoine JF, Candrinho B, Colborn J, Dimbu R, Fortes F, Udhayakumar V, Barnwell J. Bead-based immunoassay allows sub-picogram detection of histidine-rich protein 2 from *Plasmodium falciparum* and estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One* 2017;**12**:e0172139

7. Rogier E, Nace D, Ljolje D, Lucchi NW, Udhayakumar V, Aidoo M. Capture and Detection of *Plasmodium vivax* Lactate Dehydrogenase in a Bead-Based Multiplex Immunoassay. *Am J Trop Med Hyg* 2020;**102:**1064-1067

8. Sousa LP, Mariuba LA, Holanda RJ, Pimentel JP, Almeida ME, Chaves YO, Borges D, Lima E, Crainey JL, Orlandi PP, Lacerda MV, Nogueira PA. A novel polyclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of *Plasmodium vivax* developed from two lactate dehydrogenase protein segments. *BMC Infect Dis* 2014;**14**:49

9. Huergo LF, Selim KA, Conzentino MS, Gerhardt ECM, Santos ARS, Wagner B, Alford JT, Deobald N, Pedrosa FO, de Souza EM, Nogueira MB, Raboni SM, Souto D, Rego FGM, Zanette DL, Aoki MN, Nardin JM, Fornazari B, Morales HMP, Borges VA, Nelde A, Walz JS, Becker M, Schneiderhan-Marra N, Rothbauer U, Reis RA, Forchhammer K. Magnetic Bead-Based Immunoassay Allows Rapid, Inexpensive, and Quantitative Detection of Human *SARS-CoV-2* Antibodies. *ACS Sens* 2021;**6**:703-08

10. Opstal-van Winden AW, Rodenburg W, Pennings JL, van Oostrom CT, Beijnen JH, Peeters PH, van Gils CH, de Vries A. A bead-based multiplexed immunoassay to evaluate breast cancer biomarkers for early detection in pre-diagnostic serum. *Int J Mol Sci* 2012;**13:**13587-604

11. Lee HJ, Kim YT, Park PJ, Shin YS, Kang KN, Kim Y, Kim CW. A novel detection method of non-small cell lung cancer using multiplexed bead-based serum biomarker profiling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;**143**:421-7

12. Wiklander OPB, Bostancioglu RB, Welsh JA, Zickler AM, Murke F, Corso G, Felldin U, Hagey DW, Evertsson B, Liang XM, Gustafsson MO, Mohammad DK, Wiek C, Hanenberg H, Bremer M, Gupta D, Björnstedt M, Giebel B, Nordin JZ, Jones JC, El Andaloussi S, Görgens A. Systematic Methodological Evaluation of a Multiplex Bead-Based Flow Cytometry Assay for Detection of Extracellular Vesicle Surface Signatures. *Front Immunol* 2018;**9**:1326

13. Alvarado R, van den Hoogen LL, Iriemenam NC, Akinmulero OO, Thomas AN, Tamunonengiyeofori I, Erasogie E, Chimaoge AC, Dawurung AB, Esiekpe MK, Okoli MU, Mba N, Ogunniyi A, Abimiku A, Maire M, Bassey OO, Okoye M, Swaminathan M, Greby SM, Ndodo N, Ihekweazu C, Abubakar A, Steinhardt L, Rogier E. Considerations for quality assurance of multiplex malaria antigen detection assays with large sample sets. *Sci Rep* 2021;**11**:13248

14. Jang IK, Tyler A, Lyman C, Rek JC, Arinaitwe E, Adrama H, Murphy M, Imwong M, Proux S, Haohankhunnatham W, Barney R, Rashid A, Kalnoky M, Kahn M, Golden A, Nosten F, Greenhouse B, Gamboa D, Domingo GJ. Multiplex Human Malaria Array: Quantifying Antigens for Malaria Rapid Diagnostics. *Am J Trop Med Hyg* 2020;**102**:1366-69

15. Jimenez A, Rees-Channer RR, Perera R, Gamboa D, Chiodini PL, González IJ, Mayor A, Ding XC. Analytical sensitivity of current best-in-class malaria rapid diagnostic tests. *Malar J* 2017;**16**:128

16. Martiáñez-Vendrell X, Jiménez A, Vásquez A, Campillo A, Incardona S, González R, Gamboa D, Torres K, Oyibo W, Faye B, Macete E, Menéndez C, Ding XC, Mayor A. Quantification of malaria antigens PfHRP2 and pLDH by quantitative suspension array technology in whole blood, dried blood spot and plasma. *Malar J* 2020;**19**:12

17. Markwalter CF, Gibson LE, Mudenda L, Kimmel DW, Mbambara S, Thuma PE, Wright DW. Characterization of *Plasmodium* Lactate Dehydrogenase and Histidine-Rich Protein 2

Clearance Patterns via Rapid On-Bead Detection from a Single Dried Blood Spot. *Am J Trop Med Hyg* 2018;**98**:1389-1396

18. Vivas L, Easton A, Kendrick H, Cameron A, Lavandera JL, Barros D, de las Heras FG, Brady RL, Croft SL. Plasmodium falciparum: stage specific effects of a selective inhibitor of lactate dehydrogenase. *Exp Parasitol* 2005;**111**:105-14

4. DISCUSSÃO GERAL

Nas últimas décadas, progressos importantes no controle da malária foram obtidos, destacando-se o importante papel da OMS no avanço mundial das metas estabelecidas para o combate à doença (WHO, 2021). No entanto, a redução do número de casos e mortes relacionadas à doença continua sendo um grande desafio, que em decorrência da pandemia de COVID-19, apresentou um aumento consideravelmente.

Em áreas onde a malária é endêmica, o diagnóstico de infecções parasitárias de pacientes assintomáticos ainda é um desafio para acelerar e medir o progresso da eliminação da doença, uma vez que estes indivíduos contribuem para a perpetuação da cadeia de transmissão. Logo, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, com alta sensibilidade e especificidade, torna-se crucial na eliminação desta patologia.

No primeiro capítulo desta dissertação apresentamos um artigo de revisão, no qual evidenciamos as principais aplicações dos testes de citometria de fluxo baseada em microesferas para a detecção de doenças infecciosas bacterianas, virais e parasitárias, e para o diagnóstico de diferentes tipos de câncer.

