



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

**DOTTORATO DI RICERCA IN MALATTIE
INFETTIVE, MICROBIOLOGIA E SANITÀ
PUBBLICA**

CICLO XXXI

**“Sorveglianza molecolare della resistenza ai
derivati dell’artemisinina e ad altri antimalarici
in isolati di *Plasmodium falciparum* africani”**

MARIANGELA L’EPISCOPIA

Relatori:

Dott. Carlo Severini

Prof. David Modiano

Coordinatore:

Prof. Stefano D’Amelio

“Il processo di una scoperta scientifica è, in effetti, un continuo conflitto di meraviglie.”

Albert Einstein

INDICE

RIASSUNTO	8
ABSTRACT	10
1 INTRODUZIONE	12
1.1 La Malaria	14
1.1.1 La malaria nel mondo	14
1.1.2 Il ciclo del parassita	16
1.1.3 Gli stadi asessuati	19
1.2 Cenni di patologia	23
1.3 Diagnosi	25
1.3.1 Diagnosi emoscopica	26
1.3.2 Test diagnostici rapidi (RDTs, rapid diagnostic tests)	27
1.3.3 Diagnosi molecolare	29
1.4 Profilassi e terapia antimalarica	30
1.4.1 Chinolinici	31
1.4.2 Antifolati	33
1.4.3 Atovaquone	33
1.4.4 Derivati dell'artemisinina	34
1.5 Resistenza ai farmaci antimalarici	35
1.5.1 Metodi di monitoraggio	38
1.5.2 Marcatori molecolari associati alla farmaco-resistenza	43

1.6	Scopo della tesi.....	50
2	MATERIALI E METODI	52
2.1	Campioni Biologici	52
2.2	Estrazione del DNA plasmidiale.....	53
2.3	Tecniche di analisi	54
2.3.1	PCR	54
2.3.2	Nested PCR.....	55
2.3.3	Real-Time PCR	56
2.3.4	PET-RT-PCR.....	60
2.4	Protocolli	62
2.4.1	Diagnosi molecolare di infezione da <i>Plasmodium</i> e identificazione di specie	62
2.4.2	Diagnosi molecolare in PET-RT-PCR	65
2.4.3	Genotipizzazione	66
2.4.4	Amplificazione del gene <i>Pfk13</i>	68
2.4.5	Amplificazione del gene <i>Pfmdr1</i>	69
2.4.6	Determinazione del numero di copie del gene <i>Pfmdr1</i>	70
2.4.7	Determinazione del numero di copie del gene <i>Pfpm2</i>	71
2.4.8	Determinazione della delezione dei geni <i>Pfhrp2</i> e <i>3</i>	72
2.5	Sequenziamento del DNA	74
2.5.1	Sequenziamento tramite metodo di Sanger	74
2.5.2	Next generation sequencing	75
3	RISULTATI	82

3.1	Camerun	82
3.1.1	Area e modalità di campionamento.....	83
3.1.2	Risultati della diagnosi.....	85
3.1.3	Risultati della genotipizzazione	86
3.1.4	Risultati del sequenziamento NGS	87
3.1.5	SNPs nei marcatori molecolari di farmaco- resistenza	89
3.2	Eritrea	98
3.2.1	Area e modalità di campionamento.....	99
3.2.2	Risultati del sequenziamento NGS	101
3.2.3	Studio delle delezioni dei geni <i>Pfhrp2</i> e <i>3</i>	108
3.3	Botswana	114
3.3.1	Area e modalità di campionamento.....	115
3.3.2	Risultati della genotipizzazione e calcolo della MOI.....	116
3.3.3	Valutazione dei marcatori molecolari di farmaco- resistenza	118
3.4	Guinea Conakry	120
3.4.1	Aree e modalità di campionamento.....	121
3.4.2	Valutazione dei marcatori molecolari di farmaco- resistenza	123
3.5	Analisi dell'espressione del gene <i>Pfpm2</i>	125
3.5.1	Case Report su un paziente italiano al rientro dalla Cambogia	125
3.5.2	Case Report su un migrante Etiope.....	127
4	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	128

5	PUBBLICAZIONI PRODOTTE	139
5.1	Comunicazioni a Congressi	140
6	BLOGRAFIA	162
7	Appendice Tecnica	192
8	RINGRAZIAMENTI	219

RIASSUNTO

L'introduzione della terapia combinata a base di artemisinina (artemisinin-based combination therapy, ACT) ha rappresentato una svolta epocale nella lotta contro la malaria da *Plasmodium falciparum*, riducendo drasticamente la morbilità e mortalità da questa causate. Purtroppo, la diffusione della resistenza di *P. falciparum* all'artemisinina nel Sud-Est Asiatico costituisce una reale minaccia per il controllo e l'eliminazione della malaria, poiché rischia di vanificare i successi raggiunti nell'ultimo decennio, soprattutto in termini di sopravvivenza infantile. Numerosi studi, condotti su isolati di *P. falciparum* provenienti dal Sud-Est Asiatico, hanno dimostrato che la resistenza all'artemisinina è strettamente legata alla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) nel gene *kelch 13* (*k13*). Alcuni di questi SNPs sono anche stati descritti in Africa, ma mai nessuno è stato correlato ad un'aumentata tolleranza o resistenza all'artemisinina (Ménard *et al.*, 2016). La recente introduzione di strumenti di biologia molecolare di nuova generazione, volti alla rapida e precoce individuazione di parassiti resistenti, consente di perfezionare e rendere più accurate le strategie terapeutiche e profilattiche impiegate nei casi di malaria da *P. falciparum*. In questo lavoro di tesi, al fine di identificare la presenza di mutazioni puntiformi nel gene *k13* di *P. falciparum*, sono stati analizzati, mediante PCR e sequenziamento diretto, 930 isolati di *P. falciparum* raccolti in quattro paesi africani nei quali la malaria

continua a rappresentare un importante problema di salute pubblica: Camerun, Eritrea, Botswana, e Guinea Conakry. Per i campioni provenienti dal Camerun e dall'Eritrea, lo screening molecolare è stato effettuato tramite il sequenziamento di nuova generazione NGS, ovvero un sistema standardizzato di sorveglianza della farmaco-resistenza ad alto rendimento. Oltre all'analisi del gene *Pfk13*, è stata valutata l'eventuale presenza di mutazioni nei diversi geni marcatori di resistenza per gli antimalarici comunemente impiegati nelle combinazioni terapeutiche a base di artemisinina. Inoltre, in collaborazione con il CDC (Centre for Disease Control and Prevention) di Atlanta, è stato messo a punto un nuovo metodo di rilevazione dell'espressione del gene *plasmepsina 2* di *P. falciparum*, coinvolto nella resistenza alla piperachina. I risultati dello studio di sorveglianza molecolare qui riportati non hanno evidenziato alcuna resistenza all'artemisinina. Tuttavia, per gli altri marcatori molecolari indagati, è stata identificata un'alta frequenza di varianti alleliche associate alla resistenza alle diverse classi di farmaci antimalarici. Questi risultati suggeriscono la forte necessità di effettuare una costante valutazione di efficacia terapeutica dei farmaci impiegati nel trattamento della malaria da *P. falciparum*, e un assiduo monitoraggio molecolare della farmaco-resistenza, al fine di sviluppare adeguate strategie di controllo e prevenzione della malaria.

ABSTRACT

The introduction of the artemisinin-based combination therapy (ACT) has played a pivotal role in reducing the global burden of *Plasmodium falciparum* malaria. Unfortunately, the recent emergence of *P. falciparum* parasites resistant to artemisinin in Southeast Asia poses a threat to the malaria control and elimination efforts. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *P. falciparum kelch 13 (k13)* gene have been linked to artemisinin resistance. Hitherto, some of these SNPs have been described in Africa, but no one has been linked to artemisinin tolerance or resistance (Ménard *et al.*, 2016). Genetic tools for a rapid and early detection of *P. falciparum* resistant parasites are determinant for guiding appropriate treatment and prophylaxis of *P. falciparum* malaria. In this study, we analyzed by PCR and direct sequencing 930 *P. falciparum* isolates collected in four African countries in which malaria still represents a major public health problem (Botswana, Cameroon, Eritrea and Guinea Conakry) to investigate the presence of point mutations in the *P. falciparum k13* gene. For the Cameroonian and Eritrean samples, we used next-generation sequencing (NGS), a high-throughput, standardized molecular surveillance system, to perform the drug resistance screening. Amplification and polymorphisms in *P. falciparum* molecular marker genes were also analyzed to monitor the possible presence of point mutations linked to drug resistance in the antimalarial drugs used as partner in the ACT. Moreover, a new method to

quantify the number of copies of *P. falciparum* *plasmepsin 2* gene was also designed in collaboration with the CDC malaria team. No mutations associated with artemisinin resistance were observed. However, a high frequency of allelic variants associated with drug resistance to the other antimalarial drugs was detected. These preliminary results suggest the strong need to perform a continued molecular monitoring as well as drug efficacy evaluations to provide adequate malaria control and prevention strategies.

1 INTRODUZIONE

E' di antica memoria la credenza popolare che la malaria venisse contratta dai miasmi malsani delle paludi e delle acque stagnanti, tanto da essere definita “mal’aria”. Già nella seconda metà del secolo V a.C., Ippocrate, nei libri delle “Epidemie”, descrive i diversi tipi di febbri intermittenti da malaria, con la benignità e malignità delle stesse (fig. 1). Soltanto nel tardo Ottocento il termine “malaria” divenne sinonimo della malattia.

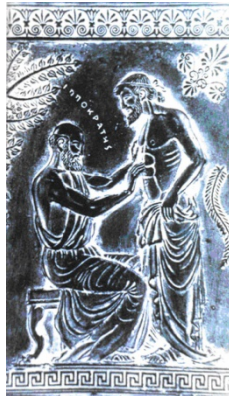


Figura 1 - Ippocrate riconosce una febbre malarica, e ne associa l'ingrossamento della milza

Ad oggi, la malaria, assieme alla tubercolosi e all'AIDS, rappresenta una delle principali emergenze sanitarie nelle

numerose aree endemiche della fascia tropicale e sub-tropicale del pianeta (Africa Sub-Sahariana, Asia ed America del Sud), mietendo milioni di vittime ogni anno, in particolare tra bambini di età inferiore ai 5 anni.

Nonostante gli eccellenti risultati ottenuti nel contenimento della malattia grazie all'introduzione della terapia combinata a base di artemisinina (ACT) come prima linea di trattamento farmacologico in pazienti con malaria non complicata, l'insorgenza della resistenza all'artemisinina ed ai suoi derivati sintetici non ha tardato a fare la sua comparsa, sviluppandosi e diffondendosi in molte zone del Sud-Est Asiatico. Nel 2014 sono state identificate diverse mutazioni nel gene kelch 13 propeller, strettamente correlate alla resistenza all'artemisinina (Ariey *et al.*, 2014). Per la prima volta nella lunga storia della lotta contro la malaria, contrariamente a quanto accaduto per cloroquina e altri antimalarici, la comunità scientifica internazionale ha a disposizione un marcatore molecolare per sorvegliare la comparsa e la diffusione della resistenza all'artemisinina in aree dove questa resistenza non è ancora presente, in particolare nelle aree endemiche dell'Africa sub-sahariana.

