

DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES ASSINTOMÁTICAS POR *PLASMODIUM*: EXPLORANDO O PAPEL DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS COMO RESERVATÓRIO NA MANUTENÇÃO DO CICLO DA DOENÇA

Challenges in Diagnosing Asymptomatic Plasmodium Infections: Exploring the Role of Asymptomatic Carriers as a Reservoir in Maintaining the Disease Cycle

Kathlen Renata de Freitas de Santana¹

Natalie Ribeiro Rangel Coutinho¹

Jonathan Luís Magalhães Fontes²

Resumo

A malária assintomática (infecção silenciosa por *Plasmodium*) ainda apresenta muitos desafios diagnósticos. Diante desse problema, este artigo de revisão possui os objetivos de explicar como portadores assintomáticos da infecção servem como reservatório da doença colaborando para a manutenção de seu ciclo, a atuação do sistema imunológico e os testes diagnósticos existentes, bem como suas limitações. Foi realizada uma análise de informações obtidas nos últimos 20 anos, tendo como ferramentas de busca: Biblioteca Virtual em Saúde, U.S. National Library of Medicine, PubMed Central (PMC) e Scientific Electronic Library Online. Após essa análise foi possível compreender como a malária assintomática ocorre e contribui para a persistência do *Plasmodium* em áreas endêmicas, um dos maiores desafios na erradicação da doença no Brasil e nos demais países com casos autóctones, além de identificar as limitações existentes em todos os métodos atualmente utilizados para o diagnóstico e controle de infectados.

Palavras-chave: Malária. Assintomática. Diagnóstico. Imunologia. *Plasmodium*.

¹Dicente do Centro Universitário Jorge Amado - Unijorge

²Docente do Centro Universitário Jorge Amado – Unijorge

Autor correspondente:

Jonathan Luís Magalhães Fontes

Docente do Centro Universitário Jorge Amado – Unijorge, Salvador, Bahia, Brasil

Contato: jfontes01@unijorge.pro.br

Introdução

A malária é uma infecção parasitária causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, e a principal forma de transmissão para o ser humano ocorre por meio da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles* infectados (OMS, 2023). O quadro clínico tende a surgir de 7 a 15 dias após a infecção e é caracterizado principalmente por febre alta, cefaleia, calafrios, e em casos mais graves, hematúria, aumento do baço, taquicardia, convulsões e até óbito (Brasil, 2013).

Apesar de ser uma doença que dispõe de tratamento, a malária continua sendo um grande problema de saúde pública. Isso porque, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2023), em 2022 foram registrados 249 milhões de casos de malária no mundo, especialmente no continente africano e nos países da América do Sul. No mesmo ano, o Brasil registrou 131.224 casos de malária, sendo que aproximadamente 84% deles ocorreram no norte do país, especificamente nas áreas rurais e terras indígenas dos estados pertencentes à região amazônica (Brasil, 2024). Essa alta taxa de casos pode ser justificada devido às condições demográficas da área endêmica, e pelas mudanças climáticas e ambientais que levam a criação de um ambiente adequado para o desenvolvimento dos transmissores e agentes causais da malária, propiciando a multiplicação do mosquito e favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão da doença (Brasil, 2009).

Existem cinco espécies que são capazes de causar malária em humanos: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* e recentemente o *P. knowlesi* (parasita de primatas que tem sido registrado em casos humanos no Sudeste Asiático) (Talapko *et al.*, 2019). No Brasil, apenas três dessas espécies apresentam importância clínica e epidemiológica, que são: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, sendo a *P. vivax* a espécie predominante no Brasil, e a *P. falciparum* a que representa maior ameaça clínica. Isso ocorre devido à rápida multiplicação do parasita na corrente sanguínea, destruindo grandes quantidades de hemácias e provocando um quadro de anemia grave, além de quadros de insuficiência renal aguda, embolias e, em situações mais graves a malária cerebral, responsável por cerca de 80% dos casos letais da doença (Brasil, 2013).

O início do ciclo biológico do parasito no ser humano ocorre de forma semelhante entre os tipos de *Plasmodium*, porém, existem algumas variações nas apresentações clínicas da doença a depender da espécie envolvida, podendo levar a graves complicações. No entanto, algumas pessoas infectadas não apresentam sintomatologia, sendo um grande desafio para o diagnóstico e o controle da malária. Pessoas assintomáticas apresentam baixa parasitemia, e os exames convencionais, por possuírem alto limiar de detecção, não são suficientes para o diagnóstico, exigindo testes específicos como PCR para a identificação (Cheaveau *et al.*, 2019). Além disso, indivíduos com malária assintomática servem como reservatório para propagação da doença, uma vez que, por não apresentarem sintomas, não buscam atendimento médico, permanecendo infectados e favorecendo a transmissão do agente (Mendonça; Barral-Netto, 2015).

Devido ao caráter importante que os indivíduos assintomáticos assumem no ciclo de transmissão, é de extrema importância a realização do diagnóstico precoce e do tratamento eficaz, visando interromper o ciclo do parasito no ser humano e evitar que a infecção evolua para possíveis óbitos. Dessa forma, este estudo busca revisar quais são as maiores dificuldades encontradas no diagnóstico da malária, sobretudo em pessoas assintomáticas, e esclarecer como as infecções assintomáticas servem de reservatório para a manutenção do ciclo da doença.