O desenvolvimento deste artigo de revisão foi importante para o levantamento do estado da arte desta técnica, possibilitando a análise de performance de um amplo panorama de métodos, avaliação de novidade e seu potencial uso para malária. Foi observado que a citometria de fluxo permite a aplicação de microesferas em diversos métodos de diagnóstico sensíveis e específicos, seja em ensaios de detecção de antígenos ou anticorpos, bem como em testes mais elaborados, multiplexados e até mesmo utilizando a biologia molecular com sondas.

No segundo capítulo desta dissertação, foi elaborado um artigo original no formato de *short communication*, onde apresentamos e discutimos os principais dados obtidos a partir dos ensaios laboratoriais realizados para a detecção de *Pv*LDH. Para a obtenção destes resultados, inicialmente nossos testes foram padronizados visando a aplicação de anticorpos obtidos a partir da tecnologia IgY. Para a padronização do método realizamos a curva de concentração de anticorpos de captura, a verificação do sistema sanduiche e a padronização do tampão de lavagem. Não alcançamos reprodutibilidade aplicando os anticorpos IgY, no entanto, obtivemos as condições de padronização do imunoensaio. Em testes posteriores, optamos pela utilização de anticorpos policlonais obtidos de coelhos e camundongos, validados em um trabalho anterior do nosso grupo (SOUSA et al., 2014) e utilizamos as melhores condições já verificadas nos testes iniciais.

Nos testes realizados utilizamos o tampão de lavagem com PBS1x, que possui pH 7,4 e com BSA 0,5%, que apresentou uma intensidade média de fluorescência maior quando comparado aos demais tampões. Os tampões PBS1x pH 7,4 e PBS1x pH 7,4 com BSA 0,5%, Tween 0,1% e inibidores de proteases (EDTA e PMSF) apresentaram MFI aproximadas. De uma forma geral, foi possível notar que os tampões com pH 7,4 apresentaram maior fluorescência frente aos tampões com pH 8,0, evidenciando a influência do pH na ligação do antígeno ao anticorpo.

Apesar do tampão escolhido ter apresentado o melhor resultado, a presença de grandes quantidades de impurezas foi observada em quase todas as amostras. Novos testes devem ser realizados para a verificação da interferência destes debris nos resultados, principalmente em amostras de pacientes com baixa densidade parasitária. Antal-Szalmás et al., 2013, destaca a importância de otimizar as condições envolvidas em ensaios CBA, como o tampão de lavagem, pH e força iônica, garantindo um meio adequado para a ligação entre antígeno-anticorpo. A maioria dos ensaios sorológicos utilizam tampões de PBS1x com pH entre 7,2 a 7,4 e acrescentam BSA, Tween, inibidores de proteases e outros componentes em concentrações específicas, afim de atingir as condições ideias do meio.

A sensibilidade apresentada em nosso ensaio foi de 64% ao ser analisado pela porcentagem de marcação de fluorescência e de 53% ao ser analisada pela MFI. Outros estudos também obtiveram sensibilidade reduzida para a detecção de *Pv*LDH, apresentando os valores de 48,9% (JANG et al., 2019) e 46,1% (JANG et al., 2020) em imunoensaios de quimioluminescência. A sensibilidade para este biomarcador em CBA é considerada mais baixa quando comparada a outros antígenos maláricos, como HRP2 e pan-LDH (ROGIER et al., 2020). A baixa sensibilidade para este antígeno também é observada em TDRs para *P. vivax*, sendo provavelmente o resultado composto de reagentes de ensaio pobres, baixas densidades de parasitas durante a infecção e disponibilidade relativamente baixa de antígeno por parasita (JANG et al., 2019).

Análises simultâneas de antígenos maláricos já foram realizadas em testes multiplex de citometria de fluxo baseada em esferas em trabalhos anteriores (ROGIER et al., 2020). Devido ao alto rendimento, estes imunoensaios estão sendo utilizados como uma ferramenta adicional para a validação do desempenho em campo de TDRs de nova geração para detecção de antígenos de plasmódio, além de auxiliar na vigilância da doença e ainda fornecer uma melhor compreensão sobre a cinética dos antígenos.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de kits de testes diagnóstico rápidos para a malária com produção nacional, o que possibilitaria a diminuição do custo de distribuição destes em larga escala. Além da produção de anticorpos recombinantes visando sua aplicação como anticorpos de captura e de detecção em diversos métodos diagnósticos, buscamos também desenvolver meios para validação de tais anticorpos e sua aplicabilidade em TDRs, citometria de fluxo, ELISA.

Com os resultados positivos que obtivemos nos testes iniciais da citometria baseada em esferas para detecção de antígenos maláricos, acreditamos que o método proposto poder ser aperfeiçoado para futuramente ser aplicado na detecção "*high throughput*" de amostras como bancos de sangue, grandes levantamentos epidemiológicos visando detecção de pacientes assintomáticos, em clínicas em áreas não endêmicas, ou até mesmo como uma abordagem adicional para a avaliação de desempenho de RTDs sem o uso de testes moleculares.

Uma possibilidade para o aprimoramento do ensaio é a alteração do tipo de microesfera utilizada. Em nossos testes aplicamos *beads* de látex e, ao analisar os resultados, identificamos a formação de três populações com diferentes tamanhos e uma grande quantidade de partículas de restos celulares. O uso de *beads* magnéticas pode ser uma alternativa para diminuir a quantidade de debris em ensaios futuros e análise de uma única população de microesferas, uma vez que estudos mostram que estas possibilitam a otimização de CBAs (MANASKOVA *et al.*,2016).

Os resultados iniciais demonstram que o teste desenvolvido apresenta especificidade e sensibilidade inicialmente satisfatória para a detecção de *Pv*LDH, com o potencial para ser mais uma alternativa para auxiliar no diagnóstico de malária causada por *P. vivax*. A otimização do teste poderá viabilizá-lo como uma ferramenta para identificar infecções de baixa densidade parasitária, que são prevalentes em ambientes que demandam o controle e eliminação e têm grande potencial de transmissão.

Em uma perspectiva de desenvolvimento futuro, o teste elaborado neste estudo pode ser otimizado e adaptado visando a composição de um sistema comercial para diagnóstico de doenças febris, como ensaios multiplex para detecção simultânea de biomarcadores de diferentes patologias endêmicas da região amazônica, como a dengue, zika e malária. Poderíamos oferecer ferramentas já validadas, como anticorpos monoclonais ou policlonais, e contribuir para estudos, pesquisas e iniciativas comerciais.

