

RENATA TOMÉ ALVES

**UM NOVO PROTOCOLO DE PCR/RFLP PARA A
DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DA CSP DE
Plasmodium vivax (VK210, VK247 e *P. vivax-like*)**

Dissertação apresentada para a
obtenção do Grau de Mestre em
Genética

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-SP, 2007.

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Investigação de Microrganismos, do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infecciosas e Parasitárias, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado e co-orientação da Profa. Dra. Andréa Regina Baptista Rossit, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo n.º. 04/15486-7) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq – Processo n.º. 475524/2004-7).

RENATA TOMÉ ALVES

Otimização do diagnóstico molecular das variantes do *Plasmodium vivax*

Projeto apresentado como requisito parcial para o exame de qualificação ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de São José do Rio Preto para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Ricardo Luiz Dantas Machado

Co-Orientadora: Andréa Regina Baptista Rossit

São José do Rio Preto, SP
Agosto/2006

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	8
1. Complexo vivax	8
2. Distribuição dos genótipos do <i>Plasmodium vivax</i>	10
3. Resistência do <i>Plasmodium vivax</i> aos antimaláricos	11
4. Aspectos do diagnóstico laboratorial de Plasmodio	11
4.1. Métodos para detecção do Plasmodio em hemácias	12
4.2. Métodos para detecção de componentes antigênicos plasmidiais	13
4.3. Métodos para detecção de anticorpos anti-plasmodiais	14
4.4. Métodos para pesquisa do parasito em mosquitos	14
4.5. Métodos moleculares para diagnóstico do parasito da malária	15
4.5.1. Diagnóstico molecular do <i>Plasmodium vivax</i>	16
4.5.2. Diagnóstico molecular dos genótipos do <i>Plasmodium vivax</i>	17
II. OBJETIVOS	21
1. Geral	21
2. Específico	21
III. ARTIGO A new PCR/RFLP protocol for <i>Plasmodium vivax</i> CSP genotypes (VK210, VK247 and <i>P.vivax-like</i>) determination	23
Abstract	23
1. Introduction	24

2. Material and Methods	25
2.1. Samples	25
2.2. Target DNA sequences and, design of synthetic oligonucleotides	26
2.3. PCR standardization	26
2.4. Restriction digests of PCR products	27
2.5. PCR sensitivity threshold	28
2.6. PCR specificity	28
2.7. <i>P. vivax</i> CSP gene amplification control	28
3. Results	28
3.1. Amplification of the <i>P. vivax</i> CSP gene fragment	28
3.2. RFLP analysis	29
4. Discussion	31
Acknowledgments	32
References	33
IV. CONCLUSÕES	38
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	40
VI. RESUMO	53
VII. ABSTRACT	55

VIII. ANEXOS	57
A - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	57
B – Determinação da especificidade de cada oligonucleotídeo iniciador ao gene da CSP	60
C – Análise conformacional dos oligonucleotídeos iniciadores para investigar a possibilidade de formação de estrutura secundária (dimmer-primer)	62
D – Sítios de corte e tamanho dos fragmentos formados pelas enzimas de restrição <i>Alu I</i> e <i>Dpn I</i>	67
E – Confirmação do tamanho dos fragmentos formados pelas enzimas de restrição <i>Alu I</i> e <i>Dpn I</i>	71

I. INTRODUÇÃO GERAL

A malária continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo, afetando cerca de 300 milhões de pessoas nas áreas subtropicais e tropicais, o que resulta em mais de um milhão de mortes a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Das quatro espécies dos parasitos de malária conhecidas, *Plasmodium falciparum* (Pf), *P. vivax* (Pv), *P. malariae* (Pm) e *P. ovale* (Po), somente as três primeiras são encontradas no Brasil (QARI et al., 1993a). Durante os últimos sete anos o Pv tem sido reportado como a espécie de plasmódio responsável por mais de 80,2% dos casos de malária na região Amazônica brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O ciclo de vida do parasito da malária humana é composto por uma fase assexuada endógena (esquizogônica) com multiplicação no hospedeiro vertebrado e uma fase sexuada exógena (esporogônica) com multiplicação em mosquitos. A fase esquizogônica compreende duas etapas: uma que ocorre nas células parenquimatosas do fígado (esquizogonia exo-eritrocítica) e outra que inclui o desenvolvimento do parasito nas hemácias (esquizogonia eritrocítica). A infecção no hospedeiro vertebrado é iniciada pela picada da fêmea do mosquito *Anopheles*, que libera, junto com a saliva, esporozoítos na corrente sanguínea (GILLES & WARRELL, 1993).

1. Complexo vivax

Embora a proteína circunsporozoítica (CSP) seja o principal alvo para desenvolvimento da vacina contra a malária, os dados gerados requerem atenção, já que foram relatadas variações na seqüência repetida de sua porção central (QARI et al., 1993a; GOPINATH et al., 1994). Baseado no gene da CSP, Rosenberg et al. (1989) descreveram uma variante do Pv na Tailândia (VK247), e Qari et al. (1993a) constataram em Papúa

Nova Guiné a presença de um parasito de malária, referido como *P. vivax-like*, morfológicamente semelhante à forma clássica do *Pv* (VK210), mas com a porção repetida da região central da CSP diferente dos dois tipos descritos previamente (figura 1), apresentando diferenças na resposta imunológica. Com a clonagem do gene da CSP da variante VK210 permitiu-se a caracterização de uma sequência de 373 aminoácidos, com uma região central de 19 repetições consecutivas do nonapeptídeo Asp-Arg-Ala-Asp/Ala-Gly-Gln-Pro-Ala-Gly (DRAD/AGQPAG), o que constitui cerca de 49% do total da proteína (ARNOT et al., 1985). O sequenciamento da porção entre as regiões I e II deste gene em amostras de VK247 mostrou uma sequência codificadora para o nonapeptídeo Ala-Asn-Gly-Ala-Gly-Asn-Gln-Pro-Gly (ANGAGNPQPG), idêntico apenas em três aminoácidos da sequência do VK210 (ROSENBERG et al., 1989). O gene da CSP da variante *P. vivax-like* apresentou 1182 pares de base com 16 cópias da sequência repetida de 11-mer, codificadora para APGANQ(E/G)GGAA (QARI et al., 1993b).

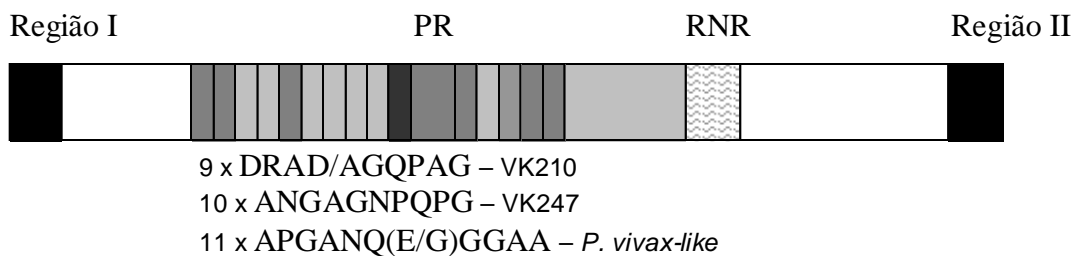


Figura 1: Estrutura da região central do gene da proteína circunsporozoítica (CSP) do *Plasmodium vivax*, de acordo com Qari et al., 1993a. Região I: porção codificadora da região N-terminal, PR: porção repetida; RNR: porção não-repetida e Região II: porção codificadora da região C-terminal.

2. Distribuição dos genótipos da CSP do *Plasmodium vivax*

Muitos estudos foram conduzidos para avaliar a ocorrência global das variantes do *Pv*, onde o genótipo VK247 foi detectado em áreas endêmicas da Tailândia (WIRTZ et al., 1990; KAIN et al., 1992, 1993a, 1993b), na América do Sul, África (KAIN et al., 1991; GONZALEZ et al., 2001), México e Afeganistão (KAIN et al., 1992; RODRIGUEZ et al., 2000). Já a variante *P. vivax-like* mostrou-se também presente em amostras de sangue oriundas de outras regiões de Papua Nova Guiné, da Indonésia e de Madagascar (QARI et al., 1991, 1993b). Gonzales-Ceron et al. (1999) observaram, em áreas de malária do México, a susceptibilidade de infecção dos mosquitos das espécies *Anopheles albimanus* e *Anopheles pseudopunctipennis* aos genótipos VK210 e VK247, respectivamente.

No Brasil, vários trabalhos têm demonstrado a ampla circulação das variantes do *Pv*. Estudos sorológicos detectaram anticorpos para essas variantes em amostras de São Paulo (CURADO et al., 1995) e de comunidades indígenas da Amazônia brasileira (ARRUDA et al., 1996a, 1996b). Recentemente, foi confirmada a presença de anticorpos para as CSP expressas por esses genótipos em indivíduos provenientes de Candeia do Jamari no Estado de Rondônia, bem como a associação entre o alelo DRB1-16 do HLA de classe II e a presença de anticorpos para a VK247, e entre o alelo DRB1 -07 e a ausência de anticorpos para a VK210 (OLIVEIRA-FERREIRA et al., 2004). A tipagem molecular da CSP de amostras de *Pv* do Estado de Rondônia, Amapá e do Pará confirmam a presença dessas variantes em nosso país e mostram que a VK210 foi encontrada em infecções simples e mistas com as outras duas variantes, enquanto o VK247 e o *P. vivax-like* são detectados apenas em infecções mistas (MACHADO & PÓVOA, 2000; MACHADO et al.,

2003). O tipo VK247 também foi detectado em espécimes de anofelinos oriundas do Estado de São Paulo (BRANQUINHO et al., 1997), do Acre (MARRELLI et al., 1998) e do Pará (SILVA et al., 2006).

3. Resistência do *Plasmodium vivax* aos antimaláricos

Nos últimos trinta anos, a resistência dos parasitos de malária a cloroquina (CQ) tem sido restrita ao *Pf*, e a CQ ainda permanece a droga de escolha para a profilaxia e tratamento de infecções por *Pv* (BALDASSARE et al., 1991). A primeira evidência de que o *Pv* estava desenvolvendo resistência a esta droga foi reportada em Papúa Nova Guiné por Rieckmann et al. (1989). A partir daí, a redução na suscetibilidade a CQ tem sido observada também em amostras das Ilhas Salomão (WHITBY et al., 1989), Papúa Nova Guiné (SCHURRKAMP et al., 1992; MURPHY et al., 1993), Índia (GARG et al., 1995), Ásia (PUKRITTAYAKAMEE et al., 2000) e em Manaus, no Brasil (ALECRIM et al., 1999), embora nenhuma relação tenha sido encontrada entre os genótipos de *Pv* e a negatificação da parasitemia. Estudos realizados por Kain et al. (1993a) sugerem que a resposta à CQ pode variar dependendo do tipo de variante de *Pv*, uma vez que observaram em amostras da Tailândia que infecções simples com o tipo VK210 e mistas com o VK247 levaram um tempo maior para negativar a parasitemia do que infecções que continham apenas a variante VK247. Recentemente, Machado et al. (2003) também verificaram em amostras de Belém, no Estado do Pará, significante correlação entre a negatificação parasitária e os três genótipos de *Pv*.

4. Aspectos do diagnóstico laboratorial de plasmódio

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o diagnóstico rápido e preciso como o primeiro elemento básico de estratégia para o controle da malária, contribuindo dessa

forma, para a redução de sua morbimortalidade (ÁVILA & FERREIRA, 1996; FIGUEIREDO-FILHO et al., 2003).

4.1 Métodos para detecção do plasmódio em hemácias

A detecção e identificação de infecções maláricas têm sido tradicionalmente baseadas na avaliação microscópica por meio da gota espessa (GE) e de esfregaços (GILLES & WARRELL, 1993). A GE é um método satisfatório em relação à sensibilidade e especificidade, permitindo a identificação da espécie e estágio de desenvolvimento do parasito. Embora esse método seja simples e de baixo custo, requer microscopistas bem treinados, além de ser trabalhoso e demorado (ÁVILA & FERREIRA, 1996; FIGUEIREDO-FILHO et al., 2003).

Limitações dessas técnicas estimularam a busca de metodologias alternativas, tais como o *Quantitative Buffy Coat* (QBC[®]). Esta consiste em um capilar com resíduos de laranja de acridina e anticoagulante preenchido por sangue, sendo a separação de hemácias parasitadas das não parasitadas realizada por diferença de densidade (ÁVILA & FERREIRA, 1996). A sensibilidade deste método é cerca de oito vezes maior que os testes microscópicos convencionais, além de apresentar maior reprodutibilidade, facilidade de leitura e rapidez de execução em relação a GE (SPIELMAN et al., 1988; KRISHNA & DESHPANDE, 2003). Apesar das vantagens, o teste tem custo elevado devido à necessidade de equipamentos específicos (ÁVILA & FERREIRA, 1996).

4.2 Métodos para detecção de componentes antigênicos plasmidiais

Um avanço no diagnóstico foi o desenvolvimento de testes imunocromatográficos (ICT) que permitem a rápida detecção de proteínas de plasmódios em hemácias lisadas, por anticorpos específicos com diferentes marcadores (ÁVILA & FERREIRA, 1996). Vários ICTs comerciais foram desenvolvidos para a pesquisa de algumas espécies de *Plasmodium*, fato que tornou o diagnóstico simples, rápido e acurado, principalmente em áreas rurais, em que os testes convencionais não estão disponíveis (MOODY, 2002). Testes comerciais como o ICT-Malaria PvTM e ICT-Malaria Pf, empregados na pesquisa da proteína rica em histidina 2 (HRP2) de *Pv* e de *Pf*, respectivamente, apresentaram maior sensibilidade e especificidade quando comparados aos métodos microscópicos (CHIODINI, 1998; ARAZ et al., 2000). Já o teste ICT Pf/PvTM, utilizado para a detecção de *P. falciparum* e *P. vivax*, apresentou baixa sensibilidade e portanto, necessidade de reavaliação (FIGUEIREDO-FILHO et al., 2003). O teste comercial Optimal[®], utilizado na detecção da proteína lactato desidrogenase de plasmódios (pLDH), demonstrou excelente desempenho no diagnóstico de *Pv* e de *Pf*, sob diferentes condições de estocagem e temperatura, mas não pode detectar amostras de *Pm* (PENHALBEL et al., 2005).