1.1 La Malaria

1.1.1 La malaria nel mondo

La malaria rappresenta la più importante parassitosi umana, nonché un problema di salute pubblica mondiale. Più del 40% della popolazione mondiale vive in zone dove la malaria è endemica, cioè nelle regioni comprese tra i due Tropici (Africa Sub-Sahariana, Asia ed America del Sud) (fig. 1.1.1). L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha valutato che 3,4 miliardi di persone in 91 paesi del mondo sono esposte al rischio di contrarre e sviluppare la malaria. Nel 2016 sono stati stimati 216 milioni di casi, con un aumento di circa 5 milioni di casi rispetto al 2015, ed un totale di 445000 decessi, circa lo stesso numero raggiunto nel 2015. Circa l'80% dei casi e il 90% dei decessi per malaria si verificano a carico di donne in gravidanza e di bambini in età inferiore ai 5 anni. (WHO, World Malaria Report 2017).

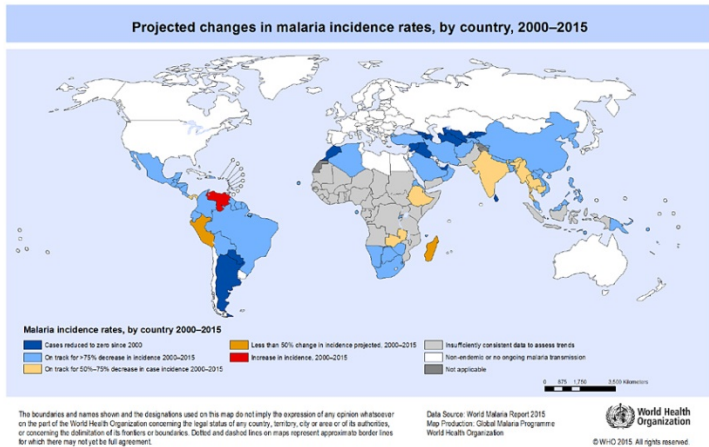


Figura 1.1.1 - Mappa rappresentativa dell'incidenza dei casi di malaria nel mondo
(World Malaria Report, WHO 2017)

La malaria non è solamente una malattia comunemente associata alla povertà: molte evidenze suggeriscono come essa sia anche causa di povertà ed uno dei maggiori ostacoli allo sviluppo economico di un paese (Worrall *et al.*, 2005).

Oltre agli effetti immediati della patologia (stanchezza, febbre, apatia), che di per sé hanno già conseguenze negative sulla produttività di un paese, è stato dimostrato come la malaria cerebrale sia una delle cause maggiori di handicap neurologici nei bambini africani (Idro *et al.*, 2010), in quanto compromette le capacità cognitive e le prestazioni scolastiche, anche in seguito a

guarigione (Fernando *et al.*, 2010).

Sommando i costi sanitari, i giorni di lavoro persi, la riduzione della produttività dovuta ai danni cerebrali e la perdita di investimenti e turismo, il prezzo che l’Africa deve pagare ogni anno per questa malattia è stato stimato intorno ai 12 miliardi di dollari (Greenwood *et al.*, 2005).

Se da un lato è la malaria a causare povertà, dall’altro la povertà aumenta il rischio di sviluppare la malaria. La mancanza di misure sanitarie adeguate, le scarse condizioni igienico-sanitarie e il mancato accesso a misure preventive, diagnostiche o terapeutiche aggravano la situazione. Se a questo si aggiunge l’insorgenza della resistenza del vettore agli insetticidi, e del parassita ai farmaci antimalarici, e la mancanza di un vaccino, il quadro generale si fa ancora più drammatico.

1.1.2 Il ciclo del parassita

L’agente eziologico della malaria è il *Plasmodium*, un protozoo del Phylum Apicomplexa, il quale raggruppa tutti quegli organismi caratterizzati dalla presenza di un organello, addetto all’invasione, chiamato “complesso apicale”. Le specie responsabili della malaria nell’uomo sono *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*. A queste si aggiunge *Plasmodium knowlesi*, parassita malarico dei primati,

che, oltre ad infettare le scimmie arboricole asiatiche, può infettare anche l'uomo, in cui in particolari condizioni può provocare un'infezione letale.

Il ciclo vitale dei plasmodii si svolge all'interno di diversi tessuti di due differenti ospiti: un ospite intermedio (un vertebrato) e un ospite definitivo (una zanzara del genere *Anopheles*). Quando una zanzara infetta punge un individuo, essa inietta nel derma gli sporozoi che, attraverso il torrente circolatorio, raggiungono il fegato e infettano gli epatociti, dove inizia il "ciclo schizogonico eso-eritrocitario" (*P. vivax* e *ovale* possono, qui, dar vita a forme silenti, chiamate ipnozoiti, responsabili delle recidive) (Krotoski *et al.*, 1982). Durante il ciclo epatico, che ha la durata di 10-12 giorni, gli sporozoi si sviluppano prima in trofozoita epatico e poi, attraverso una serie di suddivisioni nucleari, in schizonte, dal quale si libereranno centinaia di merozoiti. Uno o più merozoiti invadono un singolo eritrocita, dando avvio al "ciclo intra-eritrocitario". Qui, il parassita passa attraverso uno stadio di trofozoita giovane, caratterizzato da una morfologia ad anello, e di trofozoita maturo, per poi formare uno schizonte, da cui si sviluppano fino a 32 merozoiti (per *P. falciparum*). Questi daranno luogo ad una rottura sincrona dei globuli rossi e, una volta immessi nel flusso sanguigno invaderanno nuovi eritrociti, dando inizio ad un altro ciclo di infezione.

Ad un certo punto, in risposta allo stress o a stimoli cellulari, alcuni parassiti si differenziano in forme pre-sessuate, chiamate gametociti femminili (macrogametociti) e gametociti maschili (microgametociti). I gametociti vengono prelevati dalle zanzare durante il pasto di sangue e, nel loro lume intestinale, danno origine, rispettivamente, ad un gamete femminile e otto gameti maschili mobili, che si uniscono a formare uno zigote, chiamato oocinete, unica cellula diploide del ciclo vitale del parassita. L'oocinete è in grado di penetrare la parete intestinale e di raggiungere la lamina basale, dove forma un'oocisti, che dà inizio ad una divisione meiotica e ad una serie di divisioni mitotiche da cui si sviluppano numerosi sporozoit. Una volta maturi, gli sporozoit rompono l'oocisti e si riversano nell'emocele dell'insetto, dove, grazie al movimento dell'emolinfa, raggiungono le ghiandole salivari, dove restano in attesa di essere inoculati nel nuovo ospite durante il successivo pasto di sangue. (fig. 1.1.2)

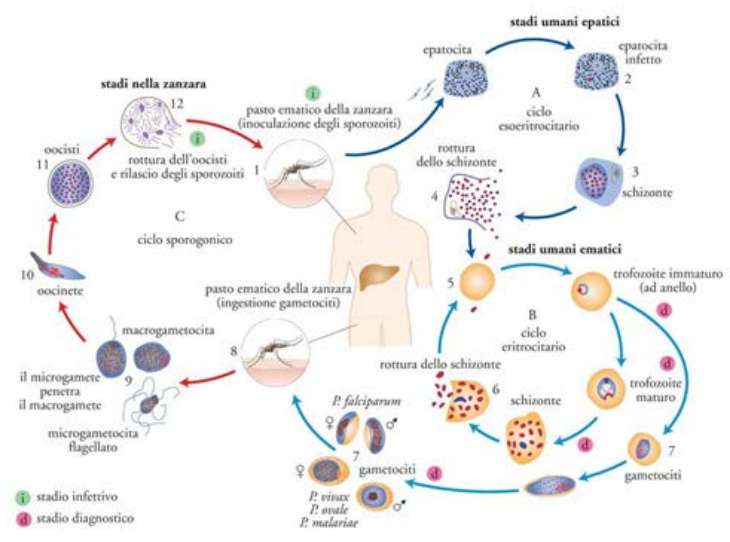


Figura 1.1.2 - Ciclo di *Plasmodium falciparum*
(Dpdx-CDC Parasitology Diagnostic Web Site)

1.1.3 Gli stadi asessuati

Nonostante sia un organismo unicellulare ed aploide, *P. falciparum*, è dotato di una strabiliante complessità, che si manifesta nei suoi molteplici cambiamenti morfologici. Ad ogni diverso stadio sono associate determinate specifiche funzioni. Il merozoita è lo stadio invasivo del parassita ed anche il più importante dal punto di vista immunologico, in quanto è l'unica forma che si trova, anche se solo per pochi secondi, libera nell'ambiente extracellulare, e quindi esposta al sistema immunitario dell'ospite. Ha una morfologia ovoidale e, con il

suo diametro di soli 1.6 μm , rappresenta la forma più piccola del parassita.

Ogni merozoita contiene al suo apice delle vescicole secretorie usate nell'invasione (roptrie, micronemi e granuli densi), e nel citoplasma numerosi ribosomi, un mitocondrio ed un plastide, mentre il nucleo è localizzato alla base.

Durante l'invasione, gli organelli del complesso apicale secernono il loro contenuto all'esterno e partecipano all'adesione e penetrazione all'interno dell'eritrocita. Inoltre, in questa fase, si ha la formazione del vacuolo parassitoforo (VP), uno spazio tra parassita ed eritrocita, che crea il microambiente ideale per lo sviluppo del patogeno. La morfologia cellulare cambia e, da merozoita, il parassita si sviluppa in **trofozoita ad anello**.

Dopo l'invasione, il parassita assume un aspetto discoidale piatto, in cui il citoplasma localizza perifericamente e accoglie tutti i principali organelli, mentre il nucleo e i compartimenti vescicolari, quali reticolo endoplasmatico (RE), liscio e rugoso, e un apparato di Golgi rudimentale, si distribuiscono al centro.

A causa del sottile perimetro della cellula e della posizione del nucleo, questo stadio, quando colorato con Giemsa, assume una caratteristica forma ad anello, da cui prende il nome. Il parassita si nutre del citoplasma della cellula ospite (principalmente di emoglobina) grazie ai citostomi, strutture che si formano a partire da invaginazioni della membrana plasmatica e del vacuolo parassitoforo. Il meccanismo d'azione dei citostomi è un argomento ancora dibattuto: non è chiaro se essi siano strutture

endofitiche, dalle quali si dipartono vescicole contenenti piccole porzioni di citoplasma cellulare o se formino un canale di comunicazione diretto tra il vacuolo digestivo e il citoplasma dell'eritrocita (Lazarus *et al.*, 2008). In realtà, sembra che il parassita usi anche altri modi per pinocitare l'emoglobina, tra cui alcuni meccanismi citostoma-indipendenti (Eshar *et al.*, 2011). L'emoglobina è necessaria sia come risorsa di amminoacidi sia per stabilizzare l'osmolarità e prevenire la lisi della cellula ospite (Lew *et al.*, 2003).

I derivati dell'eme, risultanti dal catabolismo dell'emoglobina, sono convertiti in cristalli di emozoina inerti, che si accumulano all'interno di vacuoli pigmentati. Man mano che il parassita cresce, si forma un unico pigmento, dal caratteristico colore giallo bruno, chiaramente visibile al microscopio ottico, permettendo una facile distinzione tra lo stadio di trofozoita ad anello e lo stadio di trofozoita maturo.