5. CONCLUSÃO

Um artigo de revisão foi produzido destacando as técnicas de citometria de fluxo com a utilização de microesferas para diagnóstico de doenças infecciosas e não-infecciosas.

A padronização dos ensaios de citometria de fluxo foi obtida com sucesso utilizando microesferas de látex e anticorpos policlonais de coelhos e camundongos, sendo empregados nos testes de amostras de sanguíneas positivas e negativas para malária causada pelo *P. vivax.*

Utilizando o método de análise da porcentagem de marcação de fluorescência, nosso teste apresentou resultados mais promissores em relação ao método de análise da média de intensidade de fluorescência.

O teste aqui proposto apresentou alta especificidade para detecção da lactato desidrogenase de *Plasmodium vivax*, havendo ainda a necessidade de otimização de sua sensibilidade em trabalhos futuros.

6. REFERÊNCIAS

AGABA, Bosco B. et al. Systematic review of the status of pfhrp2 and pfhrp3 gene deletion, approaches and methods used for its estimation and reporting in *Plasmodium falciparum* populations in Africa: review of published studies 2010–2019. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

AHMADPOUR, Ehsan et al. Transfusion-transmitted malaria: a systematic review and meta-analysis. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2019. p. ofz283.

ALI, Mohamed Siddig M. et al. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. **American Society for Clinical Laboratory Science**, v. 18, n. 2, p. 69-73, 2005.

ALMEIDA-DE-OLIVEIRA, Natália Ketrin et al. Analytical validation of real-time quantitative PCR assays for optimum diagnosis of *vivax* malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019.

ANTAL-SZALMÁS, Péter et al. Measurement of soluble biomarkers by flow cytometry. **EJIFCC**, v. 23, n. 4, p. 135, 2013.

ANTONELLI, Lis R. et al. The immunology of *Plasmodium vivax* malaria. **Immunological reviews**, v. 293, n. 1, p. 163-189, 2020.

ASCOLI, Carl A.; AGGELER, Birte. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. **BioTechniques**, v. 65, n. 3, p. 127-136, 2018.

ASHLEY, Elizabeth A.; PHYO, Aung Pyae; WOODROW, Charles J. Malaria. Lancet, v. 391, n. 10130, p. 1608-1621, 2018.

ASHLEY, Elizabeth A.; POESPOPRODJO, Jeanne Rini. Treatment and prevention of malaria in children. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 4, n. 10, p. 775-789, 2020.

BAIA-DA-SILVA, Djane Clarys et al. Current vector control challenges in the fight against malaria in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

BAKER, David A. Malaria gametocytogenesis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 172, n. 2, p. 57-65, 2010.

BANICA, Florinel-Gabriel. **Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, 2012.

BATWALA, Vincent; MAGNUSSEN, Pascal; NUWAHA, Fred. Comparative feasibility of implementing rapid diagnostic test and microscopy for parasitological diagnosis of malaria in Uganda. **Malaria journal**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2011.

BERWAL, Ritu et al. Amplification of LDH gene from Indian strains of *Plasmodium vivax*. **Journal of vector borne diseases**, v. 43, n. 3, p. 109, 2006.

BHARTI, Praveen Kumar et al. Prevalence of pfhrp2 and/or pfhrp3 gene deletion in *Plasmodium falciparum* population in eight highly endemic states in India. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0157949, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. **Guia de tratamento da malária no Brasil.** Brasília, 2020.

BRASIL. Mistério da saúde. Malária - Situação epidemiológica- Dados. 2021. Disponível em: <https://public.tableau.com/profile/mal.ria.brasil#!/vizhome/Dadosparacidado _201925_03_2021/Ttulo> .Acesso em: 25 de jul. de 2021.

BRUCE, M. C. et al. Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. **Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 191-200, 1990.

CALDERARO, Adriana et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium* ovale wallikeri and *Plasmodium* knowlesi. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2013.

CAPUTO, Annamaria; GARAVELLI, Pietro Luigi. Climate, environment and transmission of malaria. **Infez. Med**, v. 2, p. 93-104, 2016.

CHEAVEAU, James et al. Asymptomatic malaria in the clinical and public health context. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 17, n. 12, p. 997-1010, 2019.

COOK, Jackie et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. **Malaria journal**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2015.

CORTÉS, Liliana Jazmín; MUÑOZ, Lyda; AYALA, Martha Stella. Comparison of methodologies for microscopic malaria diagnosis. **Biomédica**, v. 38, n. 2, p. 244-252, 2018.

COWMAN, Alan F.; BERRY, Drew; BAUM, Jake. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. **Journal of cell Biology**, v. 198, n. 6, p. 961-971, 2012.

COWMAN, Alan F. et al. Malaria: biology and disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610-624, 2016.

CUNHA, Maristela G. et al. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) method based on amplification of mitochondrial DNA to detect *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 35-38, 2009.

DE SOUZA, J. B; RILEY, E. M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 3, p. 291–300, mar. 2002.

DIALLO, Mamadou Alpha et al. Quality control of malaria microscopy reveals misdiagnosed non-*falciparum* species and other microscopically detectable pathogens in Senegal. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2018.

DÖBELI, Heinz et al. Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 41, n. 2, p. 259-268, 1990.

DOS SANTOS, M. C. et al. Purification of F(ab′)2 anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield. **Toxicon**, v. 27, n. 3, p. 297-303, 1989.

DRAME, Papa Makhtar et al. Human antibody responses to the Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15596, 2010.

DUNDAS, Kirsten et al. Important extracellular interactions between *Plasmodium* sporozoites and host cells required for infection. **Trends in parasitology**, v. 35, n. 2, p. 129-139, 2019.

DUNKEL, Florence V.; ALEXANDER, Anton. Three stepping stones leading to malaria elimination, changing world maps on the way. **MWJ,** V.11, n. 4, 2020.

DZAKAH, Emmanuel E. et al. *Plasmodium vivax* aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China. **Malaria journal**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2013.

ESCALANTE, Ananias A.; PACHECO, M. Andreina. Malaria molecular epidemiology: An evolutionary genetics perspective. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 4, p. 7.4. 25, 2019.

FLANNERY, Erika L.; MARKUS, Miles B.; VAUGHAN, Ashley M. *Plasmodium vivax*. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 7, p. 583-584, 2019.

FERREIRA, M. S.; Malária. In: Veronesi R. ***Tratado de Infectologia***. São Paulo: Editora Atheneu; p. 1260-1264, 2004.