A pesquisa de parasitos de malária em mosquitos pode ser realizada por meio do painel de Antígeno VecTest Malaria (V-MAP). Este teste imunocromatográfico foi avaliado para a pesquisa da CSP de *Pf* e dos genótipos VK210 e VK247 de *Pv* em anofelinos da Tailândia, bem como na identificação da CSP de *Pf* em mosquitos coletados em regiões de Gana, demonstrando ser rápido, fácil, além de oferecer vantagens práticas para os trabalhos em campo (APPAWU et al., 2003; SATTABONGKOT et al., 2004).

4.3 Métodos para detecção de anticorpos anti-plasmodiais

Testes sorológicos para a detecção de anticorpos específicos contra os diferentes estágios e espécies de *Plasmodium* são ferramentas importantes em estudos epidemiológicos, na triagem de doadores em áreas não endêmicas de malária e no diagnóstico de infecções individuais (RODRIGUES et al., 2003). Devido à persistência de anticorpos após a fase aguda, esses métodos não podem distinguir infecções prévias das atuais, fato que torna o diagnóstico limitante (PATSOULA et al., 2003). O teste de Imunofluorescência Indireta (IFI), otimizado por Ferreira & Sanchez em 1988, é considerado como referência no sorodiagnóstico e na soropidemiologia da malária. Já o método de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é utilizado na identificação de proteínas de plasmódio, como por exemplo na pesquisa de anticorpos contra a proteína 1 de superfície de merozoíto (MSP1) (RODRIGUES et al., 2003; LIM et al., 2004) e contra a proteína circunsporozoítica (CSP) de *Pv* (SUH et al., 2004; LIM et al., 2005), bem como na busca de anticorpos anti-gametócitos de *Pf* (MARRELI et al., 1995). A técnica de *Western Blotting* também tem sido utilizada no estudo da resposta imune-humoral na malária e considerada uma importante ferramenta diagnóstica por permitir mensurar, precisamente, padrões de anticorpos (THELU et al., 1991).

4.4 Métodos para pesquisa do parasito em mosquitos

A pesquisa de parasitos da malária em mosquitos é realizada, na maioria das vezes, pelo teste de ELISA, a fim de determinar as taxas de infectividade dos mesmos. Apesar de ser um bom método e muito empregado neste tipo de estudo, já apresentou resultados falso-

positivos (SOMBOON et al., 1993). Na tentativa de obter resultados mais confiáveis, Póvoa et al. (2000) adaptaram o método de PCR-ELISA para a detecção de parasitos de malária humana em mosquitos.

4.5 Métodos moleculares para diagnóstico do parasito da malária

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também tem sido aplicada na detecção e diferenciação das quatro espécies de *Plasmodium* que infectam o homem (SNOUNOU et al., 1993; KIMURA et al., 1997), na determinação dos polimorfismos de genes candidatos a vacinas antimaláricas - como os da MSP-1, MSP-2, GLURP (FERREIRA et al., 1998; MAGESA et al., 2001; VAN HA et al., 2002) - e de genes relacionados com a resistência a drogas antimaláricas (*pfprt* (^{Lys76}Thr), *pfmdr1* (^{Asn86}Tyr, ^{Asn1042}Asp e ^{Asp1246}Tyr)) (PÓVOA et al., 1998; THOMAS et al., 2002).

Atualmente, variações da técnica de PCR têm sido propostas para estes fins. O semi-nested-PCR é empregado para a amplificação de seqüências alvo da subunidade menor 18S do rRNA dos parasitos de malária (KIMURA et al., 1997) e dos genes *p126* (ZALIS et al., 1996) e *GLURP* (ZHU et al., 1998) de *Pf*. O semi-nested-PCR é utilizado para o diagnóstico do *Plasmodium sp* (RUBIO et al., 2002) e para a detecção do *Pv* por meio da região telomérica (GOMEZ et al., 2003). Técnicas como a SSCP-PCR (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples) e RFLP-PCR (Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição) são realizadas para a avaliação do polimorfismo dos genes da MSP1, MSP2, GLURP (OHRT et al., 1999), CSP, EBA-175 e RESA (OHRT et al., 1997). A PCR foi associada ao ELISA (PCR/ELISA) para amplificar

fragmentos do gene 18S do rRNA (LAOBOONCHAI et al., 2001) e a métodos de hibridização em microplaca (MPH-PCR) para a mesma região do DNA do parasito (KIMURA et al., 1995; CHAI et al., 2000). Mais recentemente, Polanco et al. (2002) propuseram o método de PCR em tempo real (rt-PCR) para amplificar a região V8 da subunidade menor 18S do rRNA do *Plasmodium spp* e Abdullah et al. (1996), a PCR-transcriptase reversa para amplificar o fragmento da subunidade menor 18S do rRNA de *Pf*.

4.5.1 Diagnóstico molecular do *Plasmodium vivax*

O *Plasmodium vivax* é a segunda espécie mais prevalente no mundo, afetando mais de 75 milhões de pessoas, a maioria delas da América do Sul e Ásia (IMWONG et al., 2005). O aumento do número de casos de malária por *Pv*, bem como o surgimento de cepas resistentes a drogas antimaláricas, são as principais preocupações para o controle dessa doença. Visto que métodos microscópicos não são suficientemente sensíveis para detectar baixos níveis de parasitemia deste parasito, a PCR tem sido muito empregada em vários estudos para o diagnóstico de *Pv* (CUI et al., 2003). Torres et al. (2006) e Imwong et al. (2005) desenvolveram, respectivamente, PCR utilizando como alvo o gene da cisteína-proteinase e os marcadores genéticos *Pvcs*, *Pvmsp1*, obtendo resultados satisfatórios em ambos os estudos. O diagnóstico molecular por PCR é capaz de detectar infecções mistas previamente não diagnosticadas pelo método microscópico, como infecções simples por *Pv* (ZAKERI et al., 2004). O uso desta tecnologia também pode ser útil na identificação de casos de malária em que os exames microscópicos são negativos, tornando o diagnóstico mais confiável (BLOSSOM et al., 2005). A PCR em tempo real tem sido utilizada na

caracterização e quantificação de infecções mistas por *Pm* e *Pv*, mostrando-se mais sensível que os métodos convencionais e sorológicos (IMIRZALIOGLU et al., 2006).

4.5.2 Diagnóstico molecular dos genótipos do *Plasmodium vivax*

Os genótipos do *Pv* podem ser relacionados a diferenças na intensidade dos sintomas, na resposta ao tratamento e na preferência ao vetor, podendo ainda gerar resistência a drogas e falhas nas medidas de controle (GOPINATH et al., 1994). Por o diagnóstico sorológico não ser capaz de identificar os genótipos da CSP envolvidos numa infecção atual e a semelhança morfológica entre eles impedir sua diferenciação pela GE, a única maneira de identificá-los é por meio do diagnóstico molecular, isto é, por meio da amplificação do gene da CSP.

A primeira metodologia desenvolvida para a caracterização dos três genótipos de *Pv* foi descrita por Qari et al. (1993a). Nessa técnica, o gene da CSP é amplificado por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para as suas regiões terminais e a identificação dos três genótipos é feita por sondas marcadas com radioisótopos, complementares à sequência repetida de cada uma. Os fragmentos hibridizados são visualizados por auto-radiografia. A utilização de sondas marcadas por material radioativo exige um custo elevado para o seu desenvolvimento, além de estrutura laboratorial compatível com a eliminação dos resíduos, características que podem dificultar o emprego desta metodologia.

A fim de também caracterizar as três variantes da CSP, Machado & Póvoa (2000) desenvolveram o método de GFM-PCR-ELISA. Esse consiste na amplificação do gene da

CSP por PCR por meio de oligonucleotídeos específicos para as regiões I e II do gene. Os fragmentos amplificados são hibridizados pelo método não-isotópico de fase líquida, utilizando sondas marcadas com digoxigenina, específicas a cada genótipo. Os produtos de hibridização são revelados pela técnica de ELISA, utilizando fragmento *Fab* anti-digoxigenina, marcado com peroxidase e revelado com solução cromogênica de tetrametilbenzidina. A reação é interrompida com solução de ácido fosfórico e a absorbância é medida a 405 nm em um leitor de microplaca. Apesar da técnica ser sensível e específica, necessita de um longo período para chegar ao diagnóstico final. Além disso, utiliza sondas e anticorpos marcados, o que proporciona um custo elevado para a sua determinação.

Outras metodologias moleculares foram desenvolvidas a fim de caracterizar somente os genótipos VK210 e VK247 de *Pv*. Kain et al. (1992) amplificaram o gene da CSP por PCR genótipo-específico e identificaram as duas variantes por meio de sondas marcadas com radioisótopos, específicas a cada uma. A técnica de nested-PCR foi associada ao RFLP na pesquisa dos mesmos genótipos, em amostras de *Pv* no Iran. Este estudo foi um dos primeiros a relatar, em grande-escala, a diversidade parasitária na Região Mediterrânea Oriental, servindo como base a futuras pesquisas relacionadas à epidemiologia molecular (ZAKERI et al., 2006). Kho et al. (1999) investigaram o polimorfismo do gene da CSP em amostras da Coréia por meio da técnica de PCR-RFLP, que foi desenhada a fim de amplificar as regiões com repetições e pós-repetições do gene. O estudo identificou dois genótipos da CSP (SK-A e SK-B), cujas seqüências são similares

às encontradas na China e no oeste Asiático e, concluiu que o método de PCR-RFLP pode substituir o de seqüenciamento na classificação de genótipos de *Pv*.

O método de PCR-RFLP requer equipamentos básicos e reagentes que são normalmente encontrados num laboratório de biologia molecular em países endêmicos para malária, além de ser um método rápido (TAHAR et al., 1998). Sendo assim, essas vantagens podem favorecer sua aplicação nos laboratórios de referências nas áreas endêmicas e não endêmicas de malária no Brasil. Portanto, uma metodologia com um custo mais acessível proporcionará maiores investigações destas variantes nas regiões intra e extra-Amazônicas.

II. OBJETIVOS

1. Geral:

Melhorar o diagnóstico dos três genótipos da CSP do *Plasmodium vivax*.

2. Específico:

Padronizar e otimizar o diagnóstico por PCR/RFLP dos três genótipos da CSP do *Plasmodium vivax*.

III. ARTIGO

A new PCR/RFLP protocol for *Plasmodium vivax* CSP genotypes (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) determination

Renata Tomé Alves^{a,d}, Marinete Marins Póvoa^b, Ira F. Goldman^c, Carlos Eugênio Cavasini^d, Andréa Regina Baptista Rossit^d, Ricardo Luiz Dantas Machado^{d*}

^a*Universidade Estadual Paulista, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000 São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil*

^b*Instituto Evandro Chagas, MS/SVS, Rodovia BR-316 km 7 s/n - Levilândia - 67030-000 Ananindeua, Pará State, Brazil*

^c*Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, U.S.A*

^d*Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil*

* Corresponding author: Tel/Fax: +55 17 3201 5736

E-mail Address: ricardomachado@famerp.br (R.L.D. Machado)

Abstract

For molecular diagnosis of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) using DNA amplification procedures in the laboratory, choice of rapid and inexpensive identification products of three different genotypes are important prerequisites. We report here the standardization of a new PCR/RFLP for the identification of the three described *P. vivax* circumsporozoite protein (CSP) variants using amplification of the central immunodominant region of *CSP* gene of this protozoan. The simplicity, specificity and sensitivity of the system described here should be important to determine the prevalence and the distribution of infection with these *P. vivax* genotypes in endemic and non-endemic malaria areas, enabling a better understanding their phylogeny.

Keywords: *Plasmodium vivax* genotypes, PCR/RFLP, diagnosis, circumsporozoite protein

1. Introduction

Plasmodium vivax is the second most prevalent malaria parasite affecting more than 75 million people each year (Imwong et al., 2005). The circumsporozoite protein (CSP) of the infective sporozoite is the major target in the development of recombinant malaria vaccines (Qari et al., 1993). Nevertheless, the generated data require attention because of the discovery of sequence variation in the central portion of the *CSP* gene (Gopinath et al., 1994). Rosenberg et al. (1989) described a variant of the *P. vivax* in Thailand (VK247), and Qari et al. (1993) reported in Papua New Guinea the *P. vivax*-like, resembling morphologically the classic form (VK210) and VK247 as well as a distinctive repeated portion of the central region of the *CSP* gene. Another important issue generated by these genotypes existence is the possibility of differential variant-linked response to treatment. The first evidence that *P. vivax* develops resistance to chloroquine (CQ) was reported in Papua New Guinea (Rieckmann et al., 1989) and, later, studies carried out by Kain et al. (1993) suggested that the reply to CQ can vary depending upon the *P. vivax* genotypes. Additionally, Machado et al. (2003) confirmed a significant correlation between the parasite clearance and its three genotypes.

By serological and/or molecular approaches, different authors evaluated the global occurrence of these variants in endemic areas of Thailand (Wirtz et al., 1990; Kain et al., 1992, 1993), of the South America (Arruda et al., 1996; Machado and Póvoa, 2000; Oliveira-Ferreira et al., 2004; Silva et al., 2006), of Africa (Kain et al., 1991; Gonzalez et al., 2001), of Mexico, of Afghanistan (Kain et al., 1992; Rodriguez et al., 2000), of Papua New Guinea, Indonesia and Madagascar (Qari et al., 1991, 1993).

Kain et al. (1992) developed a genotype-specific PCR by means of ^{32}P -end-labeled oligoprobes for the detection of the VK210 and VK247 and Kho et al. in 1999 investigated the polymorphism of the *CSP* gene in isolates from Korea by means of the PCR-RFLP technique. The first methodology developed for the identification of *P. vivax* genotypes was a PCR/hybridization, that also uses radio-labeled oligoprobes, which are cost demanding and time consuming, beyond the necessity of a compatible laboratorial structure with their elimination (Qari et al., 1993). Six years ago, Machado and Póvoa (2000) optimized the GFM-PCR-ELISA method, which needs a long period of execution, beyond the use of initiating biotinylated primers and digoxigenin-labelled probes, raising the cost for its execution. In 2006, a protocol of nested-PCR/RFLP was standardized for the diagnosis of only two of the three genotypes: VK210 and VK247 (Zakeri et al., 2006).

The analysis of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PCR products is a fast and simple technique (Trost et al., 2004), normally found in molecular biology laboratories from endemic countries for malaria, requiring only basic equipment (Tahar et al., 1998). We report here the standardization of a new PCR/RFLP for the identification of the three described *P. vivax CSP* gene variants.