Métodos

Neste estudo foi realizada uma revisão da literatura do tipo integrativa para reunir, sintetizar e analisar informações a partir da integração de diferentes pesquisas sobre o diagnóstico da malária. As bases de dados utilizadas para seleção dos artigos científicos foram a Biblioteca Virtual em Saúde, *U.S. National Library of Medicine* (PubMed), PubMed Central e *Scientific Electronic Library Online*, delimitada a um período de buscas de 20 anos (2004 a 2024).

Para fazer o levantamento dos artigos científicos foram utilizados operadores booleanos com as respectivas palavras chaves ((Malária) AND (*diagnostic*)) AND *asymptomatic*, além de descritores em ciências da saúde como o MeSH (*Medical Subject Headings*) usados para indexação de documentos nas principais bases de dados bibliográficos como o Pubmed. Foram selecionados artigos da língua inglesa e portuguesa para compor a revisão da literatura.

Assim, foram selecionados 41 artigos que tiveram como critérios de inclusão estudos que abordassem os métodos de diagnóstico disponíveis da malária, bem como as principais dificuldades encontradas, além de detalhar a relação entre os pacientes portadores da malária assintomática e como atuam de reservatório para propagação da doença. A exclusão por sua vez se baseou nos artigos que não se enquadraram dentro do período de buscas estabelecido e que não possuíam ligação com o tema proposto.

Resultados

Malária assintomática

A Malária assintomática é caracterizada pela presença do *Plasmodium* no organismo de indivíduos sem a presença de sintomas clínicos, e representa um papel importante na manutenção do ciclo da doença pois atua como reservatório para a transmissão do parasito. Tendo em vista que existem diferentes formas de expressão da doença, os estudos sobre a malária assintomática são de grande valia pois atuam na busca de soluções para garantir o controle e a erradicação da malária no mundo (Hamaiza *et al.*, 2014).

Em zonas com altas taxas de transmissão, indivíduos podem adquirir imunidade parcial contra a malária, resultando em baixa parasitemia, porém, pacientes frequentemente expostos aos parasitas tendem a desenvolver uma memória imunológica que apesar da quantidade circulante, suprime os sintomas clínicos da doença. Desta maneira, nestas regiões, pessoas idosas são mais susceptíveis à malária assintomática, devido às chances de terem maior tempo de exposição ao *Plasmodium* e ao vetor (Andrade *et al.*, 2009).

O diagnóstico em pessoas assintomáticas tende a ser mais difícil em decorrência da resposta imune que suprime o aumento exacerbado de parasitas, ocasionando uma baixa carga parasitária, ou até infecção submicroscópica onde os gametócitos presentes no indivíduo não podem ser detectados em microscopia óptica comum, o que inviabiliza o acesso ao tratamento antiparasitário, tornando o indivíduo um importante reservatório de parasitas por um tempo longo e indefinido (Lin; Saunders; Meshnick, 2014).

Deste modo o vetor pode se infectar ao decorrer do tempo, mesmo que a taxa de indivíduos infectados conhecidos esteja sendo monitorada e os pacientes sintomáticos sejam tratados, fazendo com que as curvas de transmissão estejam sempre em desenvolvimento, acometendo a população ao longo dos meses, acontecendo assim a manutenção da malária (Bousema *et al.*, 2004)

Estudos revelam que a infectividade de mosquitos está diretamente ligada à quantidade de gametócitos presentes no hospedeiro humano, em contrapartida, níveis submicroscópicos de infecção em

portadores assintomáticos também se mostraram infecciosos, transmitindo o gametócito para o mosquito (Schneider *et al.*, 2007), demonstrando que a qualidade do gametócito tende a ser mais importante que a quantidade no quesito infecciosidade (Paul *et al.*, 2007). Seguindo essa linha de pesquisa um grupo consultivo da Agenda de Pesquisa para a Erradicação da Malária evidenciou que por menor que seja a densidade parasitária do indivíduo, ele continua sendo em risco ações que visam erradicar a malária no mundo, pois segue sendo um potencial transmissor (Maiera, 2011).

Aspectos imunológicos dos pacientes assintomáticos

Durante a infecção pelo *Plasmodium*, a resposta imune inata desempenha papel importante através da ação de macrófagos que fagocitam os parasitos e células infectadas, bem como liberam TNF- α , IL-1 e IL-6, citocinas pró-inflamatórias que ajudam a modular a resposta imune adaptativa e controlar a replicação parasitária (Gowda; Wu, 2018). Os neutrófilos também participam, pois matam os parasitos por fagocitose e pela liberação de espécies reativas de oxigênio (Graham; Allen; Read, 2005). Já a ativação do sistema complemento, resulta na opsonização do *Plasmodium* facilitando a fagocitose, e na formação do complexo de ataque à membrana, que pode lisar células infectadas (Kurtovic *et al.*, 2020). Além disso, proteínas como a hemopexina e a haptoglobina se ligam ao heme e à hemoglobina livre, respectivamente, limitando os danos causados pela hemólise induzida pelo parasito (Cunnington *et al.*, 2012).

