



Métodos para diagnóstico de Malária: Atualização e desafios¹

Juliane Corrêa Glória²; Maria Edilene Martins de Almeida³; Késsia Caroline Souza Alves²; Felipe Araújo⁴; Ricardo Andrez Machado de Ávila⁵, Paulo Afonso Nogueira⁶ e Luís André Morais Mariúba⁷

Resumo

A malária continua sendo um sério problema de saúde pública amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais no mundo. Uma das principais maneiras de controle desta enfermidade está ligada ao seu diagnóstico correto logo nos estágios iniciais, o que o método diagnóstico por microscopia, ainda considerado “padrão ouro”, muitas vezes não é capaz de proporcionar. Com isso, temos demonstrado a necessidade de aperfeiçoamento das técnicas atualmente disponíveis, além de uma adequação às necessidades dos países mais afetados pela malária. Sendo assim, a presente revisão teve como objetivo informar sobre os principais métodos de diagnósticos disponíveis e sobre os desafios do desenvolvimento da metodologia ideal para detecção de infecções maláricas.

Palavras-chave: Microscopia, LAMP, TDRs.

Methods for malaria diagnosis: Update and challenges. Malaria remains a serious public health problem widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world. One of the main ways of controlling it's the early diagnostic, which microscopic diagnostic method, still considered a "gold standard", is often not able to provide. It demonstrates the need to improve currently available techniques, as well as an adaptation to regional conditions of malaria endemic countries. Therefore, the present review aimed to describe the main diagnostic methods available and challenges in the developing an ideal assay for malaria detection.

Keywords: Microscopy, LAMP, TDRs.

¹ Parte da Revisão da dissertação de mestrado do primeiro autor em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, AM – Brasil.

² Mestrandas do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 - Coroado I, Manaus - AM, 69067-005. Email: juliane.correa.biotec@gmail.com/kessiafenty@gmail.com

³ Doutoranda do Programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – IOC Fiocruz. E-mail: edilene_martins19@hotmail.com

⁴ Biomédico bolsista de apoio técnico do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Email: felipearaujobio@gmail.com

⁵ Professor e Pesquisador da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Email: r_andrez@yahoo.com.br

⁶ Pesquisador do Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia do Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Email: paulo.nogueira@fiocruz.br

⁷ Tecnologista no Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia. Email: andre.mariuba@fiocruz.br (autor para correspondência)



1. Introdução

A malária é uma infecção aguda, sistêmica, não contagiosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium sp.* Considera-se que tenha surgido na África há milhões de anos e tenha se espalhado para regiões tropicais e subtropicais do mundo através de migrações, exploradores, missionários e escravos (COX, 2002), sendo endêmica para essas áreas.

De todas as espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, apenas as espécies *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie*, *P. ovale*, *P. knowlesi* são capazes de infectar humanos. Esta última foi mais recentemente descoberta em seres humanos, inicialmente encontrada apenas em primatas (SINGH et al., 2003), e ocorre somente em algumas áreas florestais do sudeste da Ásia (SINGH; DANESHVAR, 2013).

Os principais vetores responsáveis pela transmissão da doença são fêmeas do mosquito do gênero *Anopheles*, através do repasto sanguíneo. Os humanos infectados, mesmo os que não apresentam sintomas clínicos (assintomáticos), são capazes de abrigar formas sexuais dos parasitas, sendo assim reservatórios para infecção de mosquitos. A malária também pode ser transmitida através de transfusões sanguíneas ou do compartilhamento de seringas contaminadas, embora esses casos ocorram com muito menos frequência (KITCHEN; CHIODINI, 2006).

O sintoma mais característico da malária é a febre de 40 °C ou mais, em intervalos geralmente bem definidos de 48 horas ou 72 horas (variando de acordo com a espécie infectante), podendo passar a ser intermitente após os primeiros eventos.

Outros sintomas comuns à infecção por malária incluem: cefaleia, calafrios, sudorese, náuseas, vômitos e mialgia. A gravidade das manifestações clínicas varia de acordo com uma série de fatores como, espécie do parasita causador da doença, níveis de parasitemia, imunidade da pessoa infectada, incluso tratando-se de um indivíduo susceptível, como as grávidas,

lactantes e crianças e exposições prévias da pessoa infectada (WEISS et al., 2010).