FERREIRA, Marcelo U.; CASTRO, Marcia C. Malaria situation in Latin America and the Caribbean: residual and resurgent transmission and challenges for control and elimination. In: **Malaria Control and Elimination**. Humana, New York, NY, 2019. p. 57-70.

FIGUEROA-MIRANDA, Gabriela et al. Aptamer-based electrochemical biosensor for highly sensitive and selective malaria detection with adjustable dynamic response range and reusability. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 235-243, 2018.

FRANÇA, Tanos CC; SANTOS, Marta G. dos; FIGUEROA-VILLAR, José D. Malaria: Historical aspects and chemoterapy. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

GABALDÓN-FIGUEIRA, Juan C. et al. Malaria in Venezuela: Gabaldón's legacy scattered to the winds. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 5, p. e584-e585, 2021.

GENTON, B. et al. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection using ParaSight (R)-F test in blood and urine of Papua New Guinean children. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 29, n. 1, p. 35-40, 1998.

GBOTOSHO, Grace O. et al. Rapid detection of lactate dehydrogenase and genotyping of *Plasmodium falciparum* in saliva of children with acute uncomplicated malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 83, n. 3, p. 496, 2010.

GONTIJO, Célia Maria Ferreira et al. The development of species of Leishmania Ross, 1903 in Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 367-373, 1995.

GREENHALGH, S.; CHANDWANI, V. Advocating an attack against severe malaria: a cost-effectiveness analysis. **BMC public health**, v. 20, n. 1, p. 17, 2020.

HALDAR, Kasturi et al. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 2, p. 217-249, 2007.

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

HENRY J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais.** ed. 20° São Paulo: Editora Manole LTDA, p. 1282 - 1288, 2008.

HERMAN, Camelia et al. Multiplex malaria antigen detection by *bead*-based assay and molecular confirmation by PCR shows no evidence of Pfhrp2 and Pfhrp3 deletion in Haiti. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

HOPKINS, Heidi et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 4, p. 645-652, 2013.

HOUZÉ, Sandrine et al. Pf HRP2 and Pf LDH antigen detection for monitoring the efficacy of artemisinin-based combination therapy (ACT) in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. **Malaria journal**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2009.

HOUZÉ, S. Rapid diagnostic test for malaria. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 110, n. 1, p. 49-54, 2017.

IMWONG, Mallika et al. Asymptomatic natural human infections with the simian malaria parasites *Plasmodium* cynomolgi and *Plasmodium* knowlesi. **The Journal of infectious diseases**, v. 219, n. 5, p. 695-702, 2019.

JAIN, Priyamvada et al. Potential biomarkers and their applications for rapid and reliable detection of malaria. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

JAIN, Sanjay K. et al. Nosocomial malaria and saline flush. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 7, p. 1097, 2005.

JANATA, Jiri. Role of analytical chemistry in defense strategies against chemical and biological attack. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 321-331, 2009.

JANG, Ihn Kyung et al. Simultaneous quantification of *Plasmodium* antigens and host factor C-reactive protein in asymptomatic individuals with confirmed malaria by use of a novel multiplex immunoassay. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 1, p. e00948-18, 2019.

JANG, Ihn Kyung et al. Multiplex human malaria array: quantifying antigens for malaria rapid diagnostics. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 102, n. 6, p. 1366, 2020.

KATRAK, Shereen et al. CLINICAL CONSEQUENCES OF SUBMICROSCOPIC MALARIA PARASITEMIA IN UGANDAN CHILDREN. In: **AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**. 8000 WESTPARK DR, STE 130, MCLEAN, VA 22101 USA: AMER SOC TROP MED & HYGIENE, 2017. p. 334-335.

KELLAR, Kathryn L.; IANNONE, Marie A. Multiplexed microsphere-based flow cytometric assays. **Experimental hematology**, v. 30, n. 11, p. 1227-1237, 2002.

KHAN, Shahid M.; WATERS, Andrew P. Malaria parasite transmission stages: an update. **TRENDS in Parasitology**, v. 20, n. 12, p. 575-580, 2004.

KIFUDE, Carolyne M. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in blood, plasma, and serum. **Clinical and vaccine immunology**, v. 15, n. 6, p. 1012-1018, 2008.

KINGSMORE, Stephen F. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 4, p. 310-321, 2006.

KO, K. Y.; AHN, Dong U. Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. **Poultry science**, v. 86, n. 2, p. 400-407, 2007.

KONSTANTINOU, George N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: **Food Allergens**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 79-94.

KORI, L. D.; VALECHA, N.; ANVIKAR, A. Glutamate Dehydrogenase: A Potential Biomarker for Diagnosis of *Plasmodium falciparum*. ***Plasmodium falciparum***, 2019.

KRAMPA, F. D. et al. Recent Advances in the Development of Biosensors for Malaria Diagnosis. **Sensors**, v. 20, n. 3, p. 799, 2020.

LAISHRAM, D. D. et al. The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2012.

LI, C. et al. A novel and efficient immunoglobulin Y extraction method using poloxamer-polyethylene glycol. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 7, p. 739-743, 2017.

LI, Yan et al. Preparation of a monoclonal antibodies against *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase and establishment of colloidal gold-immunochromatographic assay. **Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA**, v. 25, n. 4, p. 435-438, 2005.

LINH, Nguyen Thi Phuong et al. Development of monoclonal antibodies for diagnosis of *Plasmodium vivax*. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, n. 6, p. 623, 2017.

LIPMAN, Neil S. et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR journal**, v. 46, n. 3, p. 258-268, 2005.

MAKLER, Michael T.; HINRICHS, David J. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitemia. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 48, n. 2, p. 205-210, 1993.

MALTHA, Jessica; GILLET, P.; JACOBS, Jan. Malaria rapid diagnostic tests in travel medicine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 408-415, 2013.

MAŇÁSKOVÁ, Silvie Hansenová et al. Comparison of non-magnetic and magnetic *beads* in *bead*-based assays. **Journal of immunological methods**, v. 436, p. 29-33, 2016.

MANGANO, V. D. et al. Risk of transfusion-transmitted malaria: evaluation of commercial ELISA kits for the detection of anti-*Plasmodium* antibodies in candidate blood donors. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 1-9, 2019.

MANGOLD, Kathy A. et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435-2440, 2005.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning : a laboratory manual**. 2nd edition. Cold Spring Harbor ,New York, 1988.

MATHISON, Blaine A.; PRITT, Bobbi S. Update on malaria diagnostics and test utilization. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2009-2017, 2017.