A imunidade adaptativa é específica e se desenvolve após a exposição inicial ao antígeno. Os linfócitos T CD4+ reconhecem o *Plasmodium* apresentado pelas células apresentadoras de antígeno através do complexo principal de histocompatibilidade classe II e secretam citocinas que auxiliam na ativação e proliferação de outras células do sistema imune. Já as células T CD8+ reconhecem antígenos associados ao MHC I e são capazes de destruir diretamente as células infectadas pelo parasito (Kurup; Butler; Harty, 2019).

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos específicos que podem neutralizar os parasitos, impedindo a invasão em células hospedeiras e promovendo a opsonização (Fowkes *et al.*, 2010). A produção destes anticorpos é essencial para a imunidade a longo prazo e para a proteção contra reinfecções, mas anticorpos contra a proteína do circunsporozoíto, por exemplo, são particularmente importantes na prevenção da infecção hepática inicial (Ngulube, 2023). Ademais, células B de memória e células T de memória são mantidas após a infecção inicial e respondem mais rapidamente e eficazmente em exposições subsequentes ao *Plasmodium*, tornando a memória imunológica uma característica crucial da imunidade adquirida.

A resposta imune nos casos assintomáticos pode ser dividida em três principais categorias, sendo elas a imunidade anti doença, imunidade antiparasitária e pré-munição (Doolan; Dobaño; Baird, 2009). A imunidade anti doença, mesmo quando a densidade parasitária é significativa, confere proteção contra os sintomas clínicos da malária. Este tipo de imunidade afeta o risco e a extensão da morbidade associada a uma determinada carga parasitária no sangue. Indivíduos que desenvolvem essa imunidade podem tolerar altos níveis de parasitas sem manifestar os sintomas típicos da malária, como febre, anemia e mal-estar (Ademolue *et al.*, 2017). Esta resposta imune é mediada por uma combinação de mecanismos inatos e adaptativos, incluindo a produção de citocinas anti-inflamatórias e a regulação da resposta inflamatória para minimizar danos teciduais (Frimpong *et al.*, 2020).

A imunidade antiparasitária tende a reduzir o nível de parasitos circulantes, desenvolvendo proteção contra a parasitemia. Neste tipo de imunidade a ação de células T citotóxicas (CD8+) destroem células hepáticas infectadas (KURUP; BUTLER; HARTY, 2019), a produção de anticorpos específicos neutraliza os

antígenos e promove a fagocitose, e ativa o sistema complemento, limitando a replicação do *Plasmodium* e impedindo a progressão da infecção (Rathnayake; Aitken; Rogerson, 2021). Como resultado, observa-se uma resposta imune mais robusta e eficiente, a eficácia da imunidade antiparasitária normalmente é modulada pela exposição repetida ao parasito.

Já a pré-munição é um estado de equilíbrio imunológico alcançado quando o sistema imune controla a multiplicação dos parasitos sem eliminá-los completamente, evitando desta maneira a manifestação de sintomas clínicos. Sendo então uma manutenção de parasitemia de baixo grau e geralmente assintomática, ela proporciona proteção contra novas infecções. Este tipo de imunidade se dá após repetidas infecções por *Plasmodium*, permitindo que o sistema imunológico reconheça e responda rapidamente contra novas exposições. A pré-munição é mediada por uma combinação de células T e B de memória e anticorpos específicos contra diferentes estágios do ciclo de vida do parasito (Lauvau; Soudja, 2015). Portanto desempenha um papel importantíssimo na epidemiologia da malária em áreas endêmicas, onde a exposição frequente ao *Plasmodium* é comum, levando ao desenvolvimento de uma imunidade parcial que protege os indivíduos contra formas graves da doença, mas permite a persistência de infecções de baixo nível.

Estratégias diagnósticas

O diagnóstico precoce da malária é de extrema importância, pois possibilita o tratamento adequado, evitando a progressão da doença. Devido às características clínicas serem inespecíficas e semelhantes a outras patologias, a OMS recomenda que todos os pacientes realizem testes laboratoriais específicos para confirmação da doença (Mathison; Pritt, 2017). No cenário atual, os métodos mais utilizados para diagnosticar infecções pelo *Plasmodium* são a microscopia óptica, os testes de diagnóstico rápido (RDTs), e os testes moleculares que incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR), e mais recentemente, a amplificação isotérmica mediada por loop (Lamp). A escolha do método de diagnóstico da malária leva em consideração fatores como, o cenário geográfico, a disponibilidade de recursos, a infraestrutura laboratorial, o nível de experiência e capacitação dos profissionais, a epidemiologia da doença na região, o quadro clínico do paciente, e os custos da realização de cada teste (Oyegoke *et al.*, 2022).

A microscopia óptica quando realizada de forma correta, é considerada o padrão ouro para diagnosticar indivíduos infectados pelo *Plasmodium*, por apresentar vantagens como baixo custo, praticidade na realização do exame, alta sensibilidade e especificidade, capacidade de quantificar a intensidade do parasitismo, além de informar precisamente qual a espécie de *Plasmodium* envolvido (Murphy *et al.*, 2013). A confirmação parasitológica é recomendada em todos os ambientes clínicos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2010 (Fitri *et al.*, 2022) em casos suspeitos de malária com o objetivo de diminuir o excesso de tratamentos que ocorre devido aos sintomas inespecíficos da doença (Maltha *et al.*, 2013).