Il **trofozoita maturo** altera la struttura dell'eritrocita: l'area occupata dal parassita aumenta, la superficie dell'eritrocita da liscia diventa frastagliata e si caratterizza di invaginazioni ed estroflessioni di membrana. L'apparato del Golgi si ingrandisce ed assume una struttura complessa, con cisterne tubulari e vescicole ben visibili. Questo partecipa al processo di esportazione delle proteine sulla membrana o nel citoplasma della cellula ospite. Anche il numero di ribosomi aumenta e il RE si allarga, denotando un incremento della sintesi proteica in generale. Inoltre, sulla membrana dell'eritrocita si osserva la formazione

dei cosiddetti “knobs”, strutture specializzate nell’adesione, responsabili del sequestro di trofozoiti e schizonti nell’endotelio dei vasi sanguigni.

Lo **schizonte** è lo stadio addetto alla replicazione nucleare, in grado di dare origine fino a 32 nuovi merozoiti. L’ingestione del citoplasma della cellula ospite continua fino allo stadio di schizonte tardivo, portando ad una deplezione di circa il 75% dell’emoglobina totale (Rosenthal and Meshinck, 1996); contemporaneamente, cristalli di emozoina sono aggiunti al vacuolo digestivo, che si compatta in un’unica massa densa. La cellula continua ad ingrandirsi (più spazio è necessario ad accogliere i nuovi merozoiti), aumentano le proteine del parassita che vengono esportate nel citosol o sulla membrana della cellula ospite, tra cui quelle coinvolte nella formazione dei “knobs”.

Alla fuoriuscita dallo schizonte, ogni merozoita potrà invadere un nuovo globulo rosso, dando avvio a un nuovo ciclo di infezione (Bannister *et al.*, 2000), (fig. 1.1.3).

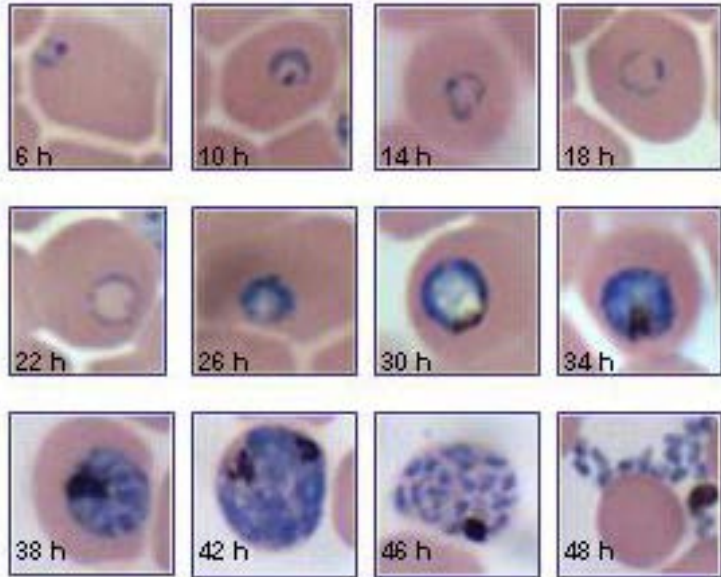


Figura 1.1.3 - Citogenesi di *Plasmodium falciparum*

P. falciparum in striscio di sangue colorato in Giemsa. Il numero in basso a destra in ogni immagine indica le ore (h) trascorse dall'invasione iniziale del merozoita. Da 6h a 22h: trofozoita ad anello. Da 26h a 30h: trofozoita maturo, l'emozoina è visibile come una massa scura. da 34h a 46h: schizonti. 48h: lo schizonte appena lisato rilascia i merozoiti (Dario Mendez, 2010).

1.2 Cenni di patologia

Tutti i sintomi clinici della malaria sono la conseguenza dell'infezione degli eritrociti umani. Se durante la prima fase del

ciclo (fase epatica e primi cicli intra-eritrocitari) l'infezione è totalmente asintomatica, dopo circa due settimane i diversi cicli schizogonici producono una carica parassitaria tale da provocare il primo picco febbrile, che si ha in seguito alla rottura sincrona degli schizonti ed il successivo rilascio di merozoiti ed emozoina nel circolo sanguigno. La febbre si presenta con una frequenza che dipende dalla specie di plasmodio: 24 ore per *P.knowlesi*, 48 ore per *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* (Terzana) e 72 ore per *P. malariae* (Quartana). La temperatura corporea si innalza fino ai 40-41 °C, portando talvolta a nausea e convulsioni (fig. 1.2).

Oltre alle febbri intermittenti, anche stanchezza, brividi, mal di testa, dolori ossei e articolari caratterizzano questa prima fase della malattia. Le diverse specie si differenziano, inoltre, per la gravità della malattia che provocano: *P. falciparum* è sicuramente la specie associata alla sintomatologia più grave. I globuli rossi infettati con *P. falciparum* esprimono in superficie molecole che causano la citoaderenza sia degli eritrociti tra loro che degli eritrociti con l'endotelio dei capillari. Questa capacità, oltre ad una maggiore rigidità ed indeformabilità degli eritrociti infetti, può causare occlusione dei capillari e mancata irrorazione di organi e tessuti. Uno dei tessuti più colpiti da questo fenomeno è il tessuto cerebrale, probabilmente a causa dell'azione di citochine, prodotte in seguito all'infezione, che stimolano l'endotelio dei capillari cerebrali ad esporre in membrana molecole che legano gli eritrociti parassitati. Anche

l'anemia è una delle manifestazioni cliniche dei casi di malaria più gravi. Oltre ad essere causata dall'enorme quantità di eritrociti distrutti durante i cicli replicativi del parassita, sembra essere dovuta anche alla clearance di eritrociti non parassitati e al blocco dell'emopoiesi mediato da citochine (Halder *et al.*, 2007).

Quando l'infezione si cronicizza, una delle caratteristiche comuni è la splenomegalia, causata dall'enorme carico di lavoro che la milza deve adempire per l'eliminazione degli eritrociti parassitati.

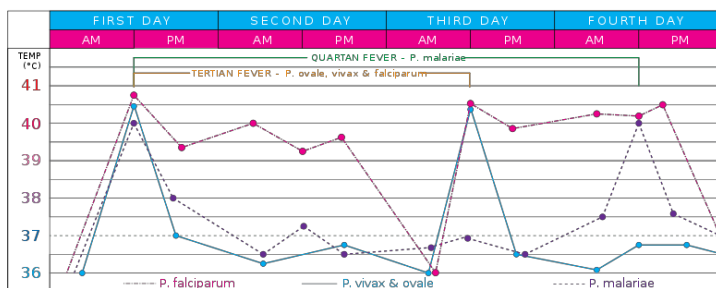


Figura 1.2- Picchi febbrili intermittenti provocati dalle differenti specie di plasmodio

1.3 Diagnosi

Una diagnosi precoce ed accurata è essenziale per la corretta gestione e l'efficace sorveglianza della patologia malarica. Spesso, soprattutto in Africa Sub-Sahariana, diagnosi errate o ritardate sono causa degli elevati indici di morbilità e mortalità registrati.

Secondo le linee guida dell'OMS, il “gold standard” della diagnosi è rappresentato dall'esame emoscopico supportato dal test rapido (RDT, rapid diagnostic test) (WHO, World malaria report 2017).

1.3.1 Diagnosi emoscopica

La diagnosi microscopica di malaria è considerata il “gold standard” per l'identificazione dei parassiti malarici, garantendo la possibilità di distinguere tra specie, stadio di crescita, e severità della malattia tramite la valutazione morfologica e la quantificazione dei parassiti presenti nel sangue del paziente (WHO, malaria microscopy quality assurance manual, 2016). L'osservazione microscopica diretta viene effettuata allestendo un preparato emoscopico, goccia spessa o striscio sottile di sangue, prelevando una piccola quantità di sangue capillare, e opportuna colorazione in una soluzione di Giemsa. Per ogni paziente è consigliabile preparare almeno quattro vetrini, e contare fino a 500 campi diversi. Sia con l'analisi della goccia spessa che con quella dello striscio sottile, la sensibilità e specificità sono molto elevate: con la prima preparazione è possibile osservare fino a 10 parassiti/ μl , ovvero 0,0001% di parassitemia, con la seconda, invece, fino a circa 500 parassiti/ μl , equivalenti allo 0,02% di parassitemia. Analizzando lo striscio sottile di sangue è possibile stabilire la specie di Plasmodio responsabile dell'infezione, eccezion fatta per

le infezioni mediate da *P. knowlesi*, non avendo queste caratteristiche morfologiche tali da poter essere identificate tramite emoscopia (Bronner *et al.*, 2009). Inoltre, l'emoscopia rappresenta un utile supporto al monitoraggio della terapia, dando la possibilità, ogni 6-12 ore, di controllare i livelli di parassitemia fino alla completa clearance dei parassiti. La determinazione della parassitemia viene calcolata dividendo il numero di emazie parassitate per μl di sangue per il numero standard di globuli bianchi per μl di sangue (8000 wbc/ μl). La parassitemia calcolata tramite l'osservazione della goccia spessa è espressa come numero di parassiti/ μl di sangue, mentre la parassitemia ricavata da striscio sottile è espressa in percentuale (% dei globuli rossi parassitati), contando almeno 1000 globuli rossi.

1.3.2 Test diagnostici rapidi (RDTs, rapid diagnostic tests)

I test diagnostici rapidi (RDTs) utilizzati nel riconoscimento dell'infezione malarica si basano sull'utilizzo di un saggio immuno-cromatografico per la ricerca di antigeni solubili tramite il legame ad un anticorpo monoclonale immobilizzato sulla membrana di riconoscimento (Moody *et al.*, 2002). Gli RDTs furono sviluppati attorno alla metà degli anni '90 (Palmer *et al.*, 1998), e ad oggi continuano ad essere raccomandati dall'OMS per la diagnosi di malaria prima di ricorrere al trattamento con ACT. I

più comuni RDTs utilizzati per il riconoscimento di infezioni malariche da *P. falciparum* si basano sull'identificazione della proteina HRP-2 (histidin-rich protein 2), espressa in modo specifico da questa specie di plasmodio. Altri RDTs si basano sul riconoscimento dell'enzima aldolasi genere specifica e sull'HRP-2 per distinguere tra infezioni mediate o non mediate da *P. falciparum* (NOW[®]ICT (Binax, USA; ICT Malaria Pf/Pv, Amrad ICT, Australia). Gli RDTs basati sull'identificazione della lattato deidrogenasi del plasmodio (pLDH) permettono la distinzione tra infezioni da *P. falciparum* o da *P. vivax*. Nonostante siano disponibili in commercio test rapidi per il riconoscimento di infezioni da *P. knowlesi* (McCutchan *et al.*, 2008), la maggior parte degli RDTs disponibili non permettono di differenziare tra infezioni da *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi* (FIND-WHO, Malaria rapid diagnostic test performance, 2015-2016). La sensibilità nel riconoscimento di *P. falciparum* è del 99% con una parassitemia di circa lo 0,02% (~1000 parassiti/μl), ma tende ad abbassarsi al diminuire della parassitemia, tra 0,002% e 0,01% (100-500 parassiti/μl). Nel caso di infezioni da *P. vivax*, la specificità è pari all'85%. Rispetto ai test rapidi che si basano sul riconoscimento della proteina HRP-2, quelli che riconoscono l'enzima pLDH risultano meno sensibili (Murray *et al.*, 2008).