MBABAZI, Phoebe et al. Accuracy of two malaria rapid diagnostic tests (RDTS) for initial diagnosis and treatment monitoring in a high transmission setting in Uganda. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 92, n. 3, p. 530, 2015.

MEIBALAN, Elamaran; MARTI, Matthias. Biology of malaria transmission. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 3, p. a025452, 2017.

MENDIS, K. et al. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 1, p. 97-106, 2001.

MESSACAR, Kevin et al. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 3, p. 715-723, 2017.

MILLER, Louis H. et al. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, n. 6872, p. 673-679, 2002.

MILLER, Louis H. et al. Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. **Nature medicine**, v. 19, n. 2, p. 156-167, 2013.

MILNER, Danny A. Malaria pathogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 1, p. a025569, 2018.

MOODY, Anthony. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 1, p. 66-78, 2002.

MORGAN, Edward et al. Cytometric *bead* array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical immunology**, v. 110, n. 3, p. 252-266, 2004.

MOUATCHO, Joel C.; GOLDRING, JP Dean. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. 10, p. 1491-1505, 2013.

MURPHY, S. C. et al. Malaria Diagnostics in Clinical Trials. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 89, n. 5, p. 824-839, 2013.

NAKAZAWA, Masami; MUKUMOTO, Mari; MIYATAKE, Kazutaka. Production and Purification of Polyclonal Antibodies. In**: High-Resolution Imaging of Cellular Proteins**. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 49-59.

ONDIGO, Bartholomew N. et al. Standardization and validation of a cytometric *bead* assay to assess antibodies to multiple *Plasmodium falciparum* recombinant antigens. **Malaria journal**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2012.

ONDIGO, Bartholomew N. et al. Comparison of non-magnetic and magnetic *beads* multiplex assay for assessment of *Plasmodium falciparum* antibodies. PeerJ, v. 7, p. e6120, 2019.

PARSA, Sanam Foroutan et al. Early diagnosis of disease using micro*bead* array technology: a review. **Analytica chimica acta**, v. 1032, p. 1-17, 2018.

PLUCINSKI, Mateusz M. et al. Posttreatment HRP2 clearance in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of infectious diseases**, v. 217, n. 5, p. 685-692, 2018.

PLUCINSKI, Mateusz M. et al. Performance of antigen concentration thresholds for attributing fever to malaria among outpatients in Angola. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 3, p. e01901-18, 2019.

PLUCINSKI, Mateusz; AIDOO, Michael; ROGIER, Eric. Laboratory Detection of Malaria Antigens: a Strong Tool for Malaria Research, Diagnosis, and Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 34, n. 3, p. e00250-20, 2021.

PODLASEK, Stanley J.; MCPHERSON, Richard A. New Lactate Dehydrogenase–IgM Complexes. **Laboratory Medicine**, v. 20, n. 9, p. 617-619, 1989.

POINSIGNON, Anne et al. Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 5, p. 750-753, 2008.

POLLEY, Spencer D. et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2866-2871, 2010.

PREUSS, Janina; JORTZIK, Esther; BECKER, Katja. Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*. **IUBMB life**, v. 64, n. 7, p. 603-611, 2012.

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

REIS, T. et al. Malária: confirmação laboratorial de casos clínicos suspeitos de infeção por *Plasmodium* sp entre 2010-2017. **Boletim Epidemiológico Observações**, v. 7, n. 22, p. 52-57, 2018.

RIFAIE-GRAHAM, Omar et al. Hemozoin-catalyzed precipitation polymerization as an assay for malaria diagnosis. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2019.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A. et al. Characterization of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase-soluble antigen. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, p. 1149-1155, 1998.

ROGIER, Eric et al. *Bead*-based immunoassay allows sub-picogram detection of histidine-rich protein 2 from *Plasmodium falciparum* and estimates reliability of malaria rapid diagnostic tests. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0172139, 2017.

ROGIER, Eric et al. High-throughput malaria serosurveillance using a one-step multiplex *bead* assay. **Malaria journal**, v. 18, n. 1, p. 1-10, 2019.

ROGIER, Eric et al. Capture and Detection of *Plasmodium vivax* Lactate Dehydrogenase in a *Bead*-Based Multiplex Immunoassay. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 102, n. 5, p. 1064, 2020.

SHAPIRO, Howard M.; ULRICH, Henning. Cytometry in malaria: from research tool to practical diagnostic approach?.**Cytometry Part A**, v. 77, n. 6, p. 500-501, 2010.

SHIO, Marina T. et al. Innate inflammatory response to the malarial pigment hemozoin. **Microbes and infection**, v. 12, n. 12-13, p. 889-899, 2010.

SINGH, Naveen K. et al. Capacitive malaria aptasensor using *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase as target antigen in undiluted human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 117, p. 246-252, 2018.

SIROMA, Thais Keiko; FERRARI, Eduardo Cal; RIGO, Rosângela Silva. *Plasmodium vivax*: causa de malária grave. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 14, n. 3, p. 166-71, 2016.

SOUSA, Luciana Pereira et al. A novel polyclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of *Plasmodium vivax* developed from two lactate dehydrogenase protein segments. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2014.

SRIVASTAVA, I. K. et al. Specificity and inhibitory activity of antibodies to *Plasmodium falciparum* aldolase. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 4, p. 1497-1503, 1990.

STEINBUCH, M.; AUDRAN, R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.134, p. 279-284, 1969.

SUTHERLAND, Colin J. Persistent parasitism: the adaptive biology of *malariae* and *ovale* malaria. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 10, p. 808-819, 2016.

TA, Thuy H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium* cynomolgi. **Malaria journal**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2014.

TANNER, Nathan A.; ZHANG, Yinhua; EVANS JR, Thomas C. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. **Biotechniques**, v. 53, n. 2, p. 81-89, 2012.

VAN GENDEREN, Perry JJ et al. Evaluation of plasma lactate as a parameter for disease severity on admission in travelers with *Plasmodium falciparum* malaria. **Journal of travel medicine**, v. 12, n. 5, p. 261-264, 2005.

VARO, Rosauro; CHACCOUR, Carlos; BASSAT, Quique. Update on malaria. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 155, n. 9, p. 395-402, 2020.

WAGNER, Jan T. et al. Glutamate dehydrogenase, the marker protein of *Plasmodium falciparum*: cloning, expression and characterization of the malarial enzyme. **European journal of biochemistry**, v. 258, n. 2, p. 813-819, 1998.