O exame microscópico pode ser feito através do esfregaço delgado ou espesso, utilizando a coloração de Giemsa ou a técnica de Walker (mistura de azul de metileno e Giemsa) para corar as lâminas. A coloração tinge os componentes do sangue e os parasitas de diferentes cores permitindo a diferenciação precisa entre eles (Tangpukdee *et al.*, 2009). No esfregaço espesso é possível detectar de 10 a 50 parasitas/ μ l, porém isso depende do nível de experiência e capacitação do microscopista responsável pela realização e leitura das lâminas. Normalmente a capacidade de detecção dos esfregaços é limitada a 100 parasitas/ μ l de sangue em ambientes de campo adequado, dificultando a detecção de baixas cargas parasitárias, especialmente em pacientes assintomáticos (Mathison; Pritt, 2017). O procedimento completo para realização do exame leva em torno de 60 minutos e permite processar uma grande quantidade de amostras (Murphy *et al.*, 2013).

A técnica do esfregaço espesso para ser considerada adequada deve conter de uma 1 a 2 gotas de sangue espalhados em uma lâmina formando um retângulo de tamanho e espessura que correspondam aproximadamente 1,2 cm² (Mathison; Pritt, 2017). No momento da coloração da lâmina os eritrócitos serão lisados quando entrarem em contato com uma solução corante hipotônica de azul de metileno passando pelo processo conhecido como desmoglobinização, liberando os estágios intraeritrocitários do protozoário que permanecem dentro das hemácias e deixando os leucócitos e os parasitas, se presentes, em grande parte intactos. Isso aumenta a probabilidade de detectá-los e permite a análise de uma grande quantidade de sangue em apenas uma lâmina. Por outro lado, a lâmina do esfregaço delgado é preparada com um volume menor de sangue, aproximadamente 1µL que será espalhado de forma rápida e uniforme em uma única camada de modo que a espessura diminua gradualmente em direção à borda. Após ser fixada em metanol absoluto e secar, os eritrócitos permanecem intactos e inalterados, o que permite uma análise mais precisa da estrutura parasitária (Mathison; Pritt, 2017). Essa análise adequada revela: Forma (a identificação da forma do parasita é crucial para determinar a espécie de *Plasmodium* e o estágio da infecção), tamanho (parasitas maiores geralmente indicam infecções mais avançadas) e quantidade (a quantidade por campo microscópico permite avaliar o grau da infecção, fator essencial para acompanhamento da resposta ao tratamento) (Fitri *et al.*, 2022). Por conta disso é indicado que tanto as lâminas de sangue espesso quanto as finas sejam preparadas, uma vez que cada uma delas oferece finalidades diferentes.

Os métodos de esfregaço sanguíneo também são usados para avaliar e determinar a densidade parasitária. No esfregaço delgado é possível avaliar a parasitemia contando-se o número de parasitos em relação ao número de leucócitos que encontram-se distribuídos por toda amostra (Fitri *et al.*, 2022). Já no esfregaço delgado a contagem da parasitemia é expressa através da porcentagem de eritrócitos parasitados sobre o total de hemácias $\times 100$ (Mathison; Pritt, 2017). A avaliação do parasitismo é importante pois através dela é possível ter uma estimativa que servirá como um indicador para determinar a gravidade e o prognóstico da doença uma vez que, densidades parasitárias acima de 5% são classificadas como malária grave especialmente no *P. falciparum*. Além disso, avaliar a parasitemia é crucial para monitorar a eficácia do tratamento e precisa ser realizada de forma contínua até a completa eliminação dos parasitas (Fitri *et al.*, 2022).

Apesar das vantagens da microscopia muitos lugares enfrentam dificuldades em realizar o diagnóstico específico da malária através desse método, seja pela escassez dos serviços de saúde, falta de estrutura ou profissionais qualificados. Diante disso, houve a necessidade de desenvolver métodos mais rápidos, práticos, econômicos e precisos que pudessem substituir a microscopia em áreas endêmicas onde seu uso é inviável. Com isso, os testes rápidos (RDTs) surgiram como uma alternativa promissora para o diagnóstico da malária, fornecendo resultados qualitativos e sendo adequados para a detecção de infecções atuais ou recentes em populações endêmicas (Osman *et al.*, 2010)

Os RDTs são testes imunocromatográficos de fluxo lateral que detectam antígenos específicos da malária presentes em amostras de sangue por meio de anticorpos monoclonais fixos em membranas de nitrocelulose. O diagnóstico é feito quando uma gota de sangue é colocada na tira do teste levando a uma interação do anticorpo marcado por corante com o antígeno alvo, dando origem a uma faixa colorida (Fitri *et al.*, 2022) Seu resultado dependerá da ausência ou presença dessa linha visível e estará disponível em até 20 minutos, dependendo do produto obtido (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013).

Atualmente estão disponíveis diversos formatos de RDTs que servem para detectar antígenos de

Plasmodium. Alguns se destinam a identificar alvos específicos, permitindo a diferenciação entre as espécies, enquanto outros baseiam-se na detecção de todos os tipos de *Plasmodium*. Os antígenos específicos utilizados são, proteína 2 rica em histidina (PfHPR2) expressa exclusivamente pelo *P. falciparum*, a lactato desidrogenase plasmodial para *P. falciparum* (Pf-pLDH), e o antígeno pLDH específico para *P. vivax*. Já os antígenos pan-pLDH e aldolase são comuns a todas as espécies de *Plasmodium* humano (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013).