2. Material and Methods

2.1. Samples

For PCR standardization, we used three different plasmids (BlueScript, Stratagene, EUA), one for the characteristic CSP repetitive region of each variant (VK210, VK247 and *P. vivax*-like), 45 frozen plus 10 fresh blood samples collected in different endemic areas

from the Brazilian Amazon region, with a positive *P. vivax* thick blood film (TBF) results. TBFs were examined by independent experienced microscopists who were unaware of each result according to the World Health Organization recommended procedures. Furthermore a molecular *P. vivax* confirmation was performed in all samples accordingly to Kimura et al. (1997). The protocol for this study was reviewed and approved by the Research Board of the Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

2.2. Target DNA sequences and, design of synthetic oligonucleotides

DNA was extracted from blood samples by the phenol-chloroform method (Pena et al., 1991). To amplify the *CSP* gene two sets of forward and reverse primers were designed based on the *CSP* conserved central portion. The *CSP* sequences were available in the GenBank database (VK210 – M11926; VK247 – M69061; *P. vivax-like* – L13724). The sequences tested as primers were: PR1 (5'-TGAAAATAAGCTGAA ACAACCAG-3'), PR2 (5'-GGTTACTACTGCATGGAGTCCAT-3'), PA1 (5'-AAATAAGCTGAAACAACCA-3') and PA2 (5'- TCCACAGGTTACTACTGCATGG-3'). The optimal specificity was achieved using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A conformational analysis was done to investigate the possibility of secondary structure formations (dimmer-primer). All oligonucleotide primers were synthesized by IDT –Integrated DNA Technologies (USA).

2.3. PCR standardization

Different arrangements of sets of oligonucleotide primers were used, varying PCR

mixer concentrations, primer annealing and number of cycles. After optimization, the PR1 and PR2 primers were selected. DNA (1,5 µl) was amplified in a total reaction volume of 25 µl consisting of 1x PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM de MgCl₂, 1.0 µM of each primer, 200 µM dNTPs, 2.5 U ampli-Taq DNA polymerase, betaine 1% and water (ad 25 µl). Twenty-five cycles of amplification were performed on a termocycler (DNA MasterCycler, Eppendorf, USA) after initial desnaturacion of DNA at 94°C for 5 min. Each cycle consisted of desnaturacion step at 93°C for 60s, an annealing step at 41°C for 90s and an extension step at 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min following the last cycle. The PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide.

2.4. Restriction digests of PCR products

The selected enzymes were required to have at least one cleavage site in the amplification of each variant, resulting in DNA fragments that are easily visible in polyacrylamide gel. Restriction digests were set up with 10 µl of PCR product and 1 U of the respective enzyme (*Alu* I and *Dpn* I, Promega, USA), incubated for 1 h at 37°C. Restriction fragments were separated by electrophoresis in 12.5% polyacrylamide gels. The gels were stained with ethidium bromide and analysed with a Gel Doc 2000 illuminator (Bio-Rad, USA).

2.5. *PCR sensitivity threshold*

Three *P. vivax* blood samples from patients with parasitemia ranging from 300 to 12,500 parasites per microliter were utilized. These samples were serially diluted in blood from an uninfected donor to a final level of parasitemia corresponding to 10^{-6} and further processed for PCR amplification. After that, a parasitological evaluation was done in order to compare the sensitivity among the PCR products.

2.6. *PCR specificity*

As a negative control we used blood samples obtained from 20 molecularly diagnosed *P. falciparum* infected patients and from 10 blood donors living in the same areas with negative molecular results to *Plasmodium*.

2.7. *P. vivax CSP gene amplification control*

A single amplification of a *CSP* gene fragment using a set of previously described oligonucleotide primers (AL60 5`- GTC GGA ATT CAT GAA GAA CTT CAT TCT C - 3` and AL61 5`- CAG CGG ATC CTT AAT TGA ATA ATG CTA GG -3`) was performed in all DNA samples (Machado and Póvoa, 2000).

3. Results

3.1 *Amplification of the P. vivax CSP gene fragment*

As shown in Fig. 1, DNA from all samples of *P. vivax* included in this study could

be amplified with the primers PR1 and PR2. PCR products were found to reach 694 bp (VK210), 721 bp (VK247) to 736 bp (*P. vivax-like*) in length, as expected from the BLAST program analysis. No amplification was observed with human DNA alone or with samples containing only *P. falciparum* parasites. The sensitivity of PCR was determined by serial dilutions of *P. vivax* blood samples with known parasitemia. The PCR of the *P. vivax* CSP gene was capable of detecting levels of parasitemia corresponding to 0.0069 parasites per microliter.

3.2. RFLP analysis

To distinguished among the three *P. vivax* genotypes, RFLP using *Alu* I identified fragments of 10, 27, 38, 54, 106 and 135 bp (VK210), and 10, 38 plus 673 bp (VK247), while *P. vivax-like* showed an unique fragment of 726 bp. In respect to RFLP using *Dpn* I we observed fragments with sizes of 27, 42, 54, 81, 108 and 301 bp (VK247), while *P. vivax-like* presented as two fragments (39, 697 bp). The second enzyme has no restriction site to VK210 (Fig. 2). Other fragments below 38 bp, not considered for variant determination, were also formed after the RFLP procedure.

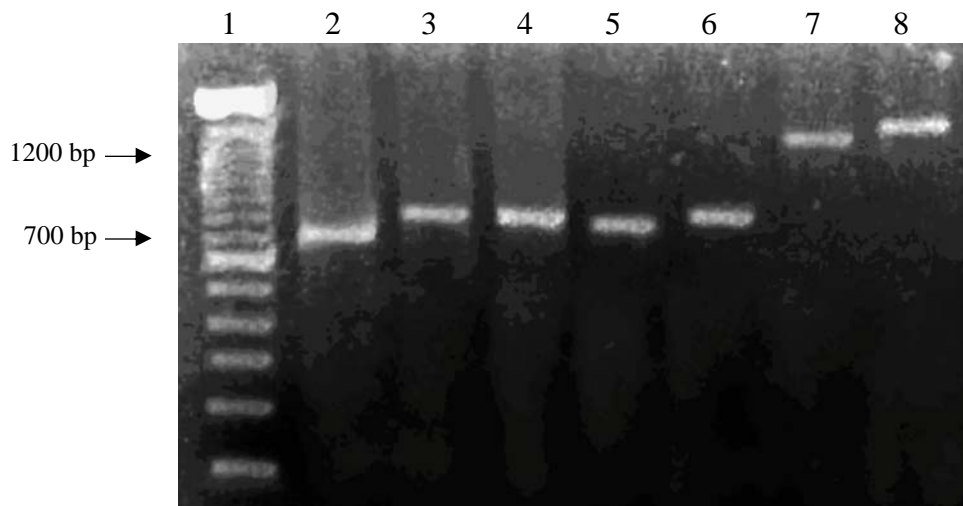


Fig. 1: PCR of the *P. vivax* CSP gene. 1. 100 bp DNA ladder (Invitrogen, EUA); 2. VK210 plasmid; 3. VK247 plasmid; 4. *P. vivax-like* plasmid. 5-6. *P. vivax* DNA blood samples. Samples 2-6 amplified with PR1 and PR2 primers. 7-8. *P. vivax* DNA samples amplified with AL60 and AL 61 (1200 bp). PCR products were resolved by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

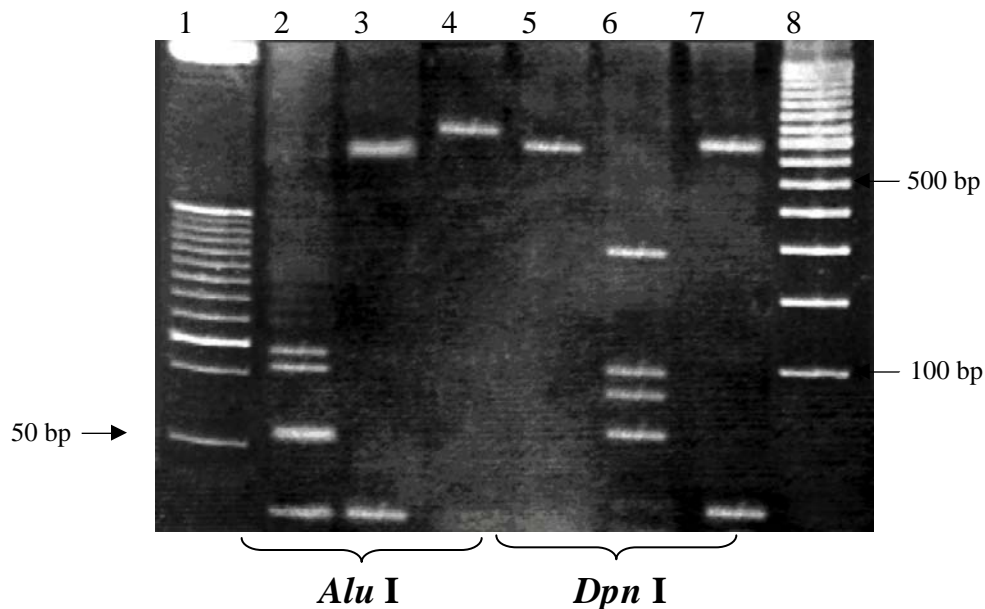


Fig. 2: RFLP patterns of the *P. vivax* CSP gene amplified by PR1 and PR2 primers. 1. 50 bp DNA ladder (Invitrogen, USA); 2 and 5. VK210 plasmid; 3 and 6. VK247 plasmid; 4 and 7. *P. vivax-like* plasmid; 8. 100 bp DNA ladder. RFLP products were resolved by electrophoresis on a 12.5% polyacrilamide gel and stained with ethidium bromide.

4. Discussion

Malaria is one of the most prevalent severe infectious diseases in tropical and subtropical regions worldwide. Since *P. vivax* malaria has been endemic in many countries and its CSP genotypes are found worldwide, its effective diagnosis is very important. Indeed, *P. vivax* malaria variants may have different characteristics in respect to the intensity of symptoms, the response to drugs and vector preference, which could cause drug resistance and failure of control measures (Gopinath et al., 1994).

A new PCR/RFLP system was developed to identify *P. vivax* genotypes. PCR primers were designed to amplify the central immunodominant region of the CSP gene of this protozoan. In our method, PCR primers were optimized in order to achieve easily distinguishable restriction fragments. The choice of restriction enzymes was also influenced by our objective of creating an efficient test with optimal resolution of restriction profiles. Based on the sequence analysis of *P. vivax* variants available in GenBank, the *Alu* I and *Dpn* I endonucleases were found to be the most suitable enzymes for this purpose. *Alu* I showed optimal discriminatory power to distinguish VK210 and *P. vivax-like* but it was not adequate to identify VK247 identification in mixed infections with the *P. vivax-like* variant. We solved this problem by adding a second restriction step of the PCR product using *Dpn* I, thereby unequivocally separating the VK247 and *P. vivax-like* variants.

The high cost and the need for adequate laboratory conditions are the most frequently used arguments against using PCR in developing countries (Torres et al., 2006). However, PCR-based assays have advantages over microscopic tests due to their great capacity to distinguish *P. vivax* genotypes, as all three variants are morphologically similar (Qari et al., 1993). Our method is sensitive and specific to detect *P. vivax* variants in both fresh and frozen samples. A previous PCR/RFLP assay described by Zakeri et al. (2006), can only detect VK210 and VK247, and in

inadequate for complete large-scaled studies. In addition, our methodology saves time and reduces the cost by more than one half of the price of the GFM/PCR/ELISA method developed by Machado and Póvoa (2000). Moreover, it does not use oligonucleotide primers labeled with radioisotopes as described by Qari et al. (1993).

RFLP is more useful in distinguishing *P. vivax* genotypes than classifying them by using the CSP gene sequencing technique (Kho et al., 1999). Finally, the simplicity, specificity and sensitivity of the PCR/RFLP system described here should be sufficient to determine the prevalence and the distribution of infections of these *P. vivax* genotypes in endemic and non-endemic malaria areas enabling a better understanding their phylogeny.

Acknowledgments

To Ana Carolina Silva, Gustavo Capatti, Valéria Fraga and Luciana Moran for help in laboratory work. Financial support was provided by FAPESP (Process 04/15486-7) and CNPq (Process 475524/2004-7). R.T.A. is a Master student from Genetic Program Pos Graduation of the IBILCE/Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho and research studentship from CNPq.

References

Arruda ME, Aragaki C, Gagliardi F, Halle RW (1996) A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 90:135-143.

Gonzales JM, Hurtado S, Arevalo-Herrera M, Herrera S (2001) Variants of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:709-712.

Gopinath R, Wongsrichanalai C, Córdón-Rosales C, Mirabelli L, Kyle D, Kain KC (1994) Failure to detect a *Plasmodium vivax*-like malaria parasite in globally collected blood samples. *J Infect Dis* 170:1630-1633.

Imwong M, Pukrittayakamee S, Gruner AC, Renia L, Letourneur F, Looareesuwan S, White NJ, Snounou G (2005) Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvc5 and Pvmsp1. *Malar J* 27:20.

Kain KC, Keystone J, Franke ED, Lanar DE (1991) Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *J Infect Dis* 164:208-210.

Kain KC, Brown AE, Webster HK, Wirtz RA, Keystone JS, Rodriguez MH, Kinahan J, Rowland, M, Lanar DE (1992) Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. *J Clin Microbiol* 30:1863-1866.

Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballou WR, Webster HK (1993) Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg* 49:478-484.

- Kho WG, Park YH, Chung JY, Kim JP, Hong ST, Lee WJ, Kim TS, Lee JS (1999) Two new genotypes *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein found in the Republic of Korea. Korean J Parasitol 37:265-270.
- Kimura M, Kaneko O, Liu Q, Zhou M, Kawamoto F, Wataya Y, Otani S, Yamaguchi Y, Tanabe K (1997) Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. Parasitol Int 46:91-95.
- Machado RLD, Póvoa MM (2000) Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg 94:377-381.
- Machado RLD, Figueriredo-Filho AF, Calvosa VSP, Figueredo MC, Nascimento JM, Póvoa MM (2003) Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. Braz J Infect Dis 7:175-177.
- Oliveira-Ferreira J, Pratt-Riccio LR, Arruda M, Santos F, Ribeiro CT, Goldberg AC, Banic DM (2004) HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in individuals naturally exposed to malaria. Acta Trop 92:63-69.
- Pena SDJ, Macedo AM, Gontijo NF (1991) DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. Electrophoresis 12:14-52.
- Qari SH, Goldman IF, Povo MM, Oliveira S, Alpers MP, Lal AA (1991) Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. J Biol Chem 266: 16297-16300.