WALLQVIST, Anders et al. Metabolic host responses to malarial infection during the intraerythrocytic developmental cycle. **BMC systems biology**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2016.

WANG, You et al. Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043-2081, 2008.

WATERS, Andrew P; MCCUTCHAN, Thomas F. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. **The Lancet**, v. 333, n. 8651, p. 1343-1346, 1989.

WHITE, N.J. Anaemia and malaria. **Malaria journal**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 2018.

WILKINS, Patricia P.; NUTMAN, Thomas B. Immunological and molecular approaches for the diagnosis of parasitic infections. **Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology**, p. 486-502, 2016.

WIWANITKIT, Viroj. *Plasmodium* and host lactate dehydrogenase molecular function and biological pathways: implication for antimalarial drug discovery. **Chemical biology & drug design**, v. 69, n. 4, p. 280-283, 2007.

WOLFARTH-COUTO, Bruna; SILVA, Rosimeire Araújo da; FILIZOLA, Naziano. Variability in malaria cases and the association with rainfall and rivers water levels in Amazonas State, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 35, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report. Geneva, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report.** Geneva, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report.** Geneva, 2020.

YOON, Hyeonseok. Current trends in sensors based on conducting polymer nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 3, n. 3, p. 524-549, 2013.

ZHOU, R. et al. Characterization of *Plasmodium* ovale spp. imported from Africa to Henan Province, China. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

7. ANEXOS

7.1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP PARA AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária..
Pesquisador: Luis André Morais Mariúba
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 28823719.4.1001.0005
Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO
Patrocinador Principal: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.036.050

Apresentação do Projeto:
Trata-se do projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária".

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo Primário:
Desenvolvimento de novos métodos para diagnósticos de malária.

Objetivo Secundário:
• Avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos para detecção da malária baseados na detecção de marcadores de infecção proteicos;•
Avaliar a sensibilidade e especificidade de métodos para detecção da malária baseados na identificação de material genético de Plasmodium
extraído de amostras de pacientes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Vide Parecer de nº 3.894.876 de 03 de março de 2020.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Vide Parecer de nº 3.894.876 de 03 de março de 2020.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Na primeira relatoria havia sido identificado as seguintes pendências: Anuências da DAM, Gerência de Malária e Gerência de Ambulatório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As exigências do parecer consubstanciado foram atendidas. Sugiro aprovação do protocolo.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1474486.pdf	18/03/2020 13:15:35		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Folharesposta.pdf	18/03/2020 13:15:01	Luis André Morais Mariúba	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	13/12/2019 12:55:57	Luis André Morais Mariúba	Aceito
Outros	Questionario_epidemiologico.docx	11/12/2019 23:10:04	Luis André Morais Mariúba	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_n37_2019_Anuencia_Andre_FIOCRUZ.pdf	11/12/2019 23:08:54	Luis André Morais Mariúba	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIA_FUNDACAO_MEDICINA_TROPICAL.pdf	11/12/2019 23:07:40	Luis André Morais Mariúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.docx	11/12/2019 23:07:14	Luis André Morais Mariúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.docx	11/12/2019 23:00:18	Luis André Morais Mariúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.docx	11/12/2019 22:59:33	Luis André Morais Mariúba	Aceito

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

Continuação do Parecer: 4.036.050

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_avaliacao_de_metodos_para_diagnosticos_de_malaria.docx	11/12/2019 22:57:45	Luis André Morais Mariúba	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MANAUS, 20 de Maio de 2020

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária.

Pesquisador: Luis André Morais Marlúba

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 28823719.4.1001.0005

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO OSWALDO CRUZ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.837.724

Apresentação do Projeto:

Vide Protocolo CAAE 28823719.4.1001.0005

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da EMENDA é a inclusão de centro colaborador, pois em virtude da pandemia causada pelo novo coronavirus, as coletas em Manaus, junto à Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), foram interrompidas. Em virtude disto, buscamos colaborações em outros Institutos que desejassem participar deste projeto, obtendo resposta positiva da Dra. Carolina Bioni, servidora da FIOCRUZ localizada em Porto Velho – RO.

O aceite dessa solicitação, além de permitir a continuação do estudo proposto, possibilitará ampliarmos a região de análise das ferramentas moleculares para diagnóstico das cepas de Plasmodium falciparum e P. vivax circulantes na Amazônia.

Ressaltamos que os objetivos previstos não serão modificados. A solicitação é restrita a adição de mais um ponto de coleta, localizado no estado de Rondônia. Utilizaremos as mesmas metodologias e "n" amostral já aplicadas e aceitas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos.

Reiteramos ainda que não haverá alteração nos critérios de inclusão e exclusão, nem no cronograma de excução do referido projeto. Anexamos no sistema da "Plataforma Brasil" versões

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

do TCLE, do termo de assentimento e "TCLE para o responsável do paciente" a serem aplicados em Porto Velho-RO.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Vide Protocolo CAAE 28823719.4.1001.0005

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
"Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária" CAAE 28823719.4.1001.0005.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
"Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária" CAAE 28823719.4.1001.0005.

Recomendações:
NENHUMA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
A presente EMENDA obedeceu aos objetivos, estudos e procedimentos aprovados no protocolo inicial; os termos de consentimento foram readequados com as informações do novo centro de Apoio;
A inserção do novo apoio, permitirá a continuação do estudo proposto, possibilitando ampliação da região de análise das ferramentas moleculares para diagnóstico das cepas de Plasmodium falciparum e P. vivax circulantes na Amazônia.

Desta forma que não vislumbro empecilho para a INSERÇÃO do novo ponto de coleta na FIOCRUZ localizada em Porto Velho – RO.