O diagnóstico precoce desta doença é uma das formas mais importantes de controle, uma vez que possibilita do tratamento antes de uma maior progressão de transmissão. No entanto, os sintomas causados pela malária são muitas vezes indistinguíveis de sintomas causados por doenças como hepatite viral, dengue e leptospirose, entre outras, o que dificulta seu diagnóstico (COSTA et al., 2010).

Para contornar essa problemática, vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos para detectar o parasita da malária ou seus subprodutos, cada um possuindo suas vantagens e desvantagens em relação ao seu uso, variando em desempenho, custo e praticidade.

2. Metodologia

A revisão da literatura sobre os principais métodos de diagnóstico e suas atualizações foi feita por meio de busca de publicações de pesquisas sobre diagnósticos para Malária disponíveis em banco de dados eletrônicos: *Periódicos CAPES*, *Lilacs*, *Scopus e Science Direct*. O período destas publicações foi de 2002 a 2017, cujas palavras-chave foram: *Malaria diagnostic*, *Malaria detection*, *malaria diagnosis*, *Rapid Diagnostic Test for Malaria*, *Malaria Molecular Diagnostic*, *Malaria Parasitological diagnostic e malaria serological diagnostic*.

3. Diagnóstico de Malária

Por mais de 100 anos, a microscopia se mantém como o teste de diagnóstico considerado como padrão ouro para detecção de malária (MURPHY et al., 2013). No entanto, há vários métodos que são utilizados em estudos da infecção por malária, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), imunofluorescência, testes imunocromatográficos rápidos, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), entre outros.



3.1 Diagnóstico parasitológico

O teste microscópico possui características desejáveis ao diagnóstico de malária, tais como custo baixo, especificidade e sensibilidade alta. Por esses motivos, se mantém como padrão-ouro para detecção de malária.

Este diagnóstico é realizado através da técnica do esfregaço delgado ou espesso (gota espessa) (BRASIL, 2010). A Gota espessa é mais utilizada, pois o sangue concentrado facilita a visualização de parasitas (BRASIL, 2009). Esta técnica se baseia na coleta de sangue periférico de pacientes com suspeitas de infecção malárica para preparo de lâminas coradas com Giemsa (ou outros corantes específicos) de 20 a 30 minutos e posterior visualização em microscópio óptico, possibilitando a diferenciação de espécies de parasitas encontrados e também uma contagem de parasitas por campo, sendo assim, qualitativo e quantitativo (BRASIL, 2009).

Este exame permite a detecção de até 5-10 parasitas/ μ l, no entanto, esse limite é dependente do nível de experiência do responsável pela interpretação do teste. Em campo, essa capacidade passa a ser de cerca de 100 parasitas por μ l de sangue. O tempo de aplicação total deste exame é de cerca de 60 minutos (BRASIL, 2009).

Apesar das vantagens apresentadas, faz-se necessário levar em consideração que muitos vieses estão envolvidos na interpretação dos resultados, tais como: preparo inadequado das lâminas, lise das hemácias e consequentes mudanças na morfologia dos parasitas e, com isso, erros na identificação das espécies, o que poderia levar a administração de antimaláricos inadequados para as infecções (HÄNSCHEID, 2003; PROUX et al., 2011).

Apesar das novas abordagens, como a busca por corantes alternativos para diminuir o tempo de execução da técnica (MULAY et al., 2017) e da tentativa de melhorar o desempenho da microscopia em campo com o auxílio de câmeras e softwares (BRESLAUER et al., 2009), este método de diagnóstico ainda exige uma infraestrutura adequada, profissionais muito bem

qualificados para execução e interpretação dos exames (MANGOLD et al., 2005).

3.2 Diagnóstico Sorológico

Os diagnósticos sorológicos se baseiam na interação entre antígenos do parasita na fase sanguínea assexuada presentes no soro dos pacientes com malária com anticorpos produzidos contra estes, utilizando técnicas como ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) ou imunofluorescência (TANGPUKDEE et al., 2009).