Os RDTs responsáveis por detectar o antígeno PfHPR2 apresentam uma sensibilidade maior em identificar espécies de *P. falciparum* do que o RDT de detecção de Pf-pLDH (95,0% vs. 93,2%). Por outro lado, uma menor especificidade de PfHPR2 em comparação ao Pf-pLDH é relatada (95,2% vs. 98,5%). Essa baixa especificidade pode ser explicada devido a persistência do antígeno PfHPR2 por semanas na circulação sanguínea mesmo após o tratamento da doença, levando ao excesso de resultados falsos positivos. Já os RDTs disponíveis para o diagnóstico de *P. vivax* não apresentaram diferenças significativas na sensibilidade, exceto a aldolase que se mostrou ser um pouco menos sensível que os outros antígenos (80,0–81,4%) (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013).

Embora a sensibilidade e especificidade dos testes rápidos possa mudar em diferentes cenários epidemiológicos, os RDTs apresentam um bom desempenho em diagnosticar infecções por malária, detectando de forma eficaz 100 parasitas por μl de sangue (Fitri *et al.*, 2022), e mantendo uma precisão de aproximadamente 98,2% em comparação com o esfregaço espesso (Faye *et al.*, 2013). Além disso, sua especificidade e sensibilidade, no geral, são consideradas excelentes, correspondendo a 95% e 94,8% respectivamente. Dessa forma, os RDTs são considerados fundamentais no diagnóstico da malária pois fornecem resultados rápidos, precisos, sensíveis e específicos, sendo extremamente úteis em áreas endêmicas, onde o uso da microscopia não é viável (Fitri *et al.*, 2022).

Os métodos de diagnósticos moleculares de amplificação de ácidos nucleicos (NAATS), incluem a reação em cadeia da Polimerase (PCR) e à Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), e se destacam por proporcionarem elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico da malária principalmente em locais de baixa transmissão, devido à capacidade de detectar infecções de baixas cargas parasitárias ao amplificar amostras extremamente pequenas de DNA que normalmente passam despercebidas pelos RDTs e pela microscopia óptica (Sema *et al.*, 2015). O limite de detecção dos NAATS é considerado o mais baixo dentre todos os métodos de diagnósticos da malária disponíveis, sendo capaz de detectar 1–5 parasitas/ μl , sendo altamente eficiente em diagnosticar infecções do tipo assintomáticas (Opoku Afriyie *et al.*, 2023). Além disso, eles têm a capacidade de identificar e quantificar os parasitos e possuem a vantagem de processar as amostras de forma rápida (Ocker *et al.*, 2016).

A amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica que se baseia na amplificação do DNA. Nela utiliza-se o DNA polimerase de *Bacillus Stearothermophilus* e quatro Primers específicos que reconhecem seis sequências genéticas distintas do DNA alvo (Oyegoke *et al.*, 2022). Essa técnica foi criada com o objetivo de ser mais rápida, simples, barata e adaptável ao campo, superando as limitações da PCR e mantendo um alto nível de sensibilidade, especificidade e precisão ao detectar cargas parasitárias abaixo do limite de detecção dos principais métodos de diagnóstico da malária, como a microscopia óptica e os RDTs, detectando cerca de 5 parasitas/ μl de sangue (Sema *et al.*, 2015).

O LAMP é capaz de amplificar o DNA cerca de 10^9 – 10^{10} vezes em um período inferior a uma hora, e a uma temperatura isotérmica que se encontra normalmente em torno de 62–65°C, dispensando o uso do

termociclador. Além disso, é possível monitorar a amplificação do DNA através da visualização a olho nu mediada pelo corante SYBR Green I ou através da utilização de um medidor de turbidez que fornece detecção automatizada permitindo o monitoramento dos resultados em tempo real (Fitri *et al.*, 2022). Por ser um método simples, com alta precisão e que permite o diagnóstico de baixas cargas parasitárias como no caso de pessoas assintomáticas, a utilização do LAMP em áreas endêmicas com poucos recursos financeiros, tem se mostrado ser uma ferramenta de diagnóstico promissora e superior à PCR.

Desafios do diagnóstico em pacientes assintomáticos e limitações das técnicas disponíveis

Atualmente, a microscopia óptica e os testes de diagnóstico rápido (RDTs) são os métodos laboratoriais mais utilizados a nível mundial para detectar e diagnosticar infecções por *Plasmodium*. No entanto, as infecções assintomáticas ainda representam um grande desafio no que se refere ao diagnóstico, uma vez que os métodos tradicionais não possuem sensibilidade suficiente para detectar infecções de baixa densidade parasitária, e os métodos moleculares baseados em PCR que são até 8,6 vezes mais sensíveis que a microscopia convencional, não são utilizados em grande escala devido ao seu custo elevado e complexidade na sua realização, o que o torna inviável em regiões subdesenvolvidas (Silva-nunes *et al.*, 2012).