Nonostante l'emoscopia e i test diagnostici rapidi siano gli approcci diagnostici raccomandati dall'OMS per l'identificazione dell'infezione malarica, la biologia molecolare rappresenta un utile

supporto metodologico per la conferma di diagnosi, e in alcuni casi, una tecnica diagnostica addizionale. Attualmente, l'OMS identifica nei test di amplificazione degli acidi nucleici dei parassiti del genere *Plasmodium* strumenti validi per ricerche epidemiologiche o indagini che mappino infezioni sub-microscopiche in aree a bassa trasmissione.

1.3.3 Diagnosi molecolare

L'avvento di tecniche di biologia molecolare basate sull'amplificazione di specifiche regioni del DNA dei parassiti del genere *Plasmodium* attraverso la reazione di polimerizzazione a catena (Polymerase Chain Reaction, PCR) ha posto le basi per lo sviluppo di sempre più accurate e sensibili metodiche da impiegare nell'ambito della malariologia non solo per la diagnostica, ma soprattutto per indagini epidemiologiche. Attraverso l'impiego della PCR e della nested-PCR è possibile effettuare la diagnosi differenziale delle quattro specie di plasmodi umani (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*) amplificando il gene che codifica per la subunità 18S dell'RNA ribosomiale (Snounou *et al.*, 1993). L'elevata sensibilità e specificità, pari a circa 0.002 parassiti/μl (Dormond *et al.*, 2011), così come la facilità di interpretazione e riproducibilità dei risultati, rendono i metodi di biologia molecolare strumenti efficaci per la diagnosi di infezioni malariche sub-microscopiche, per la diagnosi di infezioni miste in

presenza di una specie prevalente, per l'identificazione di reinfezioni e recrudescenze dovute alla stessa specie plasmodiale, e per la caratterizzazione di ceppi plasmodiali farmaco-resistenti (Snounou *et al.*, 1993; Ndao, 2009).

1.4 Profilassi e terapia antimalarica

La chemioprolifassi e la chemioterapia rimangono, a tutt'oggi, gli strumenti più efficaci per il contenimento della malaria nelle aree di intensa trasmissione, ma lo sviluppo di ceppi resistenti ai farmaci comunemente utilizzati, la mancanza di progressi nello sviluppo di vaccini e di nuovi farmaci a prezzi accessibili e la diffusione di vettori resistenti agli insetticidi, costituiscono le cause di un problema costante e riemergente. Il successo di una terapia si raggiunge attraverso la valutazione e la conoscenza delle modalità di interazione tra il farmaco, il parassita e l'ospite, fondamentali per l'evolversi della malattia. Si conosce una vasta gamma di farmaci utilizzabili per il trattamento della malaria che sono ascrivibili ad almeno 5 classi distinte che differiscono tra loro per il principio attivo utilizzato e/o per il meccanismo d'azione e molecole target. (Tabella 1).

CHINOLINICI	ANTIFOLATI	ATOVAQUONE	Derivati dell'ARTEMISININA	ANTIBIOTICI
<i>Chimino</i>	<i>Primetamina</i>	<i>Atovaquone</i>	<i>Artemeter</i>	<i>Tetracicline</i>
<i>Clorochina</i>	<i>Sulfadossina</i>		<i>Arteeter</i>	<i>Tossiciline</i>
<i>Amodiachina</i>	<i>Proguanil</i>		<i>Artesunato</i>	<i>Clindamicine</i>
<i>Meflochina</i>			<i>Diidroartemisina</i>	
<i>Lumefantrina</i>				

Tabella 1- Classificazione di farmaci antimalarici

1.4.1 Chinolinici

La somministrazione di clorochina è tuttora il trattamento di scelta contro *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e per la malaria, ma non per *P. falciparum*, poiché questa specie è ormai resistente alla clorochina in tutte le aree endemiche. Tuttavia, anche in aree con un elevato livello di resistenza come l’Africa orientale, il farmaco è ancora presente nei mercati locali a causa del suo basso costo. Il meccanismo d’azione della clorochina è stato descritto solo di recente e consiste nel blocco del meccanismo di detossificazione dell’eme da parte del parassita. Durante lo sviluppo all’interno degli eritrociti, il plasmodio utilizza come fonte d’azoto la parte proteica dell’emoglobina, la cui grossa molecola viene pinocitata e degradata all’interno del vacuolo digestivo del parassita che trasforma l’eme, tossico per il

parassita, in emozoina. La resistenza dipende da un meccanismo che pompa il farmaco al di fuori del vacuolo digestivo e sembra essere legato a mutazioni nei geni *Pfcr1* e *Pfmdr1* in *P. falciparum* (Warhurst *et al.*, 2001; Fidock *et al.*, 2000). La resistenza nei confronti di questo farmaco è comparsa già a partire dagli anni '50, al confine tra la Cambogia e la Thailandia, e si è diffusa in tutte le aree endemiche del Sud America e quasi in tutta l'Asia e l'Oceania entro la fine degli anni '80. Stesso destino è spettato ai Paesi Africani, particolarmente all'Africa occidentale, dove la diffusione della resistenza alla cloroquina ha determinato, negli ultimi anni, un notevole aumento dell'incidenza della morbidità e della mortalità, in particolar modo in paesi come il Senegal, il Ghana, il Camerun e il Mali.

Il Chinino, in uso dal 1820, oltre a risultare di indubbia importanza nel trattamento delle forme resistenti ad altri farmaci, è ancora considerato indispensabile nella terapia delle forme gravi e complicate, data la sua rapida biodisponibilità, l'intensa azione schizonticida e la possibilità di essere somministrato per via parenterale o endovenosa. Nelle aree endemiche, dove circolano ceppi di plasmodio altamente resistenti alla maggior parte di farmaci antimalarici, l'aspettativa di guarigione è ora migliorata dall'impiego del protocollo terapeutico a base dei derivati dell'artemisinina.

1.4.2 Antifolati

Il principale farmaco di questa classe è il Fansidar, combinazione di sulfadossina, che interagisce con l'enzima diidropteroato sintasi (DHPS), e pirimetamina, inibitore della diidrofolato reduttasi (DHFR); questo farmaco è stato utilizzato per sostituire la cloroquina come trattamento di prima linea della malaria da *P. falciparum* in molte regioni Africane (Eriksen *et al.*, 2007). La resistenza a questo farmaco si è sviluppata molto precocemente.

1.4.3 Atovaquone

Grazie alla sua somiglianza strutturale con il coenzima Q (ubiquinone), l'atovaquone interferisce con il trasferimento degli elettroni prodotti durante la sintesi delle pirimidine. Tale meccanismo d'azione si esplica attraverso l'inibizione della **citocromo c reduttasi**, un complesso enzimatico facente parte della catena di trasporto degli elettroni nei mitocondri.

Anche per questo farmaco la resistenza, sviluppatasi rapidamente, è determinata dalla presenza di mutazioni nel gene che codifica per il citocromo b, uno dei componenti della citocromo c reduttasi. Per ovviare alla diffusione di questa resistenza, l'atovaquone viene utilizzato in associazione all'antifolato proguanil (Malarone) (Hyde *et al.*, 2002), anche se l'uso è comunque limitato dall'elevato costo.

1.4.4 Derivati dell'artemisinina

L'artemisinina è un principio attivo estratto da una pianta cinese (*Artemisia annua L.*) usata da millenni per il trattamento delle febbri malariche. I derivati semi-sintetici dell'artemisinina (artemether, arteeter, artesunato) vengono tutti metabolizzati a di-idro-artemisinina (DHA), un principio attivo che agisce rapidamente contro gli stadi asessuati del parassita, impedendo il sequestro del parassita nei capillari cerebrali (Ridley *et al.*, 2002). La molecola dell'artemisinina agisce sia sulla fase schizogonica che su quella gametocitica. L'OMS raccomanda l'uso di terapie combinate a base di artemisinina (ACTs) come prima linea di trattamento per casi di malaria non complicata da *P. falciparum* multifarmaco-resistente e attualmente le ACTs sono il trattamento di scelta nella maggioranza delle aree endemiche.

Sfortunatamente, anche nei confronti di questa classe di farmaci il plasmodio sta sviluppando resistenza.

Le prime evidenze dell'esistenza di fenotipi artemisinino-resistenti derivano da studi condotti in trials effettuati al confine tra Cambogia e Thailandia in cui si dimostra una diminuita sensibilità del parassita all'artemisinina (Noedl *et al.*, 2008; Dondorp *et al.*, 2009).

In seguito a questi studi l'OMS, in collaborazione con i programmi nazionali di controllo della malaria e diversi partner, ha avviato un progetto di contenimento (Global Plan for

Artemisinin Resistance Containment, GPARC) con l'obiettivo di arrestare la diffusione di parassiti artemisinino-resistenti attraverso l'eradicazione, in quest'area, dei ceppi di *P. falciparum* resistenti. Questo intervento radicale ha avuto un'importanza cruciale dal momento che ancora oggi non sono disponibili altri farmaci antimalarici che offrono la stessa efficacia e la tollerabilità dei derivati dell'artemisinina e non esistono alternative per l'immediato futuro. Nel 2014, la presenza di mutazioni nel gene *k13-propeller* è stata associata alla resistenza in vitro e in vivo all'artemisinina (Ariey *et al.*, 2014).

1.5 Resistenza ai farmaci antimalarici

Uno dei maggiori ostacoli al controllo, al trattamento ed all'eliminazione della malaria è rappresentato dalla diffusione della farmacoresistenza di *Plasmodium falciparum*. La recente comparsa della resistenza all'artemisinina ed ai suoi derivati nel Sud-Est Asiatico pone una preoccupante minaccia per la salute globale, dal momento che ad oggi questa classe di farmaci rappresenta l'ultimo valido approccio terapeutico.

La resistenza nei confronti dei primi farmaci antimalarici è emersa sin dai primi anni '50, al confine tra la Cambogia e la Thailandia, diffondendosi poi in tutte le aree endemiche del Sud America, fino a raggiungere quasi tutta l'Asia, l'Oceania e l'Africa entro la fine degli anni '80, contribuendo così a causare un aumento

dell'incidenza della morbidità e mortalità infantile.

La resistenza *de-novo* ai farmaci antimalarici si manifesta in seguito all'insorgenza di mutazioni spontanee o duplicazioni geniche che inducono prima una ridotta suscettibilità al farmaco, poi la completa tolleranza a questo. Per avere successo, le alterazioni geniche che conferiscono resistenza non dovrebbero influenzare in larga misura la fitness del parassita (White *et al.*, 2004; Barnes and White 2005). Le mutazioni legate alla farmacoresistenza possono insorgere a diversi livelli: all'interno dell'ospite definitivo (la zanzara, ovvero durante la fase sessuata del parassita), durante lo stadio epatico pre-eritrocitario, o durante lo stadio asessuato eritrocitario dell'ospite intermedio (l'uomo). Con maggiore probabilità, in condizione di elevata parassitemia, popolazioni clonali di parassiti resistenti emergono durante lo stadio asessuato del parassita in pazienti con concentrazioni sub-terapeutiche di farmaco (Pongtavornpinyo *et al.*, 2009).