Qari SH, Shi YP, Goldman IF, Udhayakumar V, Alpers MP, Collins WE, Lal AA (1993) Identification of *Plasmodium vivax-like* human malaria parasite. Lancet 341:780-783.

Rieckmann KH, Davis DR, Hutton DC (1989) *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? Lancet 18:1183-1184.

Rodriguez MH, Gonzalez-Ceron L, Hernandez JE, Nettel JA, Villarreal C, Kain KC, Wirtz RA (2000) Different prevalence of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 e VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. Am J Trop Med Hyg 62:122-127.

Rosenberg R, Wirtz RA, Lanar DE, Sattabongkot J, Hall T, Waters AP, Prasittisuk C (1989) Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. Science 245:973-976.

Silva AN, Santos CCB, Lacerda RN, Machado RLD, Wirtz R, Póvoa MM (2006) Comparative Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. Mem Inst Oswaldo Cruz 101:547-550.

Tahar R, De Pecoulas PE, Mazabraud A, Basco LK (1998) *Plasmodium vivax*: rapid detection by polimerase chain reaction and restriction fragment lenght polymorphim of the key mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene associated with pyrimethamine resistance. Exp Parasitol 89:343-346.

Torres KL, Figueiredo DV, Zalis MG, Daniel-Ribeiro CT, Alecrim W, Ferreira-da-Cruz, Mde F (2006) Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. Parasitol Res 98:519-24.

Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O, Possinger K, Gobel UB, Adam T (2004) Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. J Microbiol Methods 56:201-211.

Wirtz RA, Rosenberg R, Sattabongkot J, Webster HK (1990) Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand. Lancet 336:593-595.

Zakeri S, Abouie Mehrizi A, Djadid ND, Snounou G (2006) Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. Am J Trop Med Hyg 11:729-737.

IV. CONCLUSÕES

A simplicidade, especificidade e sensibilidade da técnica de PCR/RFLP descrita neste trabalho são importantes na determinação da prevalência e da distribuição dos genótipos de *P. vivax* em áreas endêmicas e não-endêmicas de malária, contribuindo dessa forma para um melhor entendimento da sua filogenia.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABDULLAH, N. R. et al. Short report: development of a new diagnostic method for *Plasmodium falciparum* infection using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 2, p.162-163, 1996.

ALECRIM, M. G.; ALECRIM, W.; MACEDO, V. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine (R2) and mefloquine (R3) in Brazilian Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 1, p. 67-68, 1999.

APPAWU, M. A. et al. Detection of malaria sporozoites by standard ELISA and VecTest™ dipstick assay in field-collected anopheline mosquitoes from a malaria endemic site in Ghana. **Tropical Medicine & International Health**, v. 8, n. 11, p. 1012-1017, 2003.

ARAZ, E. et al. Performance of a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of vivax malaria in Turkey. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 55-56, 2000.

ARNOT, D. E. et al. Circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax*: Gene cloning and characterization of the immunodominant epitope. **Science**, Washington, v. 230, p. 815-817, 1985.

ARRUDA, M. E. et al. A seroprevalence and descriptive epidemiological study of malaria among Indian tribes of the Amazon basin of Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 2, p. 135-143, 1996a.

ARRUDA, M.; DUTRA, L.; VEIGA, E. A seroepidemiological study on *Plasmodium vivax* in three States of the Amazon Region of Brazil. In: Congresso da Sociedade Brasileira de

Referências Bibliográficas Gerais

Medicina Tropical, 32, Goiânia, 1996. **Resumos...** Goiânia: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 1996b, v.29, p.170.

ÁVILA, S. L.; FERREIRA, A. W. Malaria diagnosis: a review. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 4, p. 431-443, 1996.

BALDASSARE, J. S. et al. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. **Journal of Infections Diseases**, v. 164, p. 222-223, 1991.

BLOSSOM, D. B.; KING, C. H.; ARMITAGE, K. B. Occult *Plasmodium vivax* infection diagnosed by a polymerase chain reaction-based detection system: a case report. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 1, p. 188-190, 2005.

BRANQUINHO, M. S. et al. Infections of *Anopheles (Kertessia) cruzii* by *Plasmodium vivax* and *Plasmodium vivax* variant VK247 in the municipalities of São Vicente and Jujutiba, São Paulo. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 2, n. 3, p.189-193, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gerência Técnica de Malária. Relatório anual – informes estatísticos. Brasília, 2002. Disponível em <<http://www.funasa.gov.br>>. Acesso em: 20 set. 2005.

CHAI, J. Y. et al. A trial for a DNA diagnosis of *Plasmodium vivax* malaria recently reemerging in the Republic of Korea using microtiter plate hybridisation assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 1-2, p. 80-84, 2000.

Referências Bibliográficas Gerais

CHIODINI, P. L. Non-microscopic methods for diagnosis of malaria. **Lancet**, v. 351, n. 9096, p. 80-81, 1998.

CUI, L. et al. The genetic diversity of *Plasmodium vivax* populations. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 220-226, 2003.

CURADO, I. I.; DUARTE, A. M. R. C.; LAL, A. A. Serological investigation of human *Plasmodium vivax-like* malaria in several localities in the State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 1, p. 284, 1995. Supplement.

FERREIRA, A. W.; SANCHEZ, M. A. Malária humana: padronização e otimização de testes sorológicos para diagnóstico individual e inquéritos soropidemiológicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, p. 137-146, 1988.

FERREIRA, M. U. et al. Allelic diversity at the merozoite surface protein-1 (MSP-1) locus in natural *Plasmodium falciparum* populations: a brief overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 5, p. 631-8, 1998.

FIGUEIREDO FILHO, A. F. et al. Performance of an immunochromatography test for *vivax* malaria in the Amazon region, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 390-392, 2003.

GARG, M. et al. Vivax malaria resistant to chloroquine: case reports from Bombay. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 656-657, 1995.

GILLES, H. M.; WARRELL, D. A. (Ed.). **Bruce Chwatt's essential malariology**, 3rd ed. London: Arnold, 1993.

GOMEZ, J. C. et al. Identification of a polymorphic *Plasmodium vivax* microsatellite marker. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 377-379, 2003.

GONZALES, J. M. et al. Variants of the *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein (VK210 and VK247) in Colombian isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 709-712, 2001.

GONZALEZ-CERON, L. et al. Differential susceptibilities of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* to infections with coindigenous *Plasmodium vivax* variants VK210 and VK247 in southern Mexico. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 410-412, 1999.

GOPINATH, R. et al. Failure to detect a *Plasmodium vivax-like* malaria parasite in globally collected blood samples. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 6, p. 1630-1633, 1994.

IMIRZALIOGLU, C. et al. Diagnosis of mixed *Plasmodium malariae* and *P. vivax* infection in a development aid volunteer by examination of bone-marrow specimens by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2307-2310, 2006.

IMWONG, M. et al. Practical PCR genotyping protocols for *Plasmodium vivax* using Pvc6 and PvmSP1. **Malaria Journal**, v. 27, n. 1, p. 20, 2005.

KAIN, K. C. et al. Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine as determined by microscopy and quantitative Polymerase Chain Reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 4, p. 478-484, 1993a.

KAIN, K. C. et al. Detection of *Plasmodium vivax* by Polymerase Chain Reaction in a field study. *Journal of Infections Diseases*, v. 168, p. 1323-1326, 1993b.

KAIN, K. C. et al. Circumsporozoite genotyping of global isolates of *Plasmodium vivax* from dried blood specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1863-1866, 1992.

KAIN, K. C. et al. Global distribution of a variant of the circumsporozoite gene of *Plasmodium vivax*. *Journal of Infections Diseases*, v. 164, p. 208-210, 1991.

KHO, W. G. et al. Two new genotypes *Plasmodium vivax* circumsporozoite protein found in the Republic of Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 37, n. 4, p. 265-270, 1999.

KIMURA, M. et al. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. **Parasitology International**, v. 46, p. 9-95, 1997.

KIMURA, M. et al. Species-specific PCR detection of malaria parasites by microtiter plate hybridisation: clinical study with malaria patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2342-2346, 1995.

KRISHNA, B. V.; DESHPANDE, A. R. Comparison between conventional and QBC methods for diagnosis of malaria. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 517-520, 2003.

Referências Bibliográficas Gerais

LAOBOONCHAI, A. et al. PCR-based ELISA technique for malaria diagnosis of specimens from Thailand. **Tropical Medicine International Health**, v. 6, n. 6, p. 458-462, 2001.

LIM, K. J. et al. Humoral responses against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 can be remembered for more than 30 years in persons exposed to *Plasmodium vivax*. **Parasitology Research**, v. 92, n. 5, p. 384-389, 2004.

LIM, C. S. et al. Seroprevalence to the circumsporozoite protein peptide antigen of *Plasmodium vivax* in Korean children. **Microbiology and Immunology**, v. 49, n. 6, p. 521-527, 2005.

MACHADO, R.L.D. et al. Correlation between *Plasmodium vivax* variants in Belém, Pará State, Brazil and symptoms and clearance of parasitemia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 175-177, 2003.

MACHADO, R. L. D.; PÓVOA, M. M. Distribution of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) in three endemic areas of Amazonian Brazil and their correlation with chloroquine-treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 377-381, 2000.

MAGESA, S. M. et al. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections by using polymerase chain reaction genotyping in a holoendemic area in northeastern Tanzania. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 477-483, 2001.

MARRELLI, M. T. et al. Correlation between positive serology for *Plasmodium vivax*-like/*Plasmodium simiovale* malaria parasites in the human and anopheline populations in

the state of Acre, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 2, p. 149-151, 1998.

MARRELLI, M. T. et al. Detection of anti-Plasmodium falciparum antibodies directed against a repetitive peptide of the gametocyte antigen Pfs2400 in malaria patients in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89, n. 6, p. 593-599, 1995.

MOODY, A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 66-78, 2002.

MURPHY, G. S. et al. Vivax malaria resistant to treatment and prophylaxis with chloroquine. **Lancet**, v. 341, n. 8837, p. 96-100, 1993.

OHRT, C. et al. Distinguishing *Plasmodium falciparum* treatment failures from reinfections by restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction genotyping. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 4, p. 430-437, 1997.

OHRT, C. et al. Determination of failure of treatment of plasmodium falciparum infection by using polymerase chain reaction single-strand conformational polymorphism fingerprinting. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 847-852, 1999.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. et al. HLA class II and antibody responses to circumsporozoite protein repeats of *P. vivax* (VK210, VK247 and *P. vivax-like*) in individuals naturally exposed to malaria. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 63-69, 2004.

PATSOULA, E. et al. A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of Plasmodium vivax and P. falciparum. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 15-21, 2003.

Referências Bibliográficas Gerais

PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; GONTIJO, N. F. DNA bioprints: simple non-isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. **Electrophoresis**, v. 12, p. 14-52, 1991.

PENHALBEL, R. S. et al. Evaluation of an immunochromatography test for malaria diagnosis under different storage conditions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 194-195, 2005.

POLANCO, J. C. et al. *Plasmodium vivax*: parasitemia determination by real-time quantitative PCR in Aotus monkeys. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 131-134, 2002.

PÓVOA, M. M. et al. *Pfmdr1* Asn1042Asp and Asp1246Tyr polymorphisms, thought to be associated with chloroquine resistance, are present in chloroquine-resistant and sensitive brazilian field isolates of *Plasmodium falciparum*. **Experimental Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 64-68, 1998.

PÓVOA, M. M., MACHADO, R. L., SEGURA, M. N., VIANNA, G. M., VASCONCELOS, A. S., CONN, J. E. Infectivity of malaria vector mosquitoes: correlation of positivity between ELISA and PCR-ELISA tests. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 106-107, 2000.

PUKRITTAYAKAMEE, S. et al. Therapeutic responses to different antimalarial drugs in vivax malaria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1680-1685, 2000.

QARI, S. H. et al. Wide distribution of the variant form of the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 25, p. 16297-16300, 1991.

QARI, S. H. et al. Identification of *Plasmodium vivax-like* human malaria parasite. **Lancet**, v. 341, n. 8848, p. 780-783, 1993a.

Referências Bibliográficas Gerais

QARI, S. H. et al. Global occurrence of *Plasmodium vivax-like* human malaria parasite. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 6, p. 1485-1489, 1993b.

RIECKMANN, K. H.; DAVIS, D. R.; HUTTON, D. C. *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine? **Lancet**, v. 18, n. 8673, p. 1183-1184, 1989.

RODRIGUES, M. H. et al. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 39, 2003.

RODRIGUEZ, M. H. et al. Different prevalence of *Plasmodium vivax* phenotypes VK210 e VK247 associated with the distribution of *Anopheles albimanus* and *Anopheles pseudopunctipennis* in Mexico. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 62, n. 1, p. 122-127, 2000.

ROSENBERG, R. et al. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. **Science**, v. 245, p. 973-976, 1989.

RUBIO, J. M. et al. Alternative polymerase chain reaction method to identify *Plasmodium* species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 199-204, 2002.

SATTABONGKOT, J. et al. Evaluation of the VecTest Malaria Antigen Panel assay for the detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* circumsporozoite protein in anopheline mosquitoes in Thailand. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 2, p. 209-214, 2004.

Referências Bibliográficas Gerais

SCHURRKAMP, G. J. et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* in Papua New Guinea. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 2, p. 121-122, 1992.

SILVA, A.N. et al. Susceptibility of *Anopheles aquasalis* and *An. darlingi* to *Plasmodium vivax* VK210 and VK247. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 547-550, 2006.

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

SOMBOON, P. et al. Detection of sporozoites of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* in mosquitoes by ELISA: false positivity associated with bovine and swine blood. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 322-324, 1993.

SPIELMAN, A. et al. Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 39, n. 4, p. 337-342, 1988.

SUH, I. B. et al. Comparison of immunological responses to the various types circumsporozoite proteins of *Plasmodium vivax* in malaria patients of Korea. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 2, p. 119-123, 2004.

TAHAR, R. et al. *Plasmodium vivax*: rapid detection by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the key mutation in dihydrofolate reductase-

Referências Bibliográficas Gerais

thymidylate synthase gene associated with pyrimethamine resistance. **Experimental Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 343-346, 1998.