Pesquisas recentes têm demonstrado que o limite de detecção (LOD) para um esfregaço de sangue espesso em condições de campo varia entre 100 a 500 parasitas/ μ l de sangue, podendo atingir um limite de detecção mais baixo (10 a 50 parasitos/ μ L) quando o exame é feito por profissionais experientes (Mathison; Pritt, 2017). Porém, estudos relataram que infecções de cargas parasitárias abaixo do limiar de detecção de 50 parasitas/ μ l na maioria dos casos se tornavam indetectáveis na microscopia (Fitri *et al.*, 2022). Por esse motivo, sua utilização não é recomendada para o diagnóstico de pacientes assintomáticos, pacientes que possuem infecção por mais de uma espécie de *Plasmodium*, e indivíduos com infecções subpatentes, ou seja, aqueles com infecções sintomáticas ou assintomáticas, mas que testam negativo nos exames de microscopia e nos testes rápidos por não possuírem sensibilidade suficiente para detectar baixas cargas parasitárias (Cheaveau *et al.*, 2019).

Para além dessas questões, a microscopia é um exame bastante trabalhoso que necessita de habilidade técnica no preparo da lâmina e de profissionais capacitados para identificar, quantificar e diferenciar as espécies de *Plasmodium* com precisão (Opoku Afriyie *et al.*, 2023), uma vez que a morfologia do parasita pode mudar devido a lise dos eritrócitos, levando a uma forma diferente do esperado. Para garantir a sensibilidade do teste, um dos critérios mais importantes a serem seguidos é a preparação e coloração das lâminas de forma correta, pois o preparo inadequado irá interferir na leitura e conseqüentemente no resultado do exame (Brasil, 2009).

Um dos principais erros referentes ao manuseio das lâminas que pode afetar os indicadores quantitativos e qualitativos, fazendo com que parasitas em densidades mais baixas não sejam identificados, é a perda de material durante o processo (Murphy *et al.*, 2013). De acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária (2009), uma gota espessa para ser considerada adequada deve conter de 1 cm² a 1,5 cm² de superfície, o que equivale aproximadamente 500 a 800 campos microscópicos, trabalhando com aumento de 700 a 800 vezes. Para isso, o sangue na lâmina precisa estar distribuído de forma correta, e o mais homogêneo possível, de modo que os parasitas estejam dispostos de maneira uniforme em toda amostra sendo possível sua visualização. Além disso, é necessário que o sangue esteja totalmente seco antes de iniciar o processo de coloração, caso contrário no momento que entrar em contato com o reagente pode haver

perda de material (Brasil, 2009).

Outra dificuldade no diagnóstico de pessoas assintomáticas é a leitura das lâminas no esfregaço delgado. Por ter uma quantidade menor de sangue distribuída em uma única camada, é importante que todas as partes da lâmina sejam examinadas, isso porque, os parasitas em estágios mais avançados ficam distribuídos nas bordas e parte final do esfregaço, sendo mais difícil de serem encontrados (Brasil, 2009). Além dessas questões, a microscopia exige um trabalho intensivo de mão de obra, uma fonte de energia elétrica estável e manutenção recorrente dos microscópios, o que pode ser difícil em regiões subdesenvolvidas (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013).

Levando em consideração as limitações que a microscopia oferece, uma boa alternativa para áreas endêmicas com recursos limitados e ausência de profissionais qualificados são os testes rápidos (Opoku Afriyie *et al.*, 2023). Os RDTs são bastante utilizados e se tornaram uma opção viável, uma vez que fornecem resultados mais rápidos em cerca de 20 minutos, são fáceis de executar, não precisam de eletricidade nem profissionais capacitados (Nijhuis *et al.*, 2018), e possuem sensibilidade para diagnosticar infecções por *P. falciparum* maior que 90% para densidades maiores que 100 parasitos por μL quando comparado à gota espessa (Brasil, 2010).

Em geral, os RDTs são conhecidos por possuírem um bom desempenho em diagnosticar infecções por *P. falciparum* e diferenciá-lo das demais espécies (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013). No entanto, os testes rápidos que se baseiam na proteína 2 rica em histidina (HRP2), sintetizada exclusivamente por *P. falciparum* pode ter a precisão comprometida levando a resultados falsos negativos por fatores como, deleções do gene HRP2, e ausência desse mesmo gene em algumas cepas de *P. falciparum* (Opoku Afriyie *et al.*, 2023), além de situações de hiperparasitemia que levam ao efeito prozona (Gillet *et al.*, 2009). Por outro lado, a circulação persistente do antígeno (HRP-2) no sangue por semanas, mesmo após a eliminação do parasita por antimaláricos e a ausência de sintomas clínicos, pode causar um alto número de falsos positivos (Opoku Afriyie *et al.*, 2023). Além disso, as ligações cruzadas entre espécies de *Plasmodium* e antígenos alvo, vistas em *P. falciparum* e *P. vivax*, são outras causas para resultados incorretos. Isso ocorre porque os RDTs não incluem etapas de lavagem, ficando susceptíveis a falsos positivos devido a formação de ligações não específicas (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013).