Nonostante l'Africa Sub-Sahariana rappresenti un'area ad alta trasmissione malarica, con un elevato numero di parassiti di *Plasmodium falciparum* circolanti ed un elevato numero di eventi genetici spontanei, la storia dimostra che la resistenza ai farmaci antimalarici è emersa e si è stabilita con maggiore successo nelle aree con livelli di trasmissione più bassi. In particolare, negli ultimi decenni, il Sud-Est Asiatico ha rappresentato la culla dell'insorgenza della farmacoresistenza a tutti i farmaci antimalarici: alla cloroquina (Eyles *et al.*, 1963; Young *et al.*, 1963), alla sulfadossina-pirimetamina (Hofler *et al.*, 1980;

Hurwitz *et al.*, 1981), alla meflochina (Boudreau *et al.*, 1982; Smithuis *et al.*, 1993), e più recentemente all'artemisinina (Noedl *et al.*, 2008; Dondorp *et al.*, 2009) e alla piperachina (Leang *et al.*, 2013; Saunders *et al.*, 2014).

Un'importante ragione di questo apparente freno all'insorgenza della resistenza in aree endemiche ad elevata trasmissione, risiede nell'immunità dell'ospite intermedio, la quale contribuisce alla clearance dei parassiti parzialmente resistenti, rendendo i soggetti infetti capaci di contenere l'infezione senza manifestarne i sintomi. In conseguenza all'asintomaticità dell'infezione, la pressione selettiva del farmaco viene diluita. Inoltre, in queste aree endemiche ad elevata trasmissione malarica, le infezioni sono di tipo poli-clonale. Nel vettore, durante le divisioni meiotiche, si verificano ricombinazioni genetiche che risultano in una maggiore diversità clonale, la quale impedisce agli alleli mutati di essere fissati nella popolazione (Jiang *et al.*, 2011; Takala-Harrison and Laufer, 2015).

Al contrario, nelle aree a bassa trasmissione, dove le infezioni poli-clonali sono rare, gli individui risultano meno pre-immuni, maggiormente inclini ad essere sintomatici, e di conseguenza, ad essere trattati con farmaci di probabile scarsa qualità, con trattamenti farmacologici incompleti o monoterapie. Nel Sud-Est Asiatico, le popolazioni plasmodiali sono altamente strutturate, omogenee, e soggette ad un alto numero di eventi di inbreeding (Miotto *et al.*, 2013). Inoltre, disordini genetici eritrocitari, quali le emoglobinopatie e il difetto dell'enzima glucosio-6-fosfato

deidrogenasi, altamente prevalenti nelle popolazioni del Sud-Est Asiatico, potrebbero aver contribuito alla selezione di parassiti meno suscettibili allo stress ossidativo, un meccanismo patologico cellulare indotto da una vasta gamma di farmaci antimalarici negli eritrociti parassitati (Becker *et al.*, 2004).

I meccanismi di resistenza alle diverse classi di farmaci antimalarici sono simili a quelli per gli antibiotici o chemioterapici; una non adeguata somministrazione del farmaco, la scarsa qualità, l'uso spesso disinformato ed estensivo dello stesso può favorire l'insorgenza di ceppi plasmidiali farmaco-resistenti. Nei primi anni '60, la pirimetamina e successivamente la cloroquina venivano regolarmente aggiunti al sale da cucina come strategia preventiva antimalarica in Cambogia, producendo una massiva pressione selettiva a vantaggio di cloni plasmidiali farmaco resistenti (Verdrager *et al.*, 1986).

1.5.1 Metodi di monitoraggio

L'emergenza della resistenza legata ai farmaci antimalarici è un processo dinamico, in continua evoluzione. Per limitare la diffusione e l'enorme impatto globale di questo fenomeno, è necessario effettuare una costante attività di sorveglianza della resistenza per garantire l'efficacia terapeutica dei farmaci correntemente utilizzati, ed essere così in grado di definire adeguate strategie di profilassi e di trattamento.

Ad oggi, per effettuare il monitoraggio, esistono tre approcci,

diversi e complementari tra loro: studi *in vivo* di efficacia terapeutica (TES), saggi *in vitro* e/o *ex vivo* di suscettibilità ai farmaci, e saggi di biologia molecolare rivolti all'identificazione di mutazioni geniche e/o a variazioni nell'espressione di un gene. Gli studi di efficacia terapeutica rappresentano il gold standard per il monitoraggio della resistenza agli antimalarici: permettono di ottenere informazioni sull'efficacia del farmaco in esame direttamente sul paziente. Questi studi, tuttavia, sono di difficile realizzazione in quanto richiedono l'arruolamento di un elevato numero di persone che devono essere monitorate clinicamente ad intervalli di tempo regolari, condizione questa spesso complicata nei paesi endemici. Inoltre, i risultati del trattamento possono talvolta essere confusi da diversi fattori, come l'immunità acquisita, l'aderenza al trattamento, lo stato nutrizionale, la gravidanza e la farmacogenetica (Price *et al.*, 2007).

I saggi *in vitro* e/o *ex vivo* sono degli strumenti di ricerca che permettono di determinare la suscettibilità (degli isolati o ceppi) di *P. falciparum* ai farmaci antimalarici e in associazione ai risultati derivanti dagli studi clinici, forniscono informazioni di carattere fenotipico ed epidemiologico. Questo tipo di approccio richiede la messa in coltura degli isolati plasmodiali, siano essi collezionati da paziente (*ex vivo*), o ceppi di laboratorio adattati alla coltura (*in vitro*). La valutazione viene effettuata esponendo i parassiti a concentrazioni crescenti di farmaco, per un periodo di tempo relativamente breve, 48 ore. La suscettibilità viene espressa come concentrazione inibente, IC₅₀ o IC₉₀, definita come la minima

concentrazione di farmaco necessaria ad inibire la crescita del 50 o 90% della popolazione plasmidiale trattata rispetto ad un controllo non esposto al farmaco (Basco *et al.*, 2007; Witkowski *et al.*, 2013). Inoltre, i saggi *in vitro* contribuiscono ad identificare precocemente l'insorgenza di resistenza, così come risultano di particolare utilità nello sviluppo di nuovi farmaci e nella validazione di geni candidati ad essere impiegati come marcatori molecolari di farmaco resistenza. Il maggior vantaggio nell'utilizzo dei test di suscettibilità *in vitro* è rappresentato dall'affidabilità dei risultati calcolati, in quanto questi dipendono esclusivamente dalla risposta del parassita al farmaco, e non sono influenzati da fattori come l'immunità acquisita, la biodisponibilità o la farmacocinetica (basso assorbimento del farmaco o alterazioni metaboliche) (Woodrow *et al.*, 2013). Tuttavia, anche per questo approccio, una delle limitazioni è rappresentata dall'impossibilità, per molti laboratori presenti in aree endemiche, di effettuare saggi di questo genere mancando spesso strutture, strumentazioni, personale specializzato e risorse adeguate. In aggiunta, per alcune classi di farmaci, i test *in vitro* classici possiedono una ridotta sensibilità nell'identificazione di parassiti resistenti: è questo il caso dei derivati dell'artemisinina, per cui è stato ideato il saggio RSA (ring-stage survival assay). In questo saggio i parassiti allo stadio di trofozoita ad anello, da 0 a 3 ore post-invasione, vengono esposti ad una concentrazione di 700 nM di diidroartemisinina per 6 ore. Al termine di questo breve arco temporale, l'esposizione al farmaco viene interrotta, ed i parassiti vengono incubati a 37°C per

ulteriori 66 ore, al fine di valutare la sopravvivenza della popolazione plasmidiale trattata dopo 72 ore finali dall'inizio del saggio (Witkowski *et al.*, 2013).

I saggi di biologia molecolare hanno permesso una migliore comprensione dell'emergenza e della diffusione della resistenza legata ai farmaci antimalarici. Negli ultimi decenni, con questo approccio, sono stati descritti diversi patterns di resistenza adottati dai più utilizzati farmaci antimalarici: spesso questi sono correlati alla presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (single nucleotide polymorphisms, SNPs) o ad un'alterata espressione dei geni che codificano per le proteine bersaglio (copy number variation, CNV) (Picot *et al.*, 2009). Con l'approccio molecolare, sono stati sviluppati vari metodi per valutare la farmaco resistenza. Le prime ricerche effettuate hanno portato all'identificazione di due geni, *Pfcr1* (*Plasmodium falciparum* chloroquine-resistance transporter) e *Pfmdr1* (*Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 gene), e alle corrispettive proteine coinvolte nel trasporto di membrana a livello del vacuolo digestivo di *P. falciparum*, correlate alla resistenza alla cloroquina (Foote *et al.*, 1990; Fidock *et al.*, 2000; Djimdé *et al.*, 2001). La resistenza alla combinazione sulfadossina/pirimetamina è stata associata a mutazioni puntiformi nel gene *Pfdhfr* (*Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase) (Peterson *et al.*, 1990; Reeder *et al.*, 1996) e nel gene *Pfdhps* (*Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthetase) (Wang *et al.*, 1997), mentre mutazioni nel gene *Pfmdr1* sono state associate alla resistenza alla

meflochina (Cowman *et al.*, 1994; Price *et al.*, 2004). SNPs nel gene *Pfcytb* (*cytochrome b*) di *P.falciparum* sono associati alla resistenza all'atovaquone (Korsinczky *et al.*, 2000), e solo recentemente la resistenza alla piperachina è stata collegata ad un'alterata espressione dei geni *plasmepsina II* e *III* (Witkowski *et al.*, 2017). Di recente identificazione è anche l'associazione di mutazioni puntiformi nel gene *kelch propeller*, localizzato sul cromosoma 13, alla ridotta suscettibilità di *P.falciparum* all'artemisinina. Nelle infezioni da *P. falciparum* è di notevole importanza la possibilità di poter distinguere tra eventi di "reinfezione" o di "recrudescenza". Nell'attuale protocollo di valutazione di efficacia terapeutica, l'OMS raccomanda la sistematica genotipizzazione degli isolati plasmodiali responsabili dell'infezione tramite l'analisi di almeno tre geni polimorfici: *msp1* (*merozoite surface protein 1*), *msp2* (*merozoite surface protein 2*) e *glurp* (*glutamate rich protein*) (WHO, 2009). Profili genetici identici confermano eventi di recrudescenza, mentre profili differenti sono indicativi di re-infezioni. I risultati della genotipizzazione sono rilevati da un gel di agarosio, il che rende l'interpretazione del risultato soggetta alla qualità del gel stesso e all'esperienza del ricercatore (Mugittu *et al.*, 2006). Inoltre, questo approccio risulta talvolta poco accurato nell'analisi di campioni provenienti da aree ad elevata trasmissione visto l'alta probabilità di incorrere in infezioni multi-clonali (Greenhouse *et al.*, 2007). Per questa ragione, per distinguere tra recrudescenze e infezioni *de novo*, sono stati sviluppati altri metodi molecolari basati

sull'utilizzo di microsatelliti ed elettroforesi capillare (Falk *et al.*, 2006; Liljander *et al.*, 2009).