Em geral, os EIA (ensaios imunoenzimáticos) possuem alta sensibilidade e especificidade, por se tratarem de testes baseados na ligação antígeno-anticorpo, que são ligações específicas (LIPMAN et al., 2005). Na técnica ELISA indireto, microplacas que possuem poços, chamados “well”, onde são aderidos antígenos. Os soros dos pacientes são adicionados em cada poço e, durante a incubação, ocorre ligação entre o antígeno aderido à placa e o anticorpo presente no soro adicionado. Em seguida, adiciona-se um segundo anticorpo que se ligará às imunoglobulinas da espécie que estão sendo testadas, e este está conjugado à enzima peroxidase, a qual, em contato com a solução cromatogênica adequada como, por exemplo, o tetrametilbenzidina (TBM) com o substrato da enzima, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) provoca uma reação colorimétrica, possibilitando a mensuração da quantidade de anticorpos presentes no soro dos pacientes. Este ensaio, pelo fato de se basear na busca de anticorpos contra antígenos, e não na busca de antígenos, geralmente é mais empregado em estudos para avaliar a resposta imune humoral de pacientes (DRAME et al., 2010; POINSIGNON et al., 2008).

O ELISA sanduíche se baseia, além das etapas já descritas, mais uma etapa inicial a qual consiste na sensibilização da placa com anticorpos para captura de antígenos alvo (GONÇALES; GONÇALES, JR, 2004), as reações posteriores acontecem como o descrito acima.

Os biomarcadores de infecção mais empregados são as Aldolases de



Plasmodium, Proteína Rica em Histidina-2 (HRP-2) de *Plasmodium falciparum* e a Lactato Desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH).

As aldolases são as principais enzimas da via glicolítica do *Plasmodium*, liberadas no sangue dos pacientes infectados e são encontradas no citoplasma dos parasitas (DZAKAH et al., 2013).

As proteínas HRP (Histidine-rich proteins), são proteínas nas quais o aminoácido histidina representa mais de 70% da composição da cadeia polipeptídica. A HRP-2 de *Plasmodium* é exclusiva do *P. falciparum*, e se encontra presente no soro, e em outros fluidos de indivíduos infectados com este parasita (JAIN et al., 2014).

A proteína PfHRP-2, embora amplamente utilizada em testes de diagnóstico rápido possui o viés de permanecer no organismos por um período de tempo mesmo após a cura do paciente, podendo levar a falsos positivos que acarretam na administração desnecessária de antimaláricos (HOUBE et al., 2009; IQBAL et al., 2004), além disso, estudos recentes têm demonstrado que pode haver a deleção do gene de HRP2 em algumas cepas de *P. falciparum*, acarretando em falsos negativos para os testes de diagnóstico que usam esse antígeno como marcador (KOITA et al., 2012; KUMAR et al., 2013).

A LDH de plasmódio (pLDH) faz parte da via glicolítica do metabolismo do parasita, é produzida tanto em todas as etapas do ciclo de vida deste (MOODY, 2002). Como a via glicolítica é a principal fonte de energia para o desenvolvimento do parasita, o consumo de glicose das hemácias infectadas pelo parasita é muito aumentado, chegando a ser entre 50 a 100 vezes maior do que as hemácias saudáveis (PREUSS; JORTZIK; BECKER, 2012; WALLQVIST et al., 2016).

3.3 Testes de Diagnóstico Rápido (TDRs)

Os testes de diagnóstico rápido (TDR) para malária consistem em anticorpos contra antígenos específicos do plasmódio imobilizados em membranas de

nitrocelulose e ligados a partículas de ouro, nas quais migra a fase líquida de sangue de pessoas com suspeita de infecção malárica. Estes testes possuem uma fase fixa, na qual há um anticorpo de captura aderido à membrana de nitrocelulose e com isso, a migração do antígeno presente na fase móvel resulta na ligação antígeno-anticorpo, tornando possível a visualização de uma linha colorida (MOODY, 2002). A viabilidade do teste é verificada por meio de um anticorpo anti-camundongo (MOODY, 2002).

A OMS estabeleceu uma série de diretrizes para a produção de testes de diagnóstico rápido (TDR) para aplicações *point-of-care*. Essas diretrizes basicamente recomendam que os testes tenham facilidade de acesso àqueles que necessitam, tenham uma boa sensibilidade e especificidade, que sejam fáceis de usar, rápidos e independentes de equipamentos (WHO, 2011).