Outra limitação presente nos RDTs é quanto a detecção dos parasitas em cargas parasitárias muito baixas, como no caso de pessoas assintomáticas. Estudos relataram que a sua sensibilidade é reduzida quando há cargas inferiores a 50 parasitas/ μL , o que significa que indivíduos com cargas abaixo desse limiar de detecção dificilmente serão identificados, tornando o diagnóstico para essas pessoas um desafio (Tambo; Mwinga; Mumbengegwi, 2018)

Além dessas questões, muitos RDTs conseguem identificar uma diferença entre uma infecção por *P. falciparum* é uma infecção por outra espécie, mas não consegue detectar qual delas está presente uma vez que, o antígeno pan-pLDH e aldolase são comuns a todas as espécies humanas de *Plasmodium*. Além disso, o desempenho dos testes rápidos depende de fatores como temperatura, onde alguns kits de RDTs são considerados efetivos até 30°C, o que é facilmente ultrapassado em ambientes tropicais (Maltha; Gillet; Jacobs, 2013). Por fim os RDTs são testes qualitativos, sendo considerados incapazes de fornecer quantificação da intensidade parasitária (Osman *et al.*, 2010). Por esses motivos, os testes rápidos em regiões não endêmicas são recomendados apenas para o diagnóstico preliminar da malária, atuando como uma ferramenta de triagem clínica e sendo necessário o exame complementar de microscopia (Mathison; Pritt, 2017).

Por outro lado, os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) que incluem métodos moleculares como, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e à Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) (Opoku Afriyie *et al.*, 2023), tem se mostrado bastante promissores no diagnóstico da malária, sobretudo em pessoas assintomáticas, onde provaram ser altamente sensíveis e específicos em detectar infecções de baixa densidade parasitária que podem passar despercebidas pelos RDTs (Tambo; Mwinga; Mumbengegwi, 2018).

Apesar das inúmeras vantagens no que diz respeito ao diagnóstico de pessoas assintomáticas, a utilidade da PCR nos laboratórios ainda é bastante limitada, devido ao custo elevado, tempo de resposta longo, necessidade de infraestrutura e mão de obra especializada, além do controle de qualidade e manutenção do equipamento (Mens *et al.*, 2008). Por essas questões, a PCR ainda não é implementada na rotina do diagnóstico da malária em países subdesenvolvidos, com escassez de recursos e complexidade em realizar os testes.

A Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP), por sua vez, busca resolver os problemas da PCR mantendo uma alta sensibilidade e especificidade. Para isso, essa técnica utiliza equipamentos mais simples, o que a torna consequentemente mais barata, além de ser fácil de executar, menos demorada e adaptável a lugares subdesenvolvidos (Sattabongkot *et al.*, 2014). No entanto, os reagentes utilizados precisam estar em armazenamento refrigerado, além de ser necessário mais estudos e ensaios clínicos para validar a precisão e utilidade (Erdman; Kain, 2008).

Considerações finais

Entender as características imunológicas dos pacientes assintomáticos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle e erradicação da malária, uma vez que esses indivíduos podem apresentar proteção contra formas graves da doença, mas contribui para a persistência do parasito em áreas endêmicas. Esses indivíduos representam um desafio significativo para o diagnóstico e tratamento, pois apresentam cargas parasitárias abaixo do limite de detecção e continuam perpetuando a transmissão do *Plasmodium* sem serem detectados. Os métodos de diagnósticos disponíveis como a microscopia óptica, os testes rápidos e os moleculares apresentam limitações que os impedem sua plena efetividade e impactam diretamente na detecção dos casos assintomáticos.

Diante disso, algumas melhorias podem se propostas a fim de gerar soluções para as possíveis limitações apresentadas como a capacitação de técnicos, a manutenção de equipamentos, o uso de fontes alternativas de energia e adaptação dos testes às condições locais. Também é necessário desenvolver reagentes mais estáveis e validar métodos como o LAMP, que pode substituir a PCR em regiões com poucos recursos. Dessa forma, fica evidente que, mediante revisões e atualizações constantes, as técnicas de diagnóstico disponíveis poderão se tornar mais eficazes no controle e na erradicação da malária.

Referências

ABBA, K. *et al.* Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated non-falciparum or *Plasmodium vivax* malaria in endemic countries. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 12, p. CD011431, 18 dez. 2014.

ADEMOLUE, T. W. *et al.* Patterns of inflammatory responses and parasite tolerance vary with malaria transmission intensity. **Malaria Journal**, v. 16, p. 145, 11 abr. 2017.

ANDRADE, B. B. *et al.* Anti-Anopheles darlingi saliva antibodies as marker of *Plasmodium vivax* infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 8, p. 121, 5 jun. 2009.

Apoena Revista Eletrônica, Salvador-Ba,
v. 9, p. 23-35, novembro, 2025

BRASIL. Fundação Oswaldo Cruz. *Malária*, 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/mal%C3%A1ria>. Acesso em: 25 mai. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v. 55, n. 1, Brasília, DF, 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Guia prático de tratamento da malária no Brasil*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de diagnóstico laboratorial da malária*. 2. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009.

BOUSEMA, J. T. *et al.* *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. **Malaria Journal**, v. 3, p. 18, 17 jun. 2004.

CHEAVEAU, J. *et al.* Asymptomatic malaria in the clinical and public health context. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 17, n. 12, p. 997–1010, 2 dez. 2019.

CONSULTATIVE GROUP ON DIAGNOSES AND DIAGNOSTICS (malERA). A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. **PLOS Medicine**, v. 8, n. 1, p. e1000396, 25 jan. 2011.

CUNNINGTON, A. J. *et al.* Prolonged neutrophil dysfunction following *Plasmodium falciparum* malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 11, p. 5336–5346, 1 dez. 2012.

DOOLAN, D. L.; DOBAÑO, C.; BAIRD, J. K. Acquired immunity to malaria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 13–36, jan. 2009.