THELU, J. et al. Development of natural immunity in *Plasmodium falciparum* malaria: study of antibody response by Western immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 510-518, 1991.

THOMAS, S. M. et al. In vitro chloroquine susceptibility and PCR analysis of pfcrt and pfmdr1 polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Senegal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 474-480, 2002.

TORRES, K. L. et al. Standardization of a very specific and sensitive single PCR for detection of *Plasmodium vivax* in low parasitized individuals and its usefulness for screening blood donors. **Parasitology Research**, v. 98, n. 6, p. 519-524, 2006.

TROST, A. et al. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 2, p. 201-211, 2004.

WHITBY, M. et al. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax*. **Lancet**, v. 9, n. 8676, p. 1395-1396, 1989.

WIRTZ, R. A. et al. Prevalence of antibody to heterologous circumsporozoite protein of *Plasmodium vivax* in Thailand. **Lancet**, v. 336, n. 8715, p. 593-595, 1990.

VAN HA, N.; DYK DAO, L.; RABINOVICH, S. A. Use of nested PCR for differential diagnosis of falciparum malaria reinfection and relapse in drug-resistant patients. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 134, n. 4, p. 379-381, 2002.

Referências Bibliográficas Gerais

ZAKERI, S. et al. Circumsporozoite protein gene diversity among temperate and tropical *Plasmodium vivax* isolates from Iran. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 11, n. 5, p. 729-737, 2006.

ZAKERI, S. et al. Molecular evidence of mixed *P. vivax* and *P. falciparum* infections in northern Islamic Republic of Iran. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 10, n. 3, p. 336-342, 2004.

ZALIS, M. G. et al. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. **Parasitology Research**, v. 82, n. 7, p. 612-616, 1996.

ZHU, X. et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by amplification of glutamate-rich protein gene using polymerase chain reaction. **Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 331-334, 1998.

VI. RESUMO

Para o diagnóstico molecular das variantes do *Plasmodium vivax* (VK210, VK247 e *P. vivax-like*), utilizando procedimentos laboratoriais de amplificação do DNA, a escolha de métodos rápidos e de baixo custo são importantes pré-requisitos. Neste trabalho, descrevemos a padronização de um novo protocolo de PCR/RFLP para a identificação das três variantes da CSP de *P. vivax* por meio da amplificação da região central do gene da CSP deste protozoário. A simplicidade, especificidade e sensibilidade dessa técnica podem ser importantes na determinação da prevalência e da distribuição das infecções por essas variantes de *P. vivax* em áreas endêmicas e não endêmicas de malária, proporcionando um melhor entendimento de sua filogenia.

VII. ABSTRACT

For molecular diagnosis of *Plasmodium vivax* variants (VK210, VK247 and *P. vivax*-like) using DNA amplification procedures in the laboratory, choice of rapid and inexpensive identification products of three different genotypes are important prerequisites. We report here the standardization of a new PCR/RFLP for the identification of the three described *P. vivax* circumsporozoite protein (CSP) variants using amplification of the central immunodominant region of *CSP* gene of this protozoan. The simplicity, specificity and sensitivity of the system described here should be important to determine the prevalence and the distribution of infection with these *P. vivax* genotypes in endemic and non-endemic malaria areas, enabling a better understanding their phylogeny.

VIII. ANEXOS

Anexo A - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores ^a

1.1. Oligonucleotídeos iniciadores PR1 (5'- TGAAAATAAGCTGAAACAACCAG -3') e PR2 (5'- GGTTACACTGCATGGAGTCCAT -3')

VK210

CTGCATAAGGCCAAACTCACAAACATCCAAAAAATATACATATATATATTTATATACACGTGTATATATTTAAGCGGCT
 TAAGTTAAGCAAGCAAAACAGCCAAAGGCTAC AAGTGTA AACAGCTTCTGCAC ACACGTATATACCAGAACAAGATG
 AAGA ACTTCATTCTCTFGGCTGTTCTTCCATCCTGTTGGTGGACTTGTCCCCACGCACTGCGGGCACAAATGTAGATCTGT
 CCAAGGCCATAAAATTTAAATGGAGTAAACTTCAATAATGTAGACGCCAGTTC ACTTGGCGCGGCACACGTAGGACAAAGT
 GCTAGCCGAGGCAGAGGACTTGGTGAGAACCAGATGACGAGGAAGGAGATGCTAAAAAAGGATGGAAAGAAA
 GCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAATAAGCTGAAACAACCAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGA
 GCAGATGGACAGCCAGCAGGTGATAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCAGGAGAT
 AGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGA
 GACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCA
 GGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCC
 GCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAG
 CCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGA
 CAGCCAGCAGGAAATGGTGCAGGTGGACAGGCAGCAGGAGGAAACGCAGGAGGAGGACAGGGACAAAATAATGAAGT
 GCGAATGCCCAAAATGAAAAGTCTGTGAAAAGAATACTAGATAAAGTTAGAGCTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATG
 CAGTGTAACTTGTGGAGTGGGTGTAAGAGTCAGAAGAAGAGTTAATGCAGCTAACAAAAACCAGAGGATCTTACTTTGA
 ATGACCTTGAGACTGATGTTGTACAAATGGATAAGTGTGCTGGCATATTAACGTTGTGAGTAATTCATTAGGGCTAGTCA
 TATGTTAGTCTAGCATTATCAATTAAGTAGCTGACATCCATTAATTTTCGGCTCCTCCACGGTGCATATTAAGTGTGTTT
 GTGTTTTGTACATGCACATAAATACTTGCCCGTAGGGACATGATTTTTTTCCCTTTCATGAATGTTCCCTGTTTGCAC
 GTAACGTATGTACGTGCGCGTAAGGCATAGTAAGTAACACCTCTTACACATTATGCGCTTACGCACAATCAGTTGTGCAA
 TTCTAGAAAACACGATATGAGTATTTTTAAACACCTATCGTCCAAAAACA AAAAAAACAGAAAAACAGAAAAACA
 GAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA AAAAAACA
 CCTTTTTGAGTATATTTTTTTTTTTTCGTATGTTATATATATACTGCTTAACGTAGAGA ACTTAAATTTTGAGAATGT
 ATTTTTTTTTAAAGTTAAAAAAGA AACTGGTATTTTTGGGAATTCAAAAAATTTGCAAAATTCAAAAGAGCGGATTA
 ATTTGCGCCGTGGCAACGGGGTGCCTGCGGGAGTCTGTGCA AATGTGGCTTATATCCGGGG

VK247

ATGAAGA ACTTCATTCTCTTGGCTGTTTCTTCCATCCTGTTGGTGGACTTGTTCACGCACTGCGGGCACAAATGTAGATC
 TGTTCAAGGCCATAAATTTAAATGGAGTAGGCTTCAATAATGTAGACGCCAGTTC ACTTGGCGCGGCACACGTAGGACAA
 AGTGTAGCCGAGGCAGAGGACTTGGTGAGAACCAGATGACGAGGAAGGAGATGCTAAAAAAGGATGGAAAG
 AAAGCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAATAAGCTGAAACAACCAGGAGCAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCA
 AATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAGGTAATCAACCAG
 GCAAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAGGTAATCAACCAG
 GAGCAAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAAATGGAGCAGATGATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAGGCAATCA
 CAGGAGCAAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAAATGGAGCAGGTGATC
 AACCAGGAGCAAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAGGCA
 ATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAAATGGGGCAG
 GTAATCAACCAGGAGCAAAATGGAGCAGGTGGACAGGCAGCAGGAGGAAATGCTGCAAAACA AAAAAAGGAGGAGACGCAG
 GAGCAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAATGCCCAAAATGAAAAGTCTGTGATAGAATACCTAGATAAAGTTAG
 AGCTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAAGTGTAACTGTGGAGTGGGTGTAAGAGTCAGAAGAAGTTAATGCAG
 CTAACAAAAACCAGAGGATCTTACTTTGAAATGACCTTGAGACTGATGTTGTACAATGGATAAAGTGTGCTGGCATATTTA
 ACGTTGTGAGTAATTCATTAGGGCTAGTCATATTGTTAGTCTAGCATTATTC AATTAA

P.vivax-like

ATGAAGAACTTCATTCTTTGGCCGTTTCTTCCATCCTGTTGGTGGACTTGTTCACACACTGCGGGCATAATGTAGATC
TCTCCAGGGCCATAAATTTAAATGGAGTAAGCTTCAATAATGTAGACGCCAGTTCACTTGGCGCACGACAGGTAAGACAA
AGTGC TAGCCGAGGCAGAGGACTTGGTGAGAACCACAAAAGACGATGAAAAAGCTGATAAACCAAAAAAAGGACGAA
AAAAAAGTAGAACCAAAAAAGCCACA **TGAAAATAAGCTGAAACAACCAAGTCCAGGAGCAAATCAGGAAGGC GGAGCA**
GCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTG
CAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAG
GCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAG
CCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGCCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAA
ATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
GAGCAG
CAGGAGCAAACCAGGGAGGTGGAGCAG
AGGGAGGTGCAAAAGTCAGCAGGAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAATAAGCCAGATGAAAAGCATGTGAAAAG
AATACC TAGAGAAAATTAGATCTACCGTTGGCACC **GAATGGACTCCATGCAAGTGAACCT**GTGGAAAAGGGTGTAAGAGTT
AGAAGAAAACCTTAGTGCAGGTGACAAAAAACAGATAAGCTTACTCTGAATGACCTTGAGGCAGAAAGTTTGTACAATGGA
TAAGTGCTCTGGCATAATTAACGTTGTGAGTAATTCATTAGGGCTAGTCATATTGTTAGTCCTAGCATTATCAATTA

^a Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados no programa Word.

1.2. Oligonucleotídeos iniciadores PA1 (5'-AAATAAGCTGAAACAACCA-3') e PA2

(5'-TCCACAGGTTACTGTCATGG-3')

VK210:

CTGCATAAGGCAAACTCACAAACATCCAAAAAATATACATATATATATTTATATACACGTGTATATATTATTAAGCGGCT
TAAGTTAAGCAAGCAAAAACAGCCAAAGGCCTACAAAGTGTAACAGCTTCTTGCACACACGTATATACCAGAACAAGATG
AAGAAGTTCATTCTTTGGCTGTTTCTTCCATCCTGTTGGTGGACTTGTTCACACACTGCGGGCACAATGTAGATCTGT
CCAAGGCCATAAATTTAAATGGAGTAAACTTCAATAATGTAGACGCCAGTTCACTTGGCGCGGCACACGTAGGACAAAGT
GCTAGCCGAGGCAGAGGACTTGGTGAGAACCAGATGACGAGGAAGGAGATGCTAAAAAAGGATGGAAAGAAA
GCAGAACCACAAAATCCACGTGAAAATAAGCTGAAACAACCAAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGA
GCAGATGGACAGCCAGCAGGTGATAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCAGGAGAT
AGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGA
GACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCA
GGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCA
GCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAG
CCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGAC
CAGCCAGCAGGAAAATGGTGCAGGTGGACAGGCAGGAGGAAACGACAGGAGGAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGT
GCGAATGCCCAAATGAAAAGTCTGTGAAAGAATACCTAGATAAAGTTAGAGCTACCGTTGGCACC GAATGGACTCCATG
CAGTGTAACTGTGGAGTGGGTGTAAGAGTCAGAAGAAGAGTTAATGCAGCTAACAAAAACAGAGGATCTTACTTTGA
ATGACC TTGAGACTGATGTTGTACAATGGATAAGTGTGCTGGCATAATTAACGTTGTGAGTAATTCATTAGGGCTAGTCA
TATTGTTAGTCCTAGCATTATTCAATTAAGTAGCTGACATCCATATTTTTTGGCGTCCACGGTGCTATATTAAGTGT
GTGTTTTGTACATGCACATAAATACTTGCCTGAGGACATGATTTTTTTTCCCTTTCCTTATGAATGTCCCTGCTGTTTGCAC
GTAACGTATGTACGTGCGCGTAAGGCATAGTAAGTAACACCTTACACATTATGCGCTTACGCACAAATCAGTTGTGCAA
TTCTAGAAAACACGATATGAGTATTTTTAAACACCTATCGTCCAAAAAACAACAAAAAACAGAAAAACAGAAAAACA
GAAAAACAACAAAAACAAAAAACAACAAAAAACAACAAAAACAACAAAAACAACAAAAACAACAAAAACAACAAAAACA
CCTTTTTTGACGTATATTTTTTTTTTTTTTCGTATGTAATATATACTGCTTAACGTAGAGAACTTAAATTTTGAGAAATGT
ATTTTTTTTTACAAGTAAAAAAGAACGGTATTTTTGGGAATTCAAAAATTTGCAAATTCAAAAGAGCGGAGTAA
ATTTGCGCCGTGGCAAACGGGGTGCCTGCGGGAGTCTGCAAAATGTGGCTTATATCCGGGGG

VK247

ATGAAGAACTTCATTCTTTGGCTGTTTCTTCCATCCTGTGGTGACTTGTTCACACACTGCGGGCACAATGTAGATC
 TGTCCAAGGCCATAAAATTTAAATGGAGTAGGCTTCAATAATGTAGACGCCAGTTC ACTTGCGCGGCACACGTAGGACAA
 AGTGCTAGCCGAGGCAGAGGACTTGGTGAGAACCAGATGACGAGGAAGGAGATGCTAAAAAAAAAAGGATGGAAAG
 AAAGCAGAACCAAAAAATCCACGTGAAAA**TAAGCTGAAACAACCA**GGAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCA
 AATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGACGATCAACCAGGA
 GCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAG
 GAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGATGATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAAC
 CAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGATC
 AACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCA
 ATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAG
 GTAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGGACAGGCAGCAGGAGGAAATGCTGCAAAACAAAAAGGCAGGAGACGCAG
 GAGCAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAATGCCCAAATGAAAAGTCTGTGATAGAATACCTAGATAAAGTTAG
 AGCTACCCTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAACTGTGGAGTGGGTGTAAGAGTCAGAAGAAGAGTTAATGCAG
 CTAACAAAAAACAGAGATCTTACTTTGAAATGACCTTGAGACTGATGTTTGTACAATGGATAAGTGTGCTGGCATAATTA
 ACGTTGTGAGTAATTCATTAGGGCTAGTCATATTGTTAGTCTAGCATTATTCAATTA

P.vivax-like

ATGAAGAACTTCATTCTTTGGCCGTTTCTTCCATCCTGTGGTGACTTGTTCACACACTGCGGGCATAATGTAGATC
 TCTCAGGGCCATAAAATTTAAATGGAGTAGGCTTCAATAATGTAGACGCCAGTTC ACTTGCGCGCACGACAGGTAAGACAA
 AGTGCTAGCCGAGGCAGAGGACTTGGTGAGAACCAGGAGATGAAAAAGCTGATAAACCAAAAAAAAAAGGACGAA
 AAAAAAGTAGAACCAAAAAAGCCACATGA**AAATAAGCTGAAACAACCA**AGTCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCAGGAGCA
 GCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTG
 CAAACCAAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAG
 GCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAACCAAGGAAGGTGGAGCAGCAG
 CCCCAGGAGCAAACCAAGGAAGGCAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCAGCAGCAGCCCCAGGAGCAA
 ATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAAGGAAGGTG
 GAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAAGGAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAAGGAGGTGGAGCAGCAGCAC
 CAGGAGCAAACCAAGGAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAAC
 AGGGAGGTGCAAAGTCAGCAGGAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAATAAGCCAGATGAAAAGCATGTGAAAG
 AATACCTAGAGAAAATAGATCTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAACTGTGGAAAGGGTGTAAAGAGTT
 AGAAGAAAACCTTAGTGCAGGTGACAAAAAACAGATAAGCTTACTGTAATGACCTTGAGGCAGAAAGTTTGTACAATGGA
 TAAGTGCTCTGGCATAATTAACGTTGTGAGTAATTCATTAGGGCTAGTCATATTGTTAGTCTAGCATTATTCAATTA

^a Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados no programa Word.