Quanto à sensibilidade e especificidade destes testes, a OMS determina devam ter uma sensibilidade, pelo menos, equivalente à da microscopia em condições de campo, que é equivalente ao nível de detecção de aproximadamente 100 parasitas/ μ l. Para essa parasitemia, os testes devem ser capazes de detectar os antígenos em 100% das vezes, com uma especificidade de 90%. Além disso, os testes devem ser específicos para os antígenos indicativos de parasitas vivos circulantes, não podendo ser reativos a produtos de parasitas inviáveis, como resquícios de proteínas ou ácidos nucleicos. Idealmente, também devem oferecer a verificação de eficácia de tratamentos ou resistência às drogas antimaláricas (WHO, 2011).

Atualmente, existem vários testes de diagnóstico rápido disponíveis no mercado. Os testes existentes geralmente são para detecção de *P. falciparum*, de *P. falciparum* + Pan reativo (que é capaz de detectar - *Plasmodium falciparum* e outras espécies de plasmódio que infectam humanos), para *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium vivax*, *P. vivax* e Pan reativo, teste apenas com anticorpo Pan reativo ou somente para



detecção de *Plasmodium vivax* (WHO, 2011).

3.4. Diagnóstico molecular

As técnicas moleculares vêm sendo amplamente empregadas para diagnóstico de doenças infecciosas (EMMADI et al., 2011). A PCR como método de detecção de malária foi inicialmente descrita por Waters & McCutchan, em 1989 e consistem na amplificação de sequências específicas da região codificadora da subunidade menor de RNA ribossomal (18S rRNA) de plasmódio, pela utilização de *primers* (sequências iniciadoras), responsáveis por se anelar em regiões específicas do DNA, e da enzima DNA polimerase (Taq DNA polimerase), que realiza a síntese por meio de ciclagem de temperaturas específicas para desnaturação e extensão do DNA, resultando na aquisição de milhares de cópias da sequência alvo (LORENZ, 2012).

Apesar de todas as vantagens relacionadas a esta tecnologia, seu uso continua sendo restrito ao ambiente laboratorial, em decorrência ao alto custo dos reagentes e equipamentos utilizados, necessidade de profissionais qualificados para a execução e o cuidado para evitar contaminações.

3.4.1 PCR em tempo real

A PCR em tempo real, permite uma análise mais sensível e específica que as já apresentadas, (PERANDIN et al., 2004; MANGOLD et al., 2005) sendo, até o presente momento, o único método de diagnóstico para malária, rotineiramente empregado, capaz de detectar infecções assintomáticas, além de ser capaz de diferenciar entre as espécies de plasmódio existentes (MURPHY et al., 2012). Por esses motivos, é a mais indicada para *screening* em bancos de sangue e para confirmação de casos suspeitos de malária que apresentam resultados negativos nas demais formas de diagnóstico (ALI et al., 2005)

3.4.2 LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

Um novo método de diagnóstico molecular vem sendo utilizado para detecção de infecções maláricas, sendo este LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) (HAN et al., 2007; SINGH et al., 2013;) este método consiste na amplificação do DNA sem a variação de temperatura necessária para os métodos convencionais de PCR. Por ser mais simples, com sua análise podendo ser feita por meio de visualização de turbidez ou fluorescência e não necessitar de muitos equipamentos, tem o potencial de ser utilizado em condições de campo (POLLEY et al., 2013), além de apresentar altos índices de sensibilidade (PATEL et al., 2013), o que é essencial para o diagnóstico da malária.

3.5 Biossensores

Os sensores eletroquímicos, os quais são dispositivos que detectam variações ao receberem estímulos de natureza física ou química, respondendo com um sinal elétrico que pode ser canalizado, amplificado e modificado através de dispositivos eletrônicos (YOON, 2013) também se apresentam como uma alternativa para o aumento da capacidade de detecção da malária, uma vez que possível ser aplicado em campo.