Considerações Finais a critério do CEP:
O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1775282_E1.pdf	18/06/2021 12:58:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TERMODECONSENTIMENTOLIVREESCLARECIDOPVH.docx	18/06/2021 12:57:06	Luis André Morais Marlúba	Aceito

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

Continuação do Parecer: 4.837.724

Justificativa de Ausência	TERMODECONSENTIMENTOLIVREEESCLARECIDOPVH.docx	18/06/2021 12:57:06	Luis André Morais Marlúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODEASSENTIMENTOPVH.docx	18/06/2021 12:56:28	Luis André Morais Marlúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEResponsavelPVH.docx	18/06/2021 12:55:57	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaDhelloCEPEM.pdf	18/06/2021 12:54:09	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaFiocruzRO.pdf	18/06/2021 12:53:22	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Outros	AdendoInclusaoPVH.pdf	18/06/2021 12:51:04	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Folharesposta.pdf	18/03/2020 13:15:01	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	13/12/2019 12:55:57	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Outros	Questionario_epidemiologico.docx	11/12/2019 23:10:04	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_n37_2019_Anuencia_Andre_FIOCRUZ.pdf	11/12/2019 23:08:54	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIA_FUNDACAO_MEDICINA_TROPICAL.pdf	11/12/2019 23:07:40	Luis André Morais Marlúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsavel.docx	11/12/2019 23:07:14	Luis André Morais Marlúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_ASSENTIMENTO.docx	11/12/2019 23:00:18	Luis André Morais Marlúba	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO.docx	11/12/2019 22:59:33	Luis André Morais Marlúba	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_avaliacao_de_metodos_para_diagnosticos_de_malaria.docx	11/12/2019 22:57:45	Luis André Morais Marlúba	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL "DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO"

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

MANAUS, 09 de Julho de 2021

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Duas vias deste documento serão impressas, sendo uma via do participante da pesquisa.

Projeto: "Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária"

Investigadores: Adélia Marques de Figueiredo, Juliane Correa Glória, Daniele Soares Mota, Dr. Luis André Morais Mariúba, Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, Dra. Gisely Cardoso de Melo, Carolina Bioni Garcia Teles e Dhelio Batista Pereira

A proposta deste TCLE é explicar todas as informações sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

Convite: Por ter visitado o Ambulatório de Referência em Malária para o tratamento de malária você está sendo convidado a participar de uma pesquisa **"Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária"** no Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/ SESAU), Porto Velho - RO, Brasil, sob a responsabilidade dos pesquisadores Adélia Marques de Figueiredo, Juliane Correa Glória, Daniele Soares Mota e Luis André Morais Mariúba da ILMD/FIOCRUZ – MANAUS. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.

Objetivo do estudo: Desenvolver novos métodos de diagnóstico de malária por meio da detecção de marcadores de infecção proteicos ou material genético. E a pesquisa poderá ser usada no futuro para ajudar no desenvolvimento de outros testes.

Procedimento do estudo: Após o seu aceite, nós faremos um questionário sobre nome, endereço, idade, história de malária anterior, sintomas, e o resultado do exame de malária. Com seu consentimento, faremos a coleta de 10 ml de sangue que equivale a uma colher de sopa, coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde capacitada e treinada.

Informações técnicas: O sangue será utilizado em experimentos para elaboração de testes diagnóstico para malária *vivax* e *falciparum*. Realizaremos testes utilizando as metodologias de citometria de fluxo, fitas imunocromatográficas, eletroquímica, reações de polimerase em cadeia para detecção de DNA/RNA, comparando e confirmando a eficiência dos novos métodos propostos.

Benefícios para o participante: Não há um benefício direto a você, participante, porém indiretamente você ajudará no desenvolvimento e padronização de um novo teste para o diagnóstico da Malária *vivax* e *falciparum*, melhorando a chance de diagnóstico e tratamento correto. No entanto, será beneficiado por contribuir para o avanço científico da doença.

Participação voluntária/desistência do estudo: A participação é totalmente voluntária, onde você só participa se quiser. Você não precisa fazer qualquer esforço especial para participar desse projeto, e receberá o mesmo tratamento e acompanhamento estabelecido pelo Ministério da Saúde. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe médica, ou com o tratamento, ou com o pesquisador. Ou seja, o acompanhamento e o tratamento da sua doença serão iguais, participando ou não na pesquisa. A qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento do estudo se assim desejar, também sem qualquer prejuízo no tratamento e acompanhamento realizado pela instituição.

Riscos ou danos relacionados à Pesquisa: Como parte desse estudo nós coletaremos uma amostra de sangue, cerca de 10 ml que equivale a uma colher de sopa. Coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde muito bem treinada da gerencia de malária. Você pode sentir alguma dor ou desconforto por causa da coleta. Depois pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa. Mas qualquer dor deve durar poucos segundos. A amostra de sangue coletada é muito pequena e não representa nenhum risco a saúde. Todos os cuidados serão tomados para minimizar esses riscos. A coleta será feita com material esterilizado e descartável sem risco algum para os pacientes.

Como a sua participação no estudo se dará uma única vez na ocasião em que você procurou o atendimento nesta unidade de saúde, consideramos que esta participação não irá gerar nenhum gasto, mas caso ocorra, estes gastos lhe serão ressarcidos. Caso a participação no estudo traga alguma lesão ou dano, você terá todos os direitos a indenização diante de eventuais danos decorrentes a pesquisa, conforme a RESOLUÇÃO Nº466/2012, CNS/MS.

Registros Médicos e confidencialidade: Todas as informações coletadas serão confidenciais, usadas somente no estudo em caráter cientifico. Nós não compartilharemos suas informações e não tornaremos público qualquer detalhe sobre você. Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo sua identidade não será revelada em nenhuma hipótese nessas apresentações.

CEP/FMT-HVD: O Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD) localiza na Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro, CEP

69.040-000 - Manaus - Amazonas – Brasil. Contatos via telefone (92) 2127-3572 e pelo e-mail cep@fmt.am.gov.br. Horário de funcionamento, de 2ª a 6ª feira das 8:00 as 12:00 horas.

Contatos ou dúvidas: Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim se você desejar esclarecer dúvidas sobre a pesquisa sinta-se à vontade para contatar os pesquisadores do projeto. 1) Pesquisador principal Dr. Luis André Morais Mariúba, laboratório DCDIA, e os demais alunos, Juliana Correa Glória, Daniele Soares Mota, poderão ser encontrados no Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, das 08:00 ás 17:00 horas, de segunda-feira a sexta-feira, situado no endereço Rua Teresina, nº 476 Adrianópolis - Manaus, AM – Brasil. Telefone: (92) 36212323. 2) A estudante pesquisadora Adélia Marques de Figueiredo que poderá ser encontrada na Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, das 08:00 as 12:00 horas, de segunda-feira a quinta-feira situado no endereço Rua Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro – Manaus, AM-Brasil. Telefone: (92) 21273443.