In conclusione, i saggi di biologia molecolare possono rappresentare una efficace strategia di sorveglianza globale della resistenza ai farmaci antimalarici considerando che, essendo più facilmente standardizzabili, permettono il confronto dei dati ottenuti in studi diversi e rappresentano, quindi, un'effettiva fonte di informazioni sullo sviluppo e la diffusione della farmacoresistenza nei plasmodi malarici.

1.5.2 **Marcatore molecolari associati alla farmaco-resistenza**

Pfcr, *Plasmodium falciparum* *chloroquine-resistance transporter*

Il gene *Pfcr* è localizzato sul cromosoma 7, e codifica per un proteina coinvolta nel trasporto di membrana a livello del vacuolo digestivo di *P.falciparum*.

La mutazione al codone 76 (K → T), spesso associata a mutazioni non sinonime ai codoni 72, 74, o 75, è il primo mediatore di resistenza legata alla cloroquina, indotta da un aumento dell'efflusso del farmaco dal vacuolo digestivo del parassita che ne impedisce l'interazione con il suo target (Sanchez *et al.*, 2007). Esperimenti di laboratorio hanno dimostrato che mutazioni nel gene *Pfcr* sono spesso associate ad una diminuita suscettibilità dei parassiti alla mono-desetil-amodiachina, MDA (SVMNT, 7G8

allele) e al chinino (Cooper *et al.*, 2007; Tinto *et al.*, 2008), e mediano, inoltre, un aumento della suscettibilità alla meflochina e all'artemisinina. In Africa, dove le mutazioni della *Pfcr1* erano fissate nella popolazione plasmodiale, è stato osservato un aumento della frequenza degli alleli wild type dopo la sospensione dell'utilizzo di cloroquina come trattamento della malaria non complicata da *P.falciparum* (Laufer *et al.*, 2006; Noranate *et al.*, 2007). In Sud America, dove l'aplotipo SVMNT non è fissato, la sostituzione amminoacidica di una cisteina in arginina (C → R) al codone 350 è responsabile sia dell'aumento della suscettibilità alla cloroquina che della resistenza alla piperachina (Pelleau *et al.*, 2015).

Pfmdr1, Plasmodium falciparum multidrug resistance 1

Il gene *Pfmdr1* è localizzato sul cromosoma 5, e codifica per una proteina ABC, ATP-binding cassette, omologa della glicoproteina P. Il gene *mdr1* si trova sulla membrana del vacuolo digestivo, ed è coinvolto nella modulazione della suscettibilità a diversi farmaci antimalarici e più in dettaglio all'efflusso di farmaci idrofobici come la meflochina e i derivati dell'artemisinina caratterizzati, nella loro struttura, dalla presenza di un legame endoperossido. (Duraisingh and Cowman, 2005). I meccanismi di resistenza sono associati a:

- i. Aumentato numero di copie del gene *Pfmdr1*, con conseguente aumentata espressione della proteina MDR, e

resistenza alla meflochina, lumefantrina, chinino e artemisininici (Cowman *et al.*, 1994, Pickard *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2006)

- ii. mutazioni ai codoni 86 (N → Y) e 1246 (D → Y), descritte in Africa, le quali mediano una ridotta suscettibilità alla cloroquina e all'amodiachina, ma un aumento della sensibilità alla lumefantrina, alla meflochina e ai derivati dell'artemisinina (Duraisingh *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2000; Mwai *et al.*, 2009), o a mutazioni ai codoni 1043 (C → S) e 1042 (N → D), osservate al di fuori del continente africano, che sono state associate con un'alterata sensibilità alla lumefantrina, meflochina e artemisinina (Reed *et al.*, 2000; Pickard *et al.*, 2003; Sidhu *et al.*, 2005, 2006). Effetti opposti sono stati descritti tra la cloroquina e la meflochina: la mutazione N86Y diminuisce la suscettibilità alla cloroquina, ma induce un aumento della sensibilità alla meflochina (Duraisingh and Cowman, 2005). Similmente, un elevato numero di copie di *Pfmdr1* aumenta la resistenza alla meflochina, e la sensibilità alla cloroquina e alla piperachina (Leang *et al.*, 2013, 2015; Duru *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2015; Amaratunga *et al.*, 2016).

Pfdhfr, Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase

Il gene è localizzato sul cromosoma 4, e codifica per un enzima

che è coinvolto nella via di sintesi dei folati (Foote and Cowmani, 1994; Gregson and Plowe, 2005). L'enzima DHFR è il target dei farmaci antifolati come la pirimetamina e il proguanil (metabolizzato *in vivo* nella forma attiva cicloguanil). I farmaci antifolati agiscono inibendo l'attività dell'enzima DHFR, bloccando la sintesi della pirimidina e la replicazione del DNA del plasmodio (Hankins *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2001). L'accumulo di diverse e specifiche mutazioni non sinonime nel gene *Pfdhfr* provoca un aumento degli indici di fallimento terapeutico, ed una ridotta suscettibilità *in vitro* alla pirimetamina (N51I, C59R, S108N e I164L) e al cicloguanil (A16V, S108T).

Pfdhps, Plasmodium falciparum dihydrofolate synthase

Localizzato sul cromosoma 8, il gene *Pfdhps*, codifica per l'enzima diidrossifolato sintasi, un importante enzima specifico di *P.falciparum*, che catalizza la seguente reazione nella via biosintetica dei folati: acido p-amminobenzoico + 6-idrossimetil-diidropteridina → acido diidropterico (Triglia *et al.*, 1994). La resistenza alla sulfadossina dipende dall'accumolo di specifiche mutazioni puntiformi nel gene *Pfdhps* ai codoni 436 (S → A), 437 (K → G), 540 (K → E), 581 (A → G), 613 (A → S/T) (Hyde *et al.*, 2002; Gregson and Plowe, 2005). La presenza di mutazioni nei geni *Pfdhps* e *Pfdhfr* è strettamente correlata ad un aumentato indice di fallimento terapeutico in pazienti trattati con la combinazione di sulfadossina-pirimetamina, ampiamente

utilizzata in Africa nella strategia di trattamento preventivo intermittente (IPTp) in donne in gravidanza (Kublin *et al.*, 2002). Con maggiore frequenza, la combinazione dell'aplotipo doppio mutante A437G e K540E nel gene *Pfdhps*, con l'aplotipo triplo mutante N51I, C59R e S108N nel gene *Pfdhfr* è ampiamente diffusa nell'Africa orientale con una frequenza uguale o maggiore del 70% (Pearce *et al.*, 2009; Naidoo and Roper, 2010).

Pfcytb, Plasmodium falciparum cytochrome b

Il gene *Pfcytb* localizza sul genoma mitocondriale di *P.falciparum*, e codifica per il complesso mitocondriale della citocromo *bc1* coinvolto nel trasporto degli elettroni e nella sintesi dell'ATP; questo gene rappresenta il target dell'atovaquone (Fry and Pudney, 1992; Birth *et al.*, 2014; Siregar *et al.*, 2015). La presenza di mutazioni puntiformi al codone 268 (Y → N/S/C) diminuisce significativamente la suscettibilità all'atovaquone (Korsinczky *et al.*, 2000; Fivelman *et al.*, 2002; Färnert *et al.*, 2003) in combinazione con il proguanil (nome commerciale Malarone) correntemente utilizzato nel trattamento preventivo dei viaggiatori verso l'Africa (Kain *et al.*, 2001). Le mutazioni al codone 268 sono state raramente descritte in isolati di campo, mentre sono spesso selezionate in pazienti che hanno mostrato un fallimento terapeutico con la combinazione di atovaquone-proguanil (Musset *et al.*, 2007; Nuralitha *et al.*, 2015).

Pfk13, Plasmodium falciparum kelch 13

Studi di whole genome-sequencing (WGS) condotti su isolati cambogiani e su ceppi di laboratorio artemisinino-resistenti hanno permesso di determinare l'associazione della resistenza all'artemisinina a specifiche mutazioni nella proteina K13, appartenente alla super famiglia delle proteine Kelch. La proteina Kelch svolge un ampio numero di funzioni biologiche, una delle quali è facilitare la poli-ubiquitinazione, un processo biochimico che promuove la degradazione delle proteine all'interno del proteosoma (Dogovski *et al.*, 2015; Mbengue *et al.*, 2015). Nei parassiti con mutazioni a carico della proteina Kelch, è possibile osservare bassi livelli di proteine ubiquitinate (Dogovski *et al.*, 2015). In aggiunta, nei parassiti con la proteina Kelch mutata, la ridotta ubiquitinazione della fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) e del legame alla proteina Kelch, è responsabile della diminuita proteolisi della proteina e dell'aumento dei livelli di chinasi e del suo prodotto lipidico (PI3P, fosfatidilinositolo-3-fosfato). Elevati livelli di PI3P sono stati associati alla minore suscettibilità di parassiti di *P.falciparum* all'artemisinina (Mbengue *et al.*, 2015). Ulteriori studi di WGS hanno permesso di associare la resistenza all'artemisinina a specifiche caratteristiche genetiche proprie delle popolazioni plasmodiali asiatiche (Miotto *et al.*, 2015).

Tutte le mutazioni osservate nel gene *Pfk13* correlate alla resistenza all'artemisinina, sono mutazioni non sinonime e localizzano dopo il codone 440 nel dominio propeller del gene

(k13-propeller) (Ariey *et al.*, 2014; Straimer *et al.*, 2015; Ménard *et al.*, 2016). In Asia, è stata dimostrata la netta correlazione genetica tra la presenza di queste specifiche mutazioni all'intero del dominio propeller del gene *k13* alla ridotta clearance dei parassiti di *P. falciparum* (emivita più lunga di 5 ore) (Ashley *et al.*, 2014; Ariey *et al.*, 2014; Mohon *et al.*, 2014; Takala-Harrison *et al.*, 2014; Miotto *et al.*, 2015; Ménard *et al.*, 2016). In Myanmar, tra le mutazioni osservate nel gene *Pfk13*, gli SNPs ai codoni 580 (C → Y) e 476 (M → I), sono stati associati alla diminuita clearance dei parassiti di *P.falciparum* (Nyunt *et al.*, 2015).

Ad oggi, sono state descritte in tutto il mondo quasi 200 mutazioni a carico del gene *k13*. Nel Sud-Est Asiatico, le mutazioni ai codoni C580Y, R539T, Y493H e I543T sono largamente diffuse tra la Cambogia, il Vietnam e il Laos, mentre quelle ai codoni C580Y, F446L, N458Y, P574L e R561H caratterizzano l'area tra la Thailandia occidentale, il Myanmar e la Cina. In particolar modo, il cambiamento amminoacidico al codone 580 di una cisteina in tirosina è ampiamente diffuso in tutto il Sud-Est Asiatico.

In Africa sono state osservate un'ampia gamma di mutazioni non sinonime, con frequenze molto basse, ma nessuna di queste è stata associata alla resistenza clinica all'artemisinina, accertata al terzo giorno di monoterapia con artesunato (Ménard *et al.*, 2016).