Algumas pesquisas buscam o desenvolvimento de biossensores para detecção de malária a partir de aptâmeros e anticorpos como elementos de detecção. Lee e colaboradores (2012) descreveu o desenvolvimento de aptassensores para malária, baseados na detecção da proteína *pLDH* empregando um sistema de reconhecimento composto de um aptâmero modificado como ligações tiol sobre um eletrodo de ouro, sendo a leitura do sinal realizada em uma plataforma de espectroscopia eletroquímica de impedância (EIS). O limite de detecção reportado para os aptassensores foi de 108.5 fM e 120.1 fM para LDH de *P. vivax* e LDH do *P. falciparum*, respectivamente.

A capacidade de detectar baixas concentrações do antígeno possibilitaria também utilizar amostras de coleta menos invasiva, como as de saliva, visto que como demonstrado por Gbotosho et al. (2010), os antígenos maláricos estão presentes deste



tipo de fluido, porém em baixas concentrações

4. Considerações Finais

Considerando a distribuição geográfica da malária, um método de diagnóstico *point-of-care* seria o ideal às necessidades da população mais acometida por esta doença.

Levando-se em conta também que a transmissão da doença também pode ser continuada por meio de indivíduos que estão infectados, porém não apresentam sintomas (assintomáticos), seria de suma importância que a sensibilidade do teste fosse alta, além da sua confiabilidade em relação à distinção das espécies infectantes, para evitar a administração errônea de antimaláricos, e para, também, evitar a resistência dos parasitas a estes.

Portanto, mesmo com a grande variedade de métodos de diagnóstico, ainda é um desafio obter um método que tenha todas as características desejáveis de necessárias aos órgãos de saúde governamentais para distribuição para população em áreas de risco.

O grande desafio dos próximos anos será o de encontrar uma maneira de combinar o baixo custo da microscopia, a praticidade dos TDRs e a alta sensibilidade e especificidade do diagnóstico molecular.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Amazonas - FAPEAM pelas bolsas concedidas e suporte financeiro geral. Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia pela estrutura física, em particular ao grupo de pesquisa Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia (DCDIA). À Universidade Federal do Amazonas por fornecer a minha formação acadêmica.

Divulgação

Este artigo de revisão é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os

direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta revisão, por meio eletrônico.

Referências

ALI, M. S. M. et al. Evaluation of malaria parasite screening procedures among Sudanese blood donors. **Clinical laboratory science**, v. 18, n. 2, p. 69–73, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2498–2498, 2010. doi: 10.1590/S0102-311X2006001100027.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária**. Normas e Manuais Técnicos – 2 ed.- Brasília, 2009.

BRESLAUER, D. N. et al. Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. **PLoS One**, v. 4, n. 7, p. e6320, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0006320.

COSTA, A. D. P. et al. Delayed diagnosis of malaria in a dengue endemic area in the Brazilian extra-Amazon: recent experience of a malaria surveillance unit in state of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 571–574, 2010.

COX, F. E. G. History of Human Parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595–612, 1 out. 2002. doi: 10.1128/CMR.15.4.595-612.2002

DRAME, P. M. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0015596.

DZAKAH, E. 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. 199, 2013. doi: 10.1186/1475-2875-12-199.

EMMADI, R. et al. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing: A



review of FDA-approved and cleared assays. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 6, p. 583-604. 2011. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.05.011.

GBOTOSHO, G. O. et al. Rapid detection of lactate dehydrogenase and genotyping of *Plasmodium falciparum* in saliva of children with acute uncomplicated malaria. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 3, p. 496-501, 2010. doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0166

GONÇALES, N. S. L.; GONÇALES JR, F. L. Diagnóstico laboratorial. in: **II Consenso da Sociedade Paulista de Infectologia para Manuseio e Terapia da Hepatite C**, p. 25-27, 2004.