Anexo B - Determinação da especificidade de cada oligonucleotídeo iniciador ao gene da CSP^b

2.1. Teste com PR1

Accession	Organism	Score	E-value
gi 173690093 gb DQ156132.1	Plasmodium vivax strain IndiaI CI...	44.1	0.004
gi 73698083 gb DQ156132.1	Plasmodium vivax strain BrazilI ci...	44.1	0.004
gi 73698081 gb DQ156131.1	Plasmodium vivax strain HondurasII...	44.1	0.004
gi 73698079 gb DQ156130.1	Plasmodium vivax strain NewGuinea ...	44.1	0.004
gi 57015197 gb AY674050.1	Plasmodium vivax CSP gene, partial cd	44.1	0.004
gi 14578280 gb AY003872.1	Plasmodium vivax YAC 1H14, complete s	44.1	0.004
gi 16903151 gb AF436890.1 AF436890	Plasmodium vivax KCSF96-7 ...	44.1	0.004
gi 12004304 gb AF215741.1 AF215741	Plasmodium vivax isolate S...	44.1	0.004
gi 12004302 gb AF215740.1 AF215740	Plasmodium vivax isolate S...	44.1	0.004
gi 6881401 gb S73385.1	CSP=circumsporozoite protein [Plasmodi...	44.1	0.004
gi 13375180 gb AF240459.1 AF240459	Plasmodium vivax circumsporoz	44.1	0.004
gi 12597456 gb AF316583.1 AF316583	Plasmodium vivax strain KN...	44.1	0.004
gi 12597454 gb AF316582.1 AF316582	Plasmodium vivax strain KN...	44.1	0.004
gi 12597452 gb AF316581.1 AF316581	Plasmodium vivax strain KN...	44.1	0.004
gi 12597450 gb AF316580.1 AF316580	Plasmodium vivax strain KN...	44.1	0.004
gi 12597448 gb AF316579.1 AF316579	Plasmodium vivax strain KN...	44.1	0.004
gi 1601661 gb M11926.1 PFACSA	Plasmodium vivax circumsporozoite p	44.1	0.004
gi 1601831 gb M20670.1 PFACSCA	Plasmodium vivax circumsporozoite	44.1	0.004
gi 4828931 gb U08983.1 PVU08983	Plasmodium vivax isolate SOL10...	44.1	0.004
gi 4828911 gb U08982.1 PVU08982	Plasmodium vivax isolate SOL-8...	44.1	0.004
gi 4828891 gb U08981.1 PVU08981	Plasmodium vivax isolate PH-79...	44.1	0.004
gi 4828871 gb U08980.1 PVU08980	Plasmodium vivax isolate PH-46...	44.1	0.004
gi 4828851 gb U08979.1 PVU08979	Plasmodium vivax isolate CH-5 ...	44.1	0.004
gi 4828831 gb U08978.1 PVU08978	Plasmodium vivax isolate CH-4 ...	44.1	0.004
gi 4828811 gb U08977.1 PVU08977	Plasmodium vivax isolate CH-3 ...	44.1	0.004
gi 61652783 gb AY843440.1	Plasmodium vivax isolate Banglades	44.1	0.004
gi 121715874 emb AJ297403.1 PVI297403	Plasmodium vivax partial...	44.1	0.004
gi 1601641 gb U05069.1 PFAC82X	Plasmodium simium circumsporozo...	44.1	0.004

2.2. Teste com PR2

Accession	Organism	Score	E-value
gi 52788770 gb AY632311.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS50 ...	46.1	0.001
gi 52788768 gb AY367301.2	Plasmodium vivax isolate P24 circu...	46.1	0.001
gi 52788766 gb AY443713.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS14 ...	46.1	0.001
gi 52788764 gb AY443712.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS13 ...	46.1	0.001
gi 52788762 gb AY443710.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS11 ...	46.1	0.001
gi 52788760 gb AY443708.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS9 c...	46.1	0.001
gi 52788758 gb AY443705.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS6 c...	46.1	0.001
gi 52788756 gb AY632299.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS38 ...	46.1	0.001
gi 52788754 gb AY632298.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS37 ...	46.1	0.001
gi 52788752 gb AY632296.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS35 ...	46.1	0.001
gi 52788750 gb AY632294.2	Plasmodium vivax isolate CHPVCS33 ...	46.1	0.001
gi 32347261 gb AY216939.1	Plasmodium vivax strain Belem YAC1H14	46.1	0.001
gi 32347260 gb AY216938.1	Plasmodium vivax strain IndiaVII YAC1	46.1	0.001
gi 32347259 gb AY216937.1	Plasmodium vivax strain Salvador I YA	46.1	0.001
gi 32347258 gb AY216936.1	Plasmodium vivax strain Thai-NYU YAC1	46.1	0.001
gi 12005314 gb AF236849.1	Plasmodium vivax isolate SK974601 ...	46.1	0.001
gi 12005312 gb AF236848.1	Plasmodium vivax isolate SK98007 c...	46.1	0.001
gi 12005310 gb AF236847.1	Plasmodium vivax isolate SK98088 c...	46.1	0.001
gi 12005308 gb AF236846.1	Plasmodium vivax isolate SK98001 c...	46.1	0.001
gi 40353724 gb AY443726.1	Plasmodium vivax isolate P27 circu...	46.1	0.001
gi 40353722 gb AY443725.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS26 ...	46.1	0.001
gi 40353720 gb AY443724.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS25 ...	46.1	0.001
gi 40353718 gb AY443723.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS24 ...	46.1	0.001
gi 40353716 gb AY443722.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS23 ...	46.1	0.001
gi 40353712 gb AY443720.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS21 ...	46.1	0.001
gi 40353710 gb AY443719.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS20 ...	46.1	0.001
gi 40353708 gb AY443718.1	Plasmodium vivax isolate CHPVCS19 ...	46.1	0.001

2.3. Teste com PA1

Sequence ID	Description	Score (Bits)	E Value
gi 22003061 emb AJ295636.1 PVI295636	Plasmodium vivax partial CS	38.2	0.12
gi 21733711 emb AJ278612.1 PVI278612	Plasmodium vivax partial...	38.2	0.12
gi 21715879 emb AJ278611.1 PVI278611	Plasmodium vivax partial...	38.2	0.12
gi 22217982 emb AJ292977.1 PVI292977	Plasmodium vivax partial CS	38.2	0.12
gi 16329162 gb AF164608.2 	Plasmodium vivax isolate KCSP96-74...	38.2	0.12
gi 16329158 gb AF164606.2 	Plasmodium vivax isolate KCSP97-75...	38.2	0.12
gi 16329156 gb AF164605.2 	Plasmodium vivax isolate KCSP97-1...	38.2	0.12
gi 16329152 gb AF164603.2 	Plasmodium vivax isolate KCSP96-11...	38.2	0.12
gi 16329154 gb AF164604.2 	Plasmodium vivax isolate KCSP95-50...	38.2	0.12
gi 52788772 gb AY443721.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS22...	38.2	0.12
gi 52788770 gb AY632311.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS50...	38.2	0.12
gi 52788768 gb AY367301.2 	Plasmodium vivax isolate P24 circu...	38.2	0.12
gi 52788766 gb AY443713.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS14...	38.2	0.12
gi 52788764 gb AY443712.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS13...	38.2	0.12
gi 52788762 gb AY443710.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS11...	38.2	0.12
gi 52788760 gb AY443708.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS9 c...	38.2	0.12
gi 52788758 gb AY443705.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS6 c...	38.2	0.12
gi 52788756 gb AY632299.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS38...	38.2	0.12
gi 52788754 gb AY632298.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS37...	38.2	0.12
gi 52788752 gb AY632296.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS35...	38.2	0.12
gi 52788750 gb AY632294.2 	Plasmodium vivax isolate CHPVCS33...	38.2	0.12
gi 32347261 gb AY216939.1 	Plasmodium vivax strain Belem YAC1H14	38.2	0.12
gi 32347260 gb AY216938.1 	Plasmodium vivax strain IndiaVII YAC1	38.2	0.12
gi 32347259 gb AY216937.1 	Plasmodium vivax strain Salvador I YA	38.2	0.12
gi 32347258 gb AY216936.1 	Plasmodium vivax strain Thai-NYU YAC1	38.2	0.12
gi 12005314 gb AF236849.1 	Plasmodium vivax isolate SK974601...	42.1	0.011
gi 12005312 gb AF236848.1 	Plasmodium vivax isolate SK98007 c...	42.1	0.011
gi 12005310 gb AF236847.1 	Plasmodium vivax isolate SK98088 c...	42.1	0.011
gi 12005308 gb AF236846.1 	Plasmodium vivax isolate SK98001 c...	42.1	0.011
gi 160172 gb J02751.1 PFACSAAAD	Plasmodium vivax circumsporozoit...	42.1	0.011
gi 37962866 gb AY327573.1 AY327572S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962861 gb AY327571.1 AY327570S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962856 gb AY327569.1 AY327568S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962851 gb AY327567.1 AY327566S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962846 gb AY327565.1 AY327564S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962841 gb AY327563.1 AY327562S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962836 gb AY327561.1 AY327560S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962831 gb AY327559.1 AY327558S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 73698101 gb DQ156141.1 	Plasmodium vivax strain VietnamVI...	42.1	0.011
gi 73698099 gb DQ156140.1 	Plasmodium vivax strain India(O3-1...	42.1	0.011
gi 73698097 gb DQ156139.1 	Plasmodium vivax strain Korea(O2-2...	42.1	0.011
gi 73698095 gb DQ156138.1 	Plasmodium vivax strain Korea(O2-1...	42.1	0.011
gi 73698093 gb DQ156137.1 	Plasmodium vivax strain Korea(O2-9...	42.1	0.011
gi 73698091 gb DQ156136.1 	Plasmodium vivax strain Colombia c...	42.1	0.011
gi 73698089 gb DQ156135.1 	Plasmodium vivax strain IndonesiaV...	42.1	0.011
gi 73698087 gb DQ156134.1 	Plasmodium vivax strain S&L-1 circ...	42.1	0.011
gi 73698085 gb DQ156133.1 	Plasmodium vivax strain IndiaI cir...	42.1	0.011

2.4. Teste com PA2

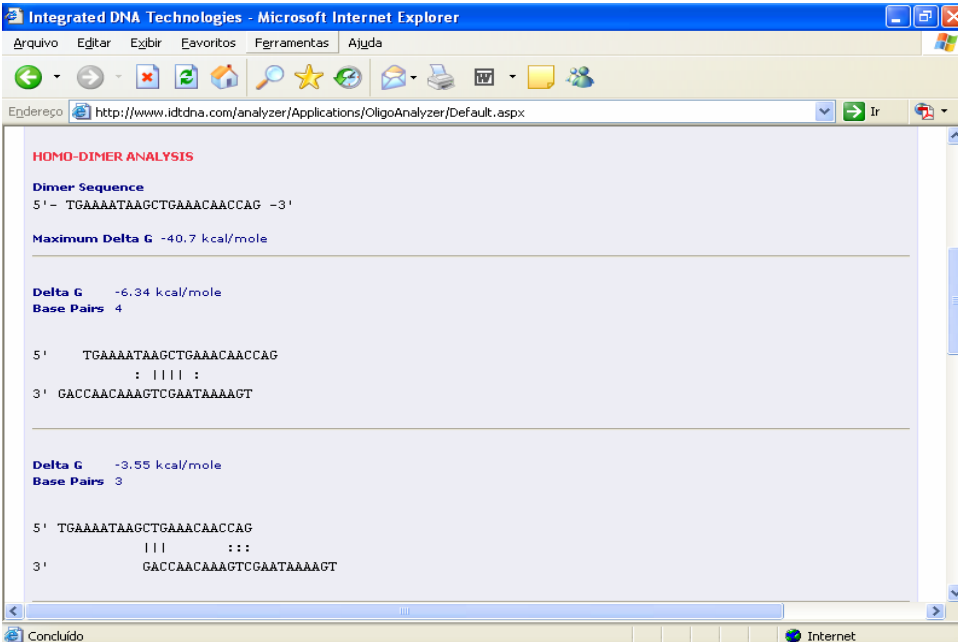
Sequence ID	Description	Score (Bits)	E Value
gi 29893523 gb AY135360.1 	Plasmodium coatneyi circumsporozoit...	42.1	0.011
gi 32347261 gb AY216939.1 	Plasmodium vivax strain Belem YAC1H14	42.1	0.011
gi 32347260 gb AY216938.1 	Plasmodium vivax strain IndiaVII YAC1	42.1	0.011
gi 32347259 gb AY216937.1 	Plasmodium vivax strain Salvador I YA	42.1	0.011
gi 32347258 gb AY216936.1 	Plasmodium vivax strain Thai-NYU YAC1	42.1	0.011
gi 12005314 gb AF236849.1 	Plasmodium vivax isolate SK974601...	42.1	0.011
gi 12005312 gb AF236848.1 	Plasmodium vivax isolate SK98007 c...	42.1	0.011
gi 12005310 gb AF236847.1 	Plasmodium vivax isolate SK98088 c...	42.1	0.011
gi 12005308 gb AF236846.1 	Plasmodium vivax isolate SK98001 c...	42.1	0.011
gi 160172 gb J02751.1 PFACSAAAD	Plasmodium vivax circumsporozoit...	42.1	0.011
gi 37962866 gb AY327573.1 AY327572S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962861 gb AY327571.1 AY327570S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962856 gb AY327569.1 AY327568S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962851 gb AY327567.1 AY327566S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962846 gb AY327565.1 AY327564S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962841 gb AY327563.1 AY327562S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962836 gb AY327561.1 AY327560S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 37962831 gb AY327559.1 AY327558S2	Plasmodium knowlesi isol...	42.1	0.011
gi 73698101 gb DQ156141.1 	Plasmodium vivax strain VietnamVI...	42.1	0.011
gi 73698099 gb DQ156140.1 	Plasmodium vivax strain India(O3-1...	42.1	0.011
gi 73698097 gb DQ156139.1 	Plasmodium vivax strain Korea(O2-2...	42.1	0.011
gi 73698095 gb DQ156138.1 	Plasmodium vivax strain Korea(O2-1...	42.1	0.011
gi 73698093 gb DQ156137.1 	Plasmodium vivax strain Korea(O2-9...	42.1	0.011
gi 73698091 gb DQ156136.1 	Plasmodium vivax strain Colombia c...	42.1	0.011
gi 73698089 gb DQ156135.1 	Plasmodium vivax strain IndonesiaV...	42.1	0.011
gi 73698087 gb DQ156134.1 	Plasmodium vivax strain S&L-1 circ...	42.1	0.011
gi 73698085 gb DQ156133.1 	Plasmodium vivax strain IndiaI cir...	42.1	0.011

b Programa BLAST – Nucleotide-nucleotide (blastn). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast> Acesso em: 12 maio 2005.