1.6 Scopo della tesi

La malaria rappresenta la più importante parassitosi umana, nonché un problema di salute pubblica mondiale. L'agente eziologico della malaria è il *Plasmodium*, protozoo del Phylum Apicomplexa. Cinque sono le specie di plasmodio patogene per l'uomo: *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. knowlesi*. La prima, *Plasmodium falciparum*, è quella associata alla sintomatologia clinica più grave. Per più di 350 anni, il chinino è stato il farmaco di scelta per il trattamento della malaria, fino a quando la sua efficacia è stata intaccata dalla comparsa di molti ceppi di *Plasmodium falciparum* resistenti. Nel tempo diverse strategie terapeutiche si sono susseguite, ma l'insorgenza della farmaco-resistenza ne ha puntualmente minato la loro efficacia, rendendo di estrema urgenza la necessità di trovare una strategia farmacologica sostitutiva. L'ultima formulazione terapeutica introdotta, di accertata efficacia e sicurezza, è stata rappresentata dall'artemisinina, un sesquiterpene lattone estratto dalla pianta medicinale cinese *Artemisia annua L.*, per il trattamento di pazienti con malaria non complicata da *P. falciparum*, somministrata in combinazione con un farmaco antimalarico partner (ACT, artemisinin-based combination therapy). Purtroppo, anche in questo caso, l'emergenza della resistenza all'artemisinina non ha tardato a fare la sua comparsa, sviluppandosi e diffondendosi in molte zone del Sud-Est Asiatico. L'estensione geografica del

problema potrebbe rapidamente ampliarsi e comportare conseguenze importanti per la salute pubblica mondiale. Grazie ad uno studio pubblicato nel 2014, Arieu *et al.*, hanno identificato diverse mutazioni nel gene *k13* di *P. falciparum* associate alla resistenza a questo farmaco, rendendo disponibile, per la prima volta nella lunga lotta alla malaria, un marcatore molecolare utile a tener traccia della comparsa e diffusione della resistenza all'artemisinina prima che questa si diffonda in altre aree ad endemia malarica, come è storicamente accaduto per le diverse strategie terapeutiche adottate. Ad oggi, non esiste un farmaco antimalarico alternativo con lo stesso livello di efficacia e tollerabilità dell'ACT; è per questa ragione che il principale obiettivo di numerosi gruppi di ricerca è quello di effettuare un regolare e costante monitoraggio della resistenza legata all'artemisinina e agli altri farmaci antimalarici, al fine di fornire adeguate politiche farmacologiche di trattamento e profilassi antimalarica. Lo scopo di questa tesi è dunque stato quello di svolgere un'attività di sorveglianza molecolare della resistenza associata ai derivati sintetici dell'artemisinina [diidroartemisinina (DHA), artesunato e artemether] e di altri farmaci antimalarici utilizzati come partner nella terapia combinata a base di artemisinina in isolati di *Plasmodium falciparum* provenienti da diverse aree endemiche africane.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Campioni Biologici

I campioni biologici utilizzati nella presente tesi sono stati ottenuti da pazienti con infezione malarica da *P. falciparum* microscopicamente diagnosticata, non trattati con farmaci antimalarici, e provenienti da quattro diverse aree endemiche dell’Africa Sub-Sahariana: Camerun, Eritrea, Botswana e Guinea Conakry. La realizzazione di questo studio multicentrico è stata possibile grazie alla collaborazione dei diversi partners coinvolti. Il sangue del paziente è stato prelevato tramite puntura del polpastrello, e raccolto su carta da filtro in triplicato. I campioni raccolti sono stati adeguatamente mantenuti in bustine di plastica ed opportunamente conservati fino al loro processamento. La raccolta dei campioni di sangue è stata effettuata dopo aver ottenuto il consenso informato da parte del paziente o del tutore legale, e le rispettive approvazioni dei diversi comitati etici per ogni paese coinvolto. Per ognuno dei campioni raccolti sono state svolte analisi di biologia molecolare tramite estrazione del DNA totale del parassita, utilizzando appositi Kit di estrazione secondo le istruzioni del produttore. I dettagli relativi ad area e modalità di campionamento per i quattro siti di studio analizzati saranno descritti nel paragrafo dei risultati, ritenendo questa organizzazione strutturale più adeguata alla migliore comprensione dei risultati ottenuti per ciascun paese.

2.2 Estrazione del DNA plasmodiale

Il DNA totale degli isolati clinici di *P. falciparum* è stato estratto da campioni di sangue raccolti su tre dischetti di carta da filtro da 3 mm ciascuno. La procedura di estrazione del DNA è stata realizzata attraverso l'utilizzo del Kit PureLink Genomic DNA dell'Invitrogen, che si basa sull'impiego di specifiche colonnine di estrazione, come descritto nel protocollo "Blood Spots" consigliato dalla ditta produttrice. Brevemente, i dischetti vengono tagliati in piccoli pezzi e trasferiti all'interno di una provetta eppendorf a cui vengono aggiunti 180 µl di tampone di digestione e 20 µl di proteinasi K per la digestione delle proteine; la miscela viene incubata per 30 minuti a 55 °C, ed in seguito, vengono aggiunti 200 µl di buffer di lisi e 200 µl di etanolo per favorire la liberazione del DNA ed il suo legame alla membrana della colonnina di estrazione nella quale viene trasferita. Dopo due lavaggi con 500 µl di specifici tamponi, il DNA totale del parassita viene eluito in 150 µl di buffer di eluizione, poi adeguatamente conservato a -20°C. Per l'estrazione di DNA dei campioni eritrei è stato utilizzato il Kit QIAmp della Qiagen, che sfrutta allo stesso modo l'utilizzo di specifiche colonnine per l'estrazione di DNA.

2.3 Tecniche di analisi

Le tecniche di biologia molecolare maggiormente utilizzate in questo lavoro di tesi per la diagnosi molecolare di specie, la genotipizzazione degli isolati e l'amplificazione dei geni marcatori di farmaco-resistenza in *P. falciparum* sono state la PCR, la nested-PCR, la Real-time (RT)-PCR, e la PET-RT-PCR, descritte di seguito.

2.3.1 PCR

La PCR, polymerase chain reaction, è una tecnica biomolecolare messa a punto nel 1986 (Mullis *et al.*, 1986) che permette l'amplificazione esponenziale *in vitro* di sequenze di acidi nucleici, tipicamente dalle 200 alle 1200 coppie di basi. È un processo innescato dalla presenza di una coppia di primers, le cui sequenze possono essere progettate *ex-novo* o rintracciate in rete tramite pubblicazioni scientifiche o banche dati. La reazione di PCR è un processo ciclico caratterizzato dalla fase di denaturazione del DNA durante la quale i filamenti di DNA a doppia elica si separano in filamenti singoli in seguito ad un aumento di temperatura fino a 94 °C, dall'appaiamento dei primers oligonucleotidici complementari all'estremità 3' della sequenza da amplificare ai filamenti a singola elica del DNA stampo, e dalla sintesi dei nuovi filamenti di DNA operata dall'enzima DNA

polimerasi in direzione 5' ad una temperatura intorno ai 70 °C (Innis *et al.*, 1990).

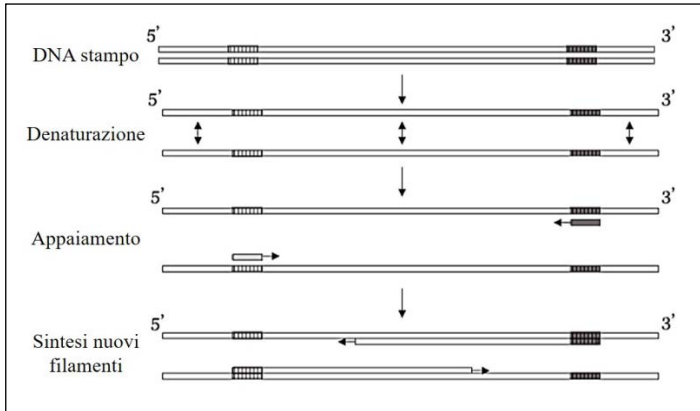


Fig 2.3- Rappresentazione schematica del processo di PCR

I prodotti di amplificazione vengono visualizzati su un gel di agarosio (dall' 1,5% al 3%) colorato con Bromuro di Etidio o Gel Red, e valutate in base all'amplificazione del DNA di controllo.

2.3.2 Nested PCR

La nested-PCR è una tecnica di biologia molecolare basata su due reazioni di amplificazione consecutive: la seconda amplificazione è effettuata mediante l'utilizzo di una coppia di primers che riconosce e lega una regione del DNA target più interna rispetto a

quella riconosciuta dai primers della prima reazione di amplificazione. La nested-PCR permette di ottenere una maggiore specificità e/o sensibilità rispetto alla singola reazione della prima PCR. Nella nested, un'aliquota di prodotto della PCR viene utilizzato come stampo per la seconda reazione (Fig.2.3.1); se il prodotto della prima amplificazione fosse aspecifico, è improbabile che questo venga amplificato nella nested-PCR.

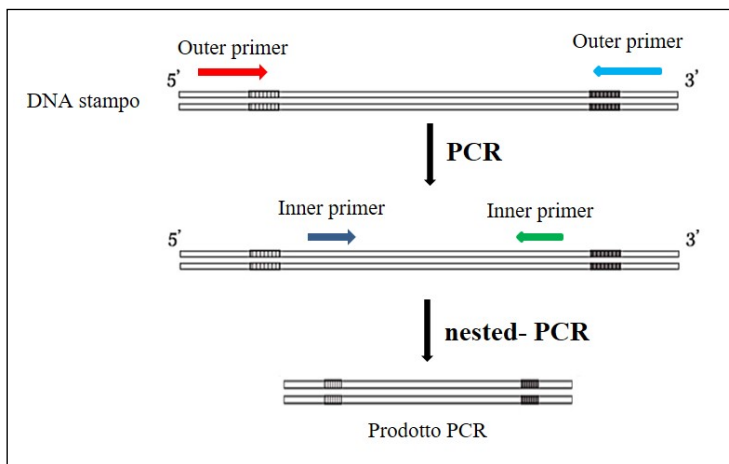


Fig 2.3.1 - Rappresentazione schematica del processo di nested-PCR

2.3.3 Real-Time PCR

La real-time PCR (RT-PCR) è una tecnica di biologia molecolare di tipo quantitativo che permette, in tempo reale, la valutazione della concentrazione di DNA ad ogni ciclo di amplificazione.

Come accade durante una classica PCR, il DNA stampo viene amplificato ad opera di una DNA-polimerasi. In questo caso però, il segnale di amplificazione registrato è quello emesso da molecole fluorescenti, chiamate fluorofori, che legano il DNA ad ogni ciclo di amplificazione. I fluorofori possono essere intercalanti del DNA, oppure marcatori di sonde oligonucleotidiche complementari a specifiche sequenze. I fluorofori emettono un segnale soltanto quando sono incorporati nei filamenti di DNA neosintetizzati. Il fluoroforo più utilizzato è il SYBER[®]Green, ovvero un intercalante del DNA che assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda pari a 488nm, ed emette luce verde ad una lunghezza d'onda di 522 nm. Nella fase di denaturazione, questa molecola si trova libera nella miscela di reazione; nella fase di appaiamento si posiziona randomicamente nel solco minore del DNA, e solo durante la fase di elongazione il SYBER Green si intercala nella neo sintetizzata sequenza di DNA, e dopo essere stata eccitata, emette fluorescenza proporzionale alla quantità di DNA prodotta.