HAN, E.-T. et al. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2521-8, 2007. doi: 10.1128/JCM.02117-06

HÄNSCHEID, T. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. **Clinical microbiology and infection**, v. 9, n. 6, p. 497-504, jun. 2003. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00640.x

HOUZE, S. et al. PfHRP2 and PfLDH 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. 211, 2009. doi: 10.1186/1475-2875-8-211

IQBAL, J. et al. Persistent histidine-rich protein 2, parasite lactate dehydrogenase, and panmalarial antigen reactivity after clearance of *Plasmodium falciparum* mono-infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 9, p. 4237-41, 2004. doi: 10.1128/JCM.42.9.4237-4241.2004

JAIN, P. et al. Potential Biomarkers and Their Applications for Rapid and Reliable Detection of Malaria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-20, 2014. doi: 10.1155/2014/852645

KITCHEN, A. D.; CHIODINI, P. L. Malaria and blood transfusion. **Vox Sanguinis**, v. 90, n. 2, p. 77-84. 2006. doi: 10.1111/j.1423-0410.2006.00733.x.

KOITA, O. A. et al. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 194-198, 2012. doi: 10.4269/ajtmh.2012.10-0665

KUMAR, N. et al. Genetic deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 119-121, 2013. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.09.015

LEE, S. et al. A highly sensitive aptasensor towards *Plasmodium* lactate dehydrogenase for the diagnosis of malaria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, n. 1, p. 291-296, 2012. doi: 10.1016/j.bios.2012.03.003

LIPMAN, N. S. et al. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 258-268, 2005. doi: 10.1093/ilar.46.3.258

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. **Journal of Visualized Experiments**, n. 63, p. 3998, 2012. doi: 10.3791/3998

MANGOLD et al. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2435-2440, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.5.2435

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 66-78, 2002. doi: 10.1128/CMR.15.1.66-78.2002

MULAY, H. D. et al. New Methylene Blue Stain for Malaria Detection on Thin Smears. **Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University**, v. 6, n. 1, p. 76-81, 2017.

MURPHY, S. C. et al. Malaria diagnostics in clinical trials. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 5, p. 824-39, 2013. doi: 10.4269/ajtmh.12-0675

MURPHY, S. C. et al. Real-time quantitative reverse transcription PCR for monitoring of



blood-stage *Plasmodium falciparum* infections in malaria human challenge trials.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 86, n. 3, p. 383–394, 2012. doi: 10.4269/ajtmh.2012.10-0658

PATEL, J. C. et al. Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (RealAmp) for the Species-Specific Identification of *Plasmodium vivax*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54986, 22 jan. 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0054986

PERANDIN, F. et al. Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1214–1219, 2004. doi: 10.1128/JCM.42.3.1214-1219.2004

POINSIGNON, A. et al. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. **PLoS one**, v. 3, n. 6, p. e2472, 25 jun. 2008. doi: 10.1371/journal.pone.0002472

POLLEY, S. D. et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 4, p. 637–644, 2013. doi: 10.1093/infdis/jit183

PREUSS, J.; JORTZIK, E.; BECKER, K. Glucose-6-phosphate metabolism in *Plasmodium falciparum*. **IUBMB Life**, v. 64, n. 7, p. 603-11, 2012. doi: 10.1002/iub.1047.

PROUX, S. et al. Considerations on the use of nucleic acid-based amplification for malaria parasite detection. **Malaria**

Journal, v. 10, n. 1, p. 323, 2011. doi: 10.1186/1475-2875-10-323

SINGH, B.; DANESHVAR, C. Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 165–184, 2013. doi: 10.1128/CMR.00079-12

SINGH, R. et al. Rapid detection of *Plasmodium vivax* in saliva and blood using loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Journal of Infection**, v. 67 n. 3 p. 245-7, 2013 doi: 10.1016/j.jinf.2013.04.016

SINGH, S. K. et al. Definition of structural elements in *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* Duffy-binding domains necessary for erythrocyte invasion. **The Biochemical journal**, v. 374, n. 1, p. 193–8, 2003. doi: 10.1042/BJ20030622

WALLQVIST, A. et al. Metabolic host responses to malarial infection during the intraerythrocytic developmental cycle. **BMC systems biology**, v. 10, n. 1, p. 58, 2016. doi: 10.1186/s12918-016-0291-2

WEISS, G. E. et al. The *Plasmodium falciparum*-specific human memory B cell compartment expands gradually with repeated malaria infections. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. 1–13, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1000912

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Malaria Report**. Geneva, 2011.

YOON, J. Y. Introduction to biosensors: From electric circuits to immunosensors. New York. 1ª Ed. **Springer**, 2013. 262 p. doi: 10.1007/978-1-4419-6022-1