Anexo C - Análise conformacional dos oligonucleotídeos iniciadores para investigar a possibilidade de formação de estrutura secundária (dimmer-primer) ^c

3.1. Análise da formação de homodímeros

3.1.1. PR1



The screenshot displays the results of a homo-dimer analysis performed by the OligoAnalyzer tool. The analysis identifies two potential dimer structures for the sequence 5'-TGAAAATAAGCTGAAACAACCAG-3'.

HOMO-DIMER ANALYSIS

Dimer Sequence
5' - TGAAAATAAGCTGAAACAACCAG -3'

Maximum Delta G -40.7 kcal/mole

Delta G -6.34 kcal/mole
Base Pairs 4

5' TGAAAATAAGCTGAAACAACCAG
: | | | | :
3' GACCAACAAAAGTCGAATAAAAAGT

Delta G -3.55 kcal/mole
Base Pairs 3

5' TGAAAATAAGCTGAAACAACCAG
| | | : : :
3' GACCAACAAAAGTCGAATAAAAAGT

The interface includes a menu bar (Arquivo, Editar, Exibir, Favoritos, Ferramentas, Ajuda), a toolbar with navigation icons, and a status bar at the bottom indicating 'Concluido' and 'Internet'.

^c Programa Integrated DNA Technologies (IDT) – SciTools – OligoAnalyzer 3.0. Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Acesso em: 12 maio 2005.

3.1.2. PR2

Integrated DNA Technologies - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

HOMO-DIMER ANALYSIS

Dimer Sequence
5'- GGTACACTGCATGGAGTCCAT -3'

Maximum Delta G -39.69 kcal/mole

Delta G -8.07 kcal/mole
Base Pairs 5

5' GGTACACTGCATGGAGTCCAT
 ||||| : : : :
3' TACCTGAGGTACGTCACATTGG

Delta G -7.05 kcal/mole
Base Pairs 4

5' GGTACACTGCATGGAGTCCAT
 : : : |||| : : :
3' TACCTGAGGTACGTCACATTGG

Concluído Internet

3.1.3. PA1

Integrated DNA Technologies - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

HOMO-DIMER ANALYSIS

Dimer Sequence
5'- AAATAAGCTGAAACAACCA -3'

Maximum Delta G -33.63 kcal/mole

Delta G -6.34 kcal/mole
Base Pairs 4

5' AAATAAGCTGAAACAACCA
 : ||| :
3' ACCAACAAGTCGAATAAA

Delta G -1.95 kcal/mole
Base Pairs 2

5' AAATAAGCTGAAACAACCA
 : || : : :
3' ACCAACAAGTCGAATAAA

Concluído Internet

^c Programa Integrated DNA Technologies (IDT) – SciTools – OligoAnalyzer 3.0. Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Acesso em: 12 maio 2005.

3.1.4. PA2

HOMO-DIMER ANALYSIS

Dimer Sequence
5' - TCCACAGTTACTACTGCATGG -3'

Maximum Delta G -38.59 kcal/mole

Delta G -7.05 kcal/mole
Base Pairs 4

```

5' TCCACAGTTACTACTGCATGG
      :   |||   :
3'      GGTACGTACATTGGACACCT
  
```

Delta G -5.38 kcal/mole
Base Pairs 4

```

5' TCCACAGTTACTACTGCATGG
      |||
3'      GGTACGTACATTGGACACCT
  
```

Concluido

3.2. Análise da formação de heterodímeros

3.2.1. PR1/PR2

Primary Sequence
5' - TGA AAAATAAGCTGAAAACAACCAG -3'

Secondary Sequence
5' - GGT TACTACTGCATGGAGTCCAT -3'

Maximum Delta G -40.7 kcal/mole

Delta G -6.36 kcal/mole
Base Pairs 4

```

5' TGA AAAATAAGCTGAAAACAACCAG
      : : : : |||
3' TACCTGAGGTACGTACATTGG
  
```

Delta G -5.02 kcal/mole
Base Pairs 3

```

5' TGA AAAATAAGCTGAAAACAACCAG
      |||
3' TACCTGAGGTACGTACATTGG
  
```

Concluido

3.2.2. PA1/PA2

Integrated DNA Technologies - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

Primary Sequence
5' - AAATAAGCTGAAACAACCA -3'

Secondary Sequence
5' - TCCACAGTTACTGCATGG -3'

Maximum Delta G -38.59 kcal/mole

Delta G -6.36 kcal/mole
Base Pairs 4

5' AAATAAGCTGAAACAACCA
: | | | |
3' GGTACGTCACATTGGACACCT

Delta G -5.02 kcal/mole
Base Pairs 3

5' AAATAAGCTGAAACAACCA
 | | |
3' GGTACGTCACATTGGACACCT

Concluido Internet

3.2.3. PR1/PA2

Integrated DNA Technologies - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

Primary Sequence
5' - TGAAAAAAGCTGAAACAACCAG -3'

Secondary Sequence
5' - TCCACAGTTACTGCATGG -3'

Maximum Delta G -40.7 kcal/mole

Delta G -6.36 kcal/mole
Base Pairs 4

5' TGAAAAAAGCTGAAACAACCAG
: | | | |
3' GGTACGTCACATTGGACACCT

Delta G -5.02 kcal/mole
Base Pairs 3

5' TGAAAAAAGCTGAAACAACCAG
 | | |
3' GGTACGTCACATTGGACACCT

Concluido Internet

^c Programa Integrated DNA Technologies (IDT) – SciTools – OligoAnalyzer 3.0. Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Acesso em: 12 maio 2005.

3.2.3. PA1/PR2

Integrated DNA Technologies - Microsoft Internet Explorer

Arquivo Editar Exibir Favoritos Ferramentas Ajuda

Endereço: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

Primary Sequence
5' - AAATAAGCTGAAACAACCA -3'

Secondary Sequence
5' - GGTTACACTGCATGGAGTCCAT -3'

Maximum Delta G -39.69 kcal/mole

Delta G -6.36 kcal/mole
Base Pairs 4

5' AAATAAGCTGAAACAACCA
: : ||||
3' TACCTGAGGTACGTACATTGG

Delta G -5.02 kcal/mole
Base Pairs 3

5' AAATAAGCTGAAACAACCA
|||

Concluído Internet

^c Programa Integrated DNA Technologies (IDT) – SciTools – OligoAnalyzer 3.0. Disponível em: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Acesso em: 12 maio 2005.

Anexo D – Sítios de corte e tamanho dos fragmentos formados pelas enzimas de restrição *Alu I* e *Dpn I*^d

ENZIMA *ALU I* (AG/CT)

4. Fragmento amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores PR1 e PR2

4.1 Sítios de corte e tamanho dos fragmentos

VK210

TGAAAATAAG 10pb

CTGAAACAACCAAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAG
 CCAGCAGGTGATAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAG 106pb
 CTGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAG
 GAGACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAG
 135pb
 CTGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAG 27pb
 CTGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAG 54pb
 CTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAG 54pb
 CTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAG 54pb
 CTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAG 27pb
 CTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAG 27pb
 CTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAG 27pb
 CTGGACAGCCAGCAGGAAATGGTGCAGGTGGACAGGCAGCAGGAGGAAACGCAGGAGGAGGACAGGGAC
 AAAATAATGAAGGTGCGAATGCCCAAATGAAAAGTCTGTGAAAGAATACCTAGATAAAGTTAGAG 135pb
 CTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAACC 38pb

VK247

TGAAAATAAG 10pb

CTGAAACAACCAAGGAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAG
 CAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGACGATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCA
 ATCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAA
 TGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGATGATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAA
 CCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGAG
 CAGGTGATCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGATCAACCAGG
 AGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGC
 AATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGGACAGGCAGCAGGA
 GGAAATGCTGCAAACAAAAGGCAGGAGACGCAGGAGCAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAAT
 GCCCAAATGAAAAGTCTGTGATAGAATACCTAGATAAAGTTAGAG 673pb
 CTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAACC 38pb

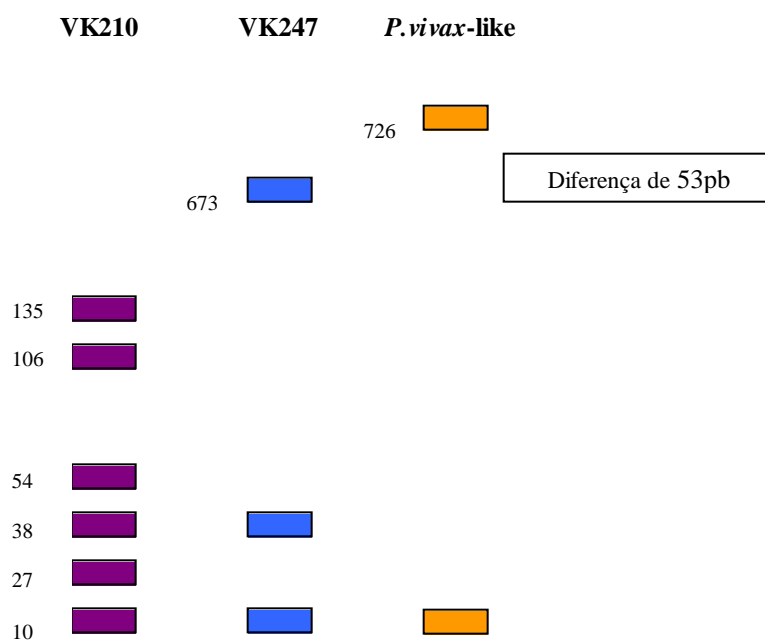
^d Os sítios de corte e o tamanho dos fragmentos de restrição foram determinados no programa Word.

P.vivax-like

TGAAAATAAG 10pb

CTGAAACAACCAAGTCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTG
 GAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAACCAGGAAGGTGGAGC
 AGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCGGAGCAGC
 AGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCC
 CCAGGAGCAAACCAGGAAGGCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCGGAGCAGCAGCCCCA
 GGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGA
 GCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCA
 AACCAGGGAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAAC
 CAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGCAAAGTCAGCAGGAGGACAGGGACAA
 AATAATGAAGGTGCGAATAAGCCAGATGAAAAGCATGTGAAAGAATACCTAGAGAAAATTAGATCTACCG
 TTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAAACC 726pb

4.2 Esquema do tamanho dos fragmentos formados após a digestão



.^d Os sítios de corte e o tamanho dos fragmentos de restrição foram determinados no programa Word.