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

FAYE, B. *et al.* Accuracy of HRP2 RDT (Malaria Antigen P.f®) compared to microscopy and PCR for malaria diagnosis in Senegal. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 5, p. 273–278, jul. 2013.

FITRI, L. E. *et al.* Malaria diagnostic update: from conventional to advanced method. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, n. 4, p. e24314, 4 mar. 2022.

FOWKES, F. J. I. *et al.* The relationship between anti-merozoite antibodies and incidence of *Plasmodium falciparum* malaria: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 7, n. 1, p. e1000218, 19 jan. 2010.

FRIMPONG, A. *et al.* Asymptomatic malaria infection is maintained by a balanced pro- and anti-inflammatory response. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 559255, 17 nov. 2020.

GILLET, P. *et al.* Assessment of the prozone effect in malaria rapid diagnostic tests. **Malaria Journal**, v. 8, p. 271, 30 nov. 2009.

GOWDA, D. C.; WU, X. Parasite recognition and signaling mechanisms in innate immune responses to malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3006, 19 dez. 2018.

HAMAINZA, B. *et al.* Monitoring, characterization and control of chronic, symptomatic malaria infections in rural Zambia through monthly household visits by paid community health workers. **Malaria Journal**, v. 13, p. 128, 31 mar. 2014.

KURTOVIC, L. *et al.* Complement in malaria immunity and vaccines. **Immunological Reviews**, v. 293, n. 1, p. 38–56, jan. 2020.

KURUP, S. P.; BUTLER, N. S.; HARTY, J. T. T cell-mediated immunity to malaria. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 7, p. 457–471, jul. 2019.

LAUVAU, G.; SOUDJA, S. M. Mechanisms of memory T cell activation and effective immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 850, p. 73–80, 2015.

LIN, J. T.; SAUNDERS, D. L.; MESHNICK, S. R. The role of submicroscopic malaria in malaria transmission: what is the evidence? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 183–190, abr. 2014.

MALTHA, J.; GILLET, P.; JACOBS, J. Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 5, p. 399–407, 1 maio 2013.

MATHISON, B. A.; PRITT, B. S. Update on malaria diagnostics and test utilization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2009–2017, jul. 2017.

MENDONÇA, V. R.; BARRAL-NETTO, M. Immunoregulation in human malaria: the challenge of understanding asymptomatic infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 945–955, dez. 2015.

MENS, P. F. *et al.* Molecular diagnosis of malaria in the field: development of a novel 1-step nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of all 4 human *Plasmodium* spp. and its evaluation in Mbita, Kenya. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 61, n. 4, p. 421–427, 1 ago. 2008.

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, 6 nov. 2013.

NGULUBE, P. Humoral immune responses to *P. falciparum* circumsporozoite protein (Pfcsp) induced by the RTS, S vaccine – current update. **Infection and Drug Resistance**, v. 16, p. 2147–2157, 12 abr. 2023.

NIJHUIS, R. H. T. *et al.* Multiplex real-time PCR for diagnosing malaria in a non-endemic setting: a prospective comparison to conventional methods. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, n. 12, p. 2323–2329, 1 dez. 2018.

OCKER, R. *et al.* Malaria diagnosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in Thailand. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, p. 27, 8 abr. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *World malaria report*. Genebra: OMS, 2023.

OPOKU AFRIYIE, S. *et al.* Accuracy of diagnosis among clinical malaria patients: comparing microscopy, RDT and a highly sensitive quantitative PCR looking at the implications for submicroscopic infections. **Malaria Journal**, v. 22, p. 76, 4 mar. 2023.

OSMAN, M. M. M. *et al.* Informed decision-making before changing to RDT: a comparison of microscopy, rapid diagnostic test and molecular techniques for the diagnosis and identification of malaria parasites in Kassala, eastern Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 12, p. 1442–1448, 2010.

OYEGOKE, O. O. *et al.* Malaria diagnostic methods with the elimination goal in view. **Parasitology Research**, v. 121, n. 7, p. 1867–1885, 2022.

PAUL, R. E. L. *et al.* Aggregation in malaria parasites places limits on mosquito infection rates. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 577–586, 1 set. 2007.

RATHNAYAKE, D.; AITKEN, E. H.; ROGERSON, S. J. Beyond binding: the outcomes of antibody-dependent complement activation in human malaria. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 683404, 8 jun. 2021.

SATTABONGKOT, J. *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1471–1477, maio 2014.

SCHNEIDER, P. *et al.* Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 470–474, 2007.

SILVA-NUNES, M. *et al.* Amazonian malaria: asymptomatic human reservoirs, diagnostic challenges, environmentally-driven changes in mosquito vector populations, and the mandate for sustainable control strategies. **Acta Tropica**, v. 121, n. 3, p. 281–291, mar. 2012.

SEMA, M. *et al.* Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia. **Malaria Journal**, v. 14, p. 44, 28 jan. 2015.

TALAPKO, J. *et al.* Malaria: the past and the present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, p. 179, 21 jun. 2019.

TAMBO, M.; MWINGA, M.; MUMBENGEGWI, D. R. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and polymerase chain reaction (PCR) as quality assurance tools for rapid diagnostic test (RDT) malaria diagnosis in Northern Namibia. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0206848, 12 dez. 2018.

TANGPUKDEE, N. *et al.* Malaria diagnosis: a brief review. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. 2, p. 93–102, jun. 2009.