Declaração de consentimento: Declaro que li e recebi a explicação do consentimento e objetivo do estudo, sendo esclarecidas todas as minhas dúvidas e estou concordando em participar do estudo. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento. E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

O sangue colhido que sobrar poderá ser guardada no Freezer -80ºC do Lab. DCDIA localizado Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ adequando a RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Perguntamos se sr. (a) consente que esta amostra possa ser utilizada no futuro para outras pesquisas? Nós garantimos que estas pesquisas serão sobre o mesmo tema desta pesquisa e para elas será elaborado um novo projeto que será submetido à aprovação pelo sistema CEP/CONEP e você será procurado para assinar um novo TCLE. Você consente?

Sim ( ) Não ( )

Assinatura

Datiloscópica.

_____ _____/_____/_____

Nome e assinatura do participante da pesquisa Data

_____ _____/_____/_____

Nome e assinatura do entrevistador Data

_____/_____/_____

Luis André Morais Mariúba, Pesquisador
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ
Manaus-AM, Tel.: 92 36212323

Data

7.3 TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Duas vias deste documento serão impressas, sendo uma via do participante da pesquisa.

(Adolescentes maiores de 12 anos e menores de 18 anos)

Informação geral: O assentimento informado para criança/adolescente não substitui a necessidade de consentimento informado dos pais ou guardiãs. O assentimento assinado pela criança demonstra a sua cooperação na pesquisa.

Título do projeto: Avaliação de métodos para diagnósticos de Malária

Investigadores: Adélia Marques de Figueiredo, Juliane Correa Glória, Daniele Soares Mota, Dr. Luis André Morais Mariúba, Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, Dra. Gisely Cardoso de Melo, Carolina Bioni Garcia Teles e Dhelio Batista Pereira

Local da pesquisa: FIOCRUZ-MANAUS, FMT-HVD e Centro de Pesquisa em Medicina Tropical (CEPEM/ SESAU).

Endereço: Rua Teresina, nº476 Adrianópolis – Manaus, AM- Brasil. Telefone: (92) 36212323.

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao participante da pesquisa:

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa.

Qual o objetivo? Desenvolver novos métodos de diagnóstico de malária por meio da detecção de marcadores de infecção proteicos ou material genético.

Para que fazer a pesquisa? Para ajudar no desenvolvimento de novos testes de identificação da Malária. E esta pesquisa poderá ser usado no futuro para o desenvolvimento de outros testes.

Como será feita? Faremos um questionário sobre você, seus dados pessoais como nome, endereço, idade, história de malária anterior, sintomas, e o resultado do exame de malária. Com

seu consentimento faremos a coleta de 10 ml de sangue que equivale a uma colher de sopa, coletaremos pela veia do antebraço e isto será realizado por uma técnica de saúde capacitada e treinada da gerencia de malária.

Beneficio esperados como a pesquisa? Não há nenhum beneficio para que você, porém indiretamente você ajudará no desenvolvimento e padronização de novos testes para o diagnóstico da Malária *vivax* e *falciparum*, melhorando a chance de diagnóstico e tratamento correto. No entanto, será beneficiado por contribuir para o avanço científico da doença.

Caso você aceite participar, os procedimentos são: Com o sangue nós vamos realizar experimentos para elaboração de testes diagnóstico para malária *vivax* e *falciparum*.

Quais os riscos? Você pode sentir alguma dor, no local da coleta de sangue pode ficar roxo, ou desconforto por causa da picada da agulha. Mas qualquer dor deve durar poucos segundos. A quantidade de sangue é muito pequena e não representa nenhum risco a saúde. Todos os cuidados serão tomados para diminuir esses riscos. A participação é voluntária, isso quer dizer que, para que a gente possa fazer isso, você de concordar voluntariamente em participar da pesquisa, assinando o seu nome. Se você não quiser participar não terá nenhum prejuízo para o seu tratamento.

CEP/FMT-HVD: O Comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD) localiza na Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro, CEP 69.040-000 - Manaus - Amazonas – Brasil. Contatos via telefone (92) 2127-3572 e pelo e-mail cep@fmt.am.gov.br. Horário de funcionamento, de 2ª a 6ª feira das 8:00 as 12:00 horas.

Contatos ou dúvidas: Se você tiver qualquer pergunta ou preocupação sobre o estudo, por favor, vamos esclarecer isso agora. Mesmo assim se você desejar esclarecer suas dúvidas sobre a pesquisa sinta-se à vontade para contatar os pesquisadores do projeto. 1) Pesquisador principal Dr. Luis André Morais Mariúba, laboratório DCDIA, e os demais alunos, Juliana Correa Glória, Daniele Soares Mota, poderão ser encontrados no Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ, das 08:00 ás 17:00 horas, de segunda-feira a sexta-feira, situado no endereço Rua Teresina, nº 476 Adrianópolis - Manaus, AM – Brasil. Telefone: (92) 36212323. 2) A estudante pesquisadora Adélia Marques de Figueiredo que poderá ser encontrada na Gerência de Malária da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, das 08:00 as 12:00 horas, **de segunda-feira a quinta-feira** situado no endereço Rua Av. Pedro Teixeira, nº 25 - Bairro Dom Pedro – Manaus, AM-Brasil. Telefone: (92) 21273443.

Declaração de consentimento: Declaro que li e recebi a explicação do consentimento e objetivo do estudo, sendo esclarecidas todas as minhas dúvidas e estou concordando em participar do estudo. Se eu não souber ler ou escrever, uma pessoa de minha confiança lerá este

documento para mim e depois escreverá nesta página o meu nome e a data do preenchimento. E por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente, sem qualquer pressão por parte dos pesquisadores, expresso meu consentimento para minha inclusão nesta pesquisa.

O sangue colhido que sobrar poderá ser guardado no Freezer -80ºC do Lab. DCDIA localizado Centro de pesquisas Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ adequando a RESOLUÇÃO CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011. Perguntamos se sr. (a) consente que esta amostra possa ser utilizada no futuro para outras pesquisas? Nós garantimos que estas pesquisas serão sobre o mesmo tema desta pesquisa e para elas será elaborado um novo projeto que será submetido à aprovação pelo sistema CEP/CONEP e você será procurado para assinar um novo TCLE. Você consente?

Sim ( )Não ( )

Assinatura Datiloscópica

_____/_____/_____

Nome e assinatura do participante da pesquisa Data

Assinatura Datiloscópica

_____/_____/_____

Nome e assinatura dos pais / responsáveis Data

_____ _____/_____/_____

Nome e assinatura do entrevistador Data

Luis André Morais Mariúba, Pesquisador
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ
Manaus-AM, Tel.: 92 36212323

_____/_____/_____

Data