ENZIMA *Dpn I* (GA/TC)

5. Fragmento amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores PR1 e PR2

5.1 Sítios de corte e tamanho dos fragmentos

VK210 – não possui nenhum sítio de corte

TGAAAATAAGCTGAAACAACCAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACA
GCCAGCAGGTGATAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCAGGAGATAG
AGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAACC
AGCAGGAGACAGAGCAGATGGACAACCAGCAGGTGATAGAGCAGCTGGACAACCAGCAGGTGATAGAGC
AGCTGGACAACCAGCAGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGC
AGGAGATAGAGCAGATGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGA
TGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGG
AGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAGATAGAGCAGCTGGACAGCCAGCAGGAAATGGTGCAGGTGGA
CAGGCAGCAGGAGAAACGCAGGAGGAGGACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAATGCCCAAATGAA
AAGTCTGTGAAAGAATACCTAGATAAAGTTAGAGCTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAAAC
C 694pb

VK247

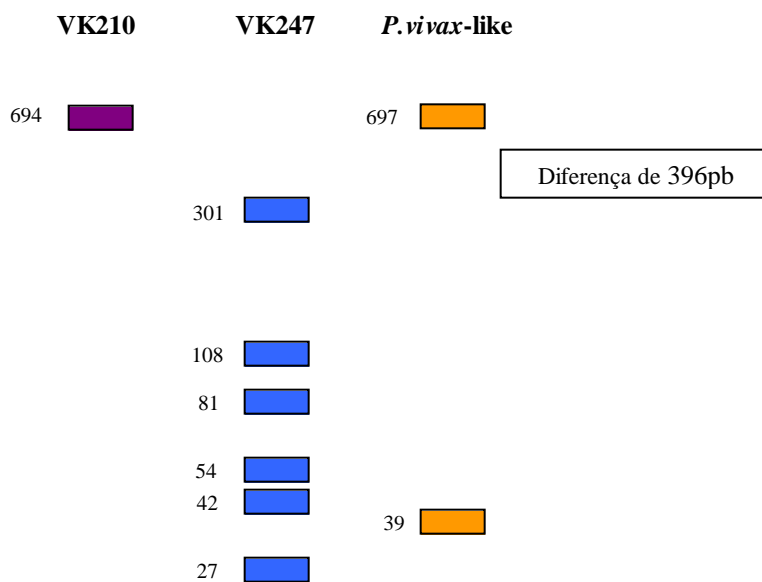
TGAAAATAAGCTGAAACAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGA 42pb
TCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAAT
GGAGCAGACGA 81pb
TCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAAT
GGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGA 108pb
TCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGATGA 27pb
TCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAAT
GGAGCAGGTGA 81pb
TCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGA 27pb
TCAACCAGGAGCAAATGGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGA 54pb
TCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAAT
GGGGCTGGCAATCAACCAGGAGCAAATGGGGCAGGTAATCAACCAGGAGCAAATGGAGCAGGTGGACAGG
CAGCAGGAGGAAATGCTGCAAACAAAAGGCAGGAGACGCAGGAGCAGGACAGGGACAAAATAATGAAG
GTGCGAATGCCCAAATGAAAAGTCTGTGATAGAATACCTAGATAAAGTTAGAGCTACCGTTGGCACCGAA
TGGACTCCATGCAGTGTAAACC 301pb

P. vivax-like

TGAAAATAAGCTGAAACAACCAGTCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAAT
CAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAACCAGG
AAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAG
GCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGTGCAAACCAGGAAGGTG
GAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGCGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGCGGAG
CAGCAGCCCCAGGAGCAAATCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCCCCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAG
CAGCACCAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGGAGCAGCAG
CACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGGAGCAGCAGCAC
CAGGAGCAAACCAGGAAGGTGGAGCAGCAGCACCAGGAGCAAACCAGGGAGGTGCAAAGTCAGCAGGAG
GACAGGGACAAAATAATGAAGGTGCGAATAAGCCAGATGAAAAGCATGTGAAAGAATACCTAGAGAAAAT
TAGA 697pb
TCTACCGTTGGCACCGAATGGACTCCATGCAGTGTAAACC 39pb

.^d Os sítios de corte e o tamanho dos fragmentos de restrição foram determinados no programa Word.

5.2 Esquema do tamanho dos fragmentos formados após a digestão

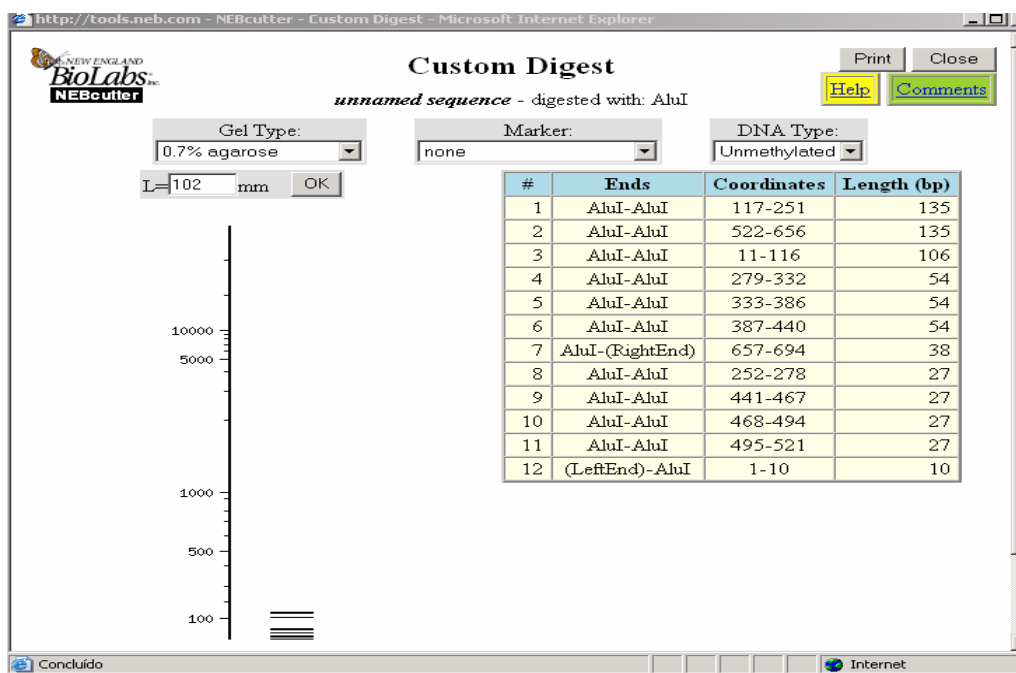


^d Os sítios de corte e o tamanho dos fragmentos de restrição foram determinados no programa Word.

Anexo E – Confirmação do tamanho dos fragmentos formados pelas enzimas de restrição *Alu I* e *Dpn I*^e

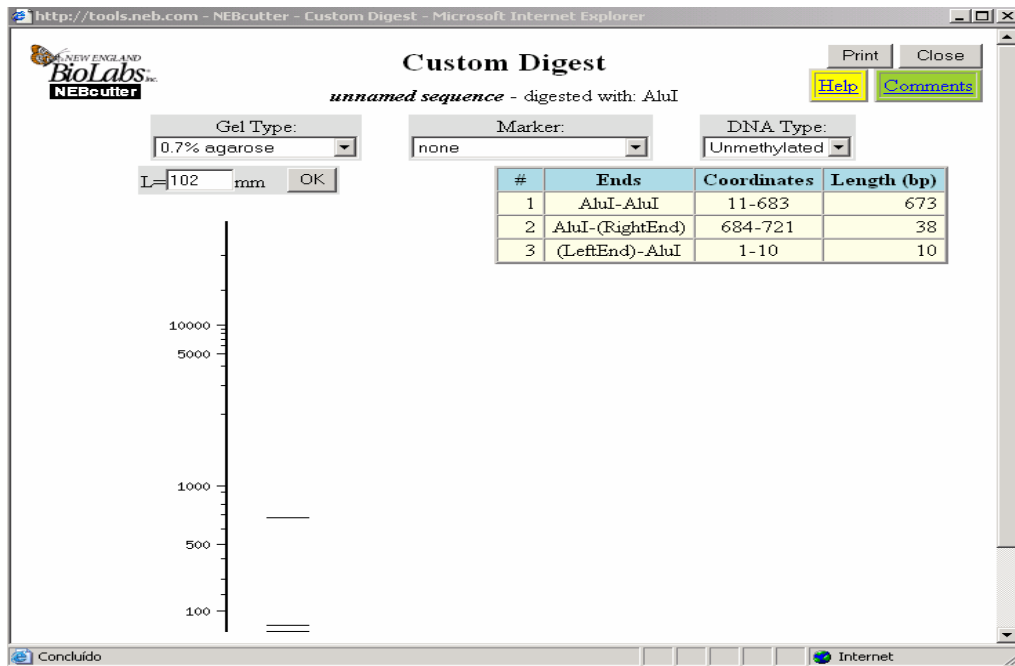
ENZIMA *ALU I* (AG/CT)

VK210

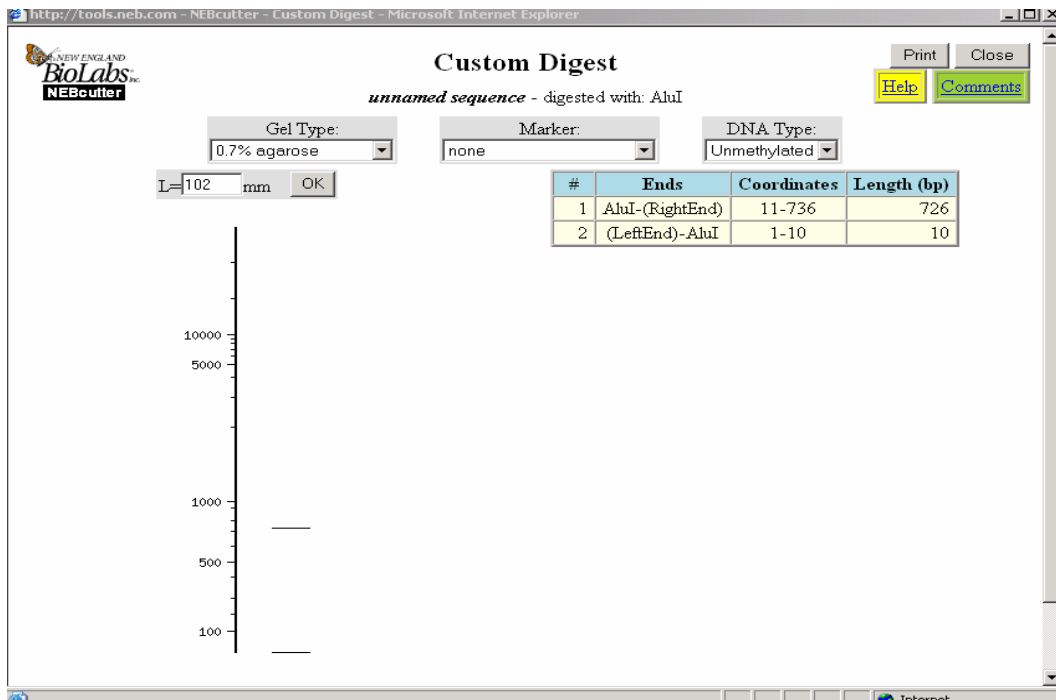


^e Programa NEBcutter. Disponível em: <http://tools.neb.com>. Acesso em: 20 out. 2005.

VK247



P. vivax-like



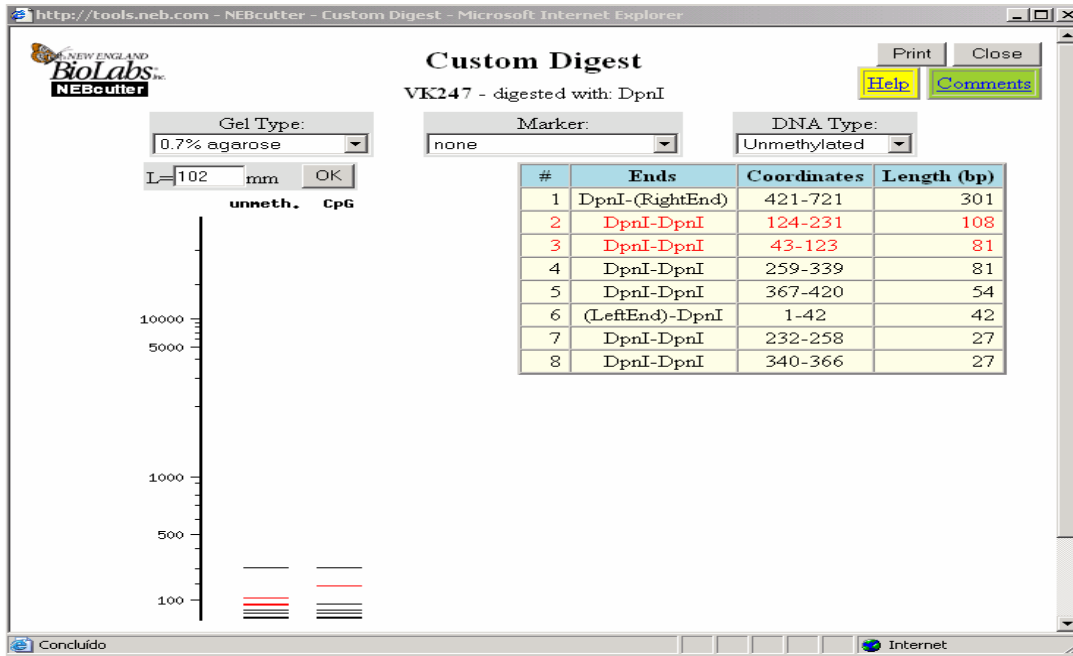
© Programa NEBcutter. Disponível em: <http://tools.neb.com>. Acesso em: 20 out. 2005.

ENZIMA *Dpn* I (GA/TC)

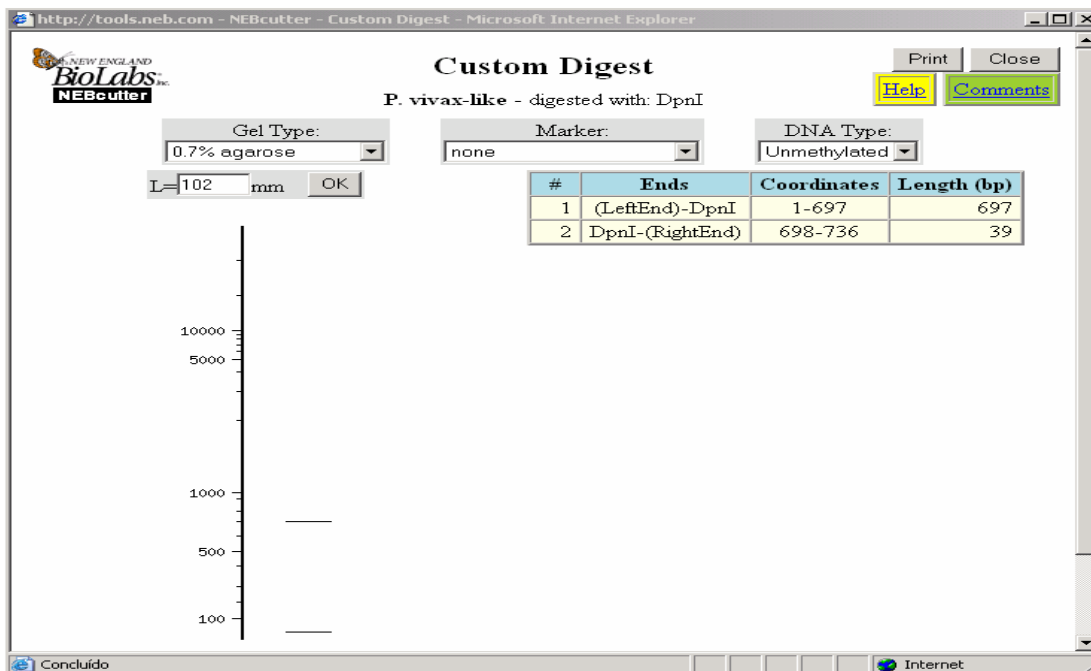
VK210

- Não possui nenhum sítio de corte para a enzima *Dpn*I, formando um fragmento de 694 pb.

VK247



P. vivax-like



© Programa NEBcutter. Disponível em: <http://tools.neb.com>. Acesso em: 20 out. 2005.