Le sonde oligonucleotidiche utilizzate nelle reazioni RT-PCR sono tipicamente di due tipi: idrolitiche e di ibridazione. Entrambe permettono di rilevare un segnale fluorescente soltanto quando si appaiano alla sequenza bersaglio. Le sonde idrolitiche sono caratterizzate dalla presenza, sulla stessa sequenza ma ad estremità opposte, di una fluoroforo ad alta energia, definito “reporter”, e di un inibitore di fluorescenza definito “quencher”. Quando la sonda

si appaia alla sequenza di DNA bersaglio, il quencher è sufficientemente vicino al fluoroforo da bloccarne l'emissione di fluorescenza. Ad ogni ciclo di amplificazione, la DNA-polimerasi idrolizza la sonda liberando il reporter nella miscela di reazione; allontanandosi dall'inibitore, il reporter emetterà un segnale di fluorescenza. L'attività delle sonde idrolitiche è dunque dipendente dall'azione dell'enzima Taq DNA-polimerasi, tanto da essere definite sonde TaqMan (Fig. 2.3.2).

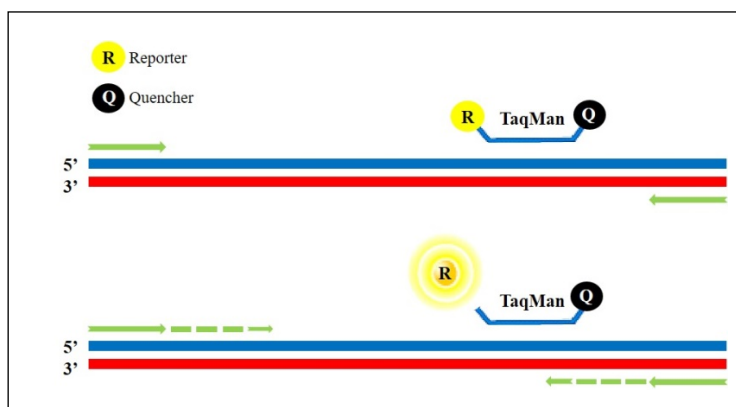


Fig 2.3.2 - Sonda idrolitica TaqMan

Le sonde ad ibridazione, di cui la FRET è la più comunemente utilizzata, sono caratterizzate dalla presenza di una coppia di oligonucleotidi che si ibridano specificamente alla sequenza bersaglio. La sonda FRET sfrutta il trasferimento di energia per

risonanza. In questo caso, l'eccitazione di un fluoroforo donatore induce il trasferimento di energia ad un fluoroforo accettore.

Qualunque sia la sonda utilizzata, il risultato dell'amplificazione di RT-PCR viene valutato in base alla curva di amplificazione corrispondente all'intensità di fluorescenza in funzione dei cicli di PCR. Il segnale di fluorescenza (RFU, unità relativa di fluorescenza) è rilevato da un sistema ottico, ed è proporzionale alla quantità di prodotto amplificato. Dopo i primi cicli di amplificazione, la fluorescenza supera un livello di soglia arbitrario (threshold) e inizia ad aumentare esponenzialmente. Quando la curva di amplificazione incontra la linea di soglia, si definisce il Ct (cycle threshold), ovvero il ciclo della reazione in cui il segnale di fluorescenza del campione incontra la linea di threshold. Il Ct di ogni campione è inversamente proporzionale alla quantità di DNA iniziale: maggiore è il Ct, minore è la quantità del materiale di partenza, e di conseguenza maggiori saranno i cicli di PCR necessari a raggiungere il livello soglia. La curva di amplificazione ha un andamento sigmoide caratterizzato da una fase esponenziale, una lineare e una di plateau in cui termina l'amplificazione e la fluorescenza si stabilizza ad un valore di regime (Fig. 2.3.3).

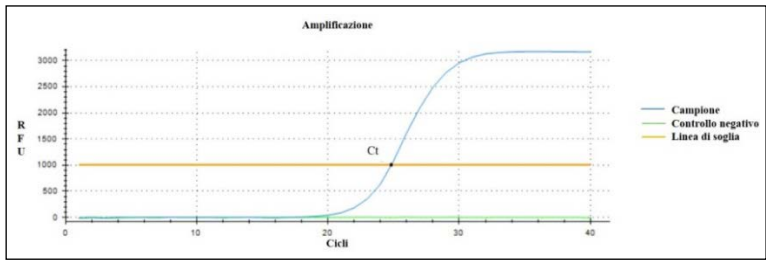


Fig. 2.3.3- curva di amplificazione RT-PCR

2.3.4 PET-RT-PCR

La PET-RT-PCR, photo-induced electron transfer-RT-PCR, è una variante della classica PCR, e viene impiegata nel riconoscimento del genere e delle specie di plasmodio (Lucchi *et al.*, 2013) che mediano l'infezione malarica. Rispetto alla classica, la PET-PCR è una tecnica robusta, economica e rapida: è una reazione multiplex, quindi permette la valutazione contemporanea del genere e della specie di plasmodio infettante in una singola reazione di amplificazione. Nel caso di un'infezione da *P. falciparum*, la PET-PCR rileva fino a 3,2 parassiti per μl , 5 parassiti per μl per infezioni mediate da *P. vivax*, 5,8 e 3,5 parassiti per μl per infezioni da *P. ovale* e *P. malariae* rispettivamente. La miscela di reazione prevede l'utilizzo di primers modificati all'estremità 5' della loro sequenza. L'estremità 5' di uno dei primers è caratterizzata dall'aggiunta di una coda oligonucleotidica di 17 basi marcata specificamente con un fluoroforo, HEX o FAM. In assenza di amplificazione, questa coda

oligonucleotidica forma un anello che rimane in una conformazione chiusa, senza emettere fluorescenza a causa dell'effetto di quenching mediato dalla stretta vicinanza di quattro basi di deossiguanosina, tramite il meccanismo di trasferimento elettronico foto-indotto (PET) (Fig.2.3.5, 1A). In seguito al legame del primer alla sequenza di DNA target, e alla successiva amplificazione dell'acido nucleico, la coda oligonucleotidica ad anello si apre, promuovendo un aumento di fluorescenza dovuta all'allontanamento dei residui di guanosina (effetto de-quenching) (Fig. 2.3.5, 1B).

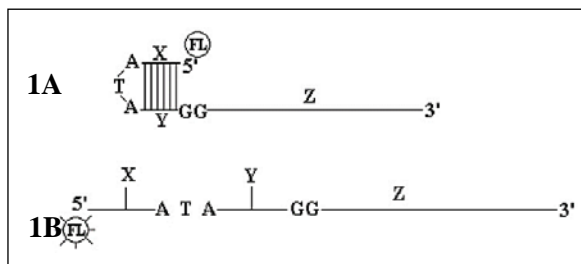


Fig. 2.3.5 – struttura primer PET-PCR

2.4 Protocolli

2.4.1 Diagnosi molecolare di infezione da *Plasmodium* e identificazione di specie

L'identificazione molecolare della specie plasmodiale responsabile dell'infezione malarica è stata effettuata seguendo i protocolli diagnostici descritti in Snounou *et al.*, 1993, tramite le tecniche di PCR e nested-PCR. Per ciascuna specie, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, sono stati utilizzati adeguati controlli positivi di DNA genomico e un controllo negativo di acqua sterile di doppia distillazione. La PCR e la nested-PCR sono state eseguite utilizzando il Kit Econo Taq[®] plus Green 2x Master Mix della Lucigen secondo le istruzioni del produttore. Le sequenze dei primers genere specifici utilizzati nella PCR, e quelle dei primers utilizzati nella nested-PCR sono descritti di seguito in tabella 2.4.1. I prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% con bromuro di etidio e visualizzato con luce UV. La miscela di reazione di PCR genere-specifica è composta da 10 µl di DNA genomico, 0,1 µl di primer reverse, 0,1 µl di primer forward e 12,5 µl di buffer portati a volume finale di 25 µl con 2,3 µl di acqua sterile di doppia distillazione. Il programma impostato nel termociclatore è stato il seguente:

- Amplificazione a 94 °C per un minuto

- Appaiamento a 58 °C per due minuti
- Polimerizzazione a 72 °C per due minuti

Il ciclo è stato ripetuto per 40 cicli.

Nella miscela di reazione nested-PCR specie-specifica sono stati aggiunti 5 µl di prodotto di PCR, 0,1 µl di primer reverse, 0,1 µl di primer forward e 12,5 µl di buffer portati a volume finale di 25 µl con 7.3 µl di acqua sterile di doppia distillazione. Il programma impostato nel termociclatore è stato il seguente:

- Amplificazione a 94 °C per 30 secondi
- Appaiamento a 58 °C per 45 secondi
- Polimerizzazione a 72 °C per un minuto

Il ciclo è stato ripetuto per 40 cicli.

Sequenze	
Outer-PCR	
Forward	5'-TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA-3'
Reverse	5'-CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC-3'
Nested-PCR <i>P. falciparum</i>	
Forward	5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'
Reverse	5'-ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'
Nested-PCR <i>P. vivax</i>	
Forward	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'
Reverse	5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'
Nested-PCR <i>P. malariae</i>	
Forward	5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3'
Reverse	5'-AAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'
Nested-PCR <i>P. ovale</i>	
Forward	5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA-3'
Reverse	5'-ATCTAAGAATTTACCTCTGACATCTG-3'

Tabella 2.4.1- Sequenze primers diagnosi molecolare (Snounou *et al.*, 1993)

I prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% con bromuro di etidio e visualizzato con luce UV.

2.4.1.1 Preparazione gel di agarosio

I prodotti di nested-PCR sono stati separati mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2 % in una soluzione tampone TAE (Tris-Acetato in EDTA) 1X e bromuro di etidio. L'elettroforesi è stata effettuata a 70 V e le bande sono state osservate ponendo il gel su un transilluminatore a luce UV. La dimensione di ciascun frammento è stata determinata riferendosi al marcatore Gel-Ready™ 100 bp DNA Ladder della Lucigen.

2.4.2 Diagnosi molecolare in PET-RT-PCR

La miscela di reazione è composta da 2 µl di DNA genomico, 0,5 µl di primer forward genere specifico, 0,5 µl di primer reverse-FAM genere specifico, 0,5 µl di primer reverse-HEX specie specifico (*P. falciparum*), 0,5 µl di primer forward specie specifico (*P. falciparum*), e 10 µl di buffer ABI TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied BioSystem) portati a volume finale di 20 µl con 6,25 µl di acqua sterile di doppia distillazione. Il programma impostato nel termociclatore è stato il seguente:

- Amplificazione a 95 °C per 20 secondi
- Appaiamento a 63 °C per 40 secondi
- Polimerizzazione a 72 °C per 30 secondi

Il ciclo è stato ripetuto per 45 cicli.

Per l'analisi dei risultati, qualsiasi campione con un valore di Ct uguale o inferiore a 40 è stato considerato positivo.

Sequenze (5'-3')	
<i>Plasmodium</i> genus-specific 18S ssrRNA	
Forward	GGCCTAACATGGCTATGACG
Reverse	FAM- <u>aggcgc</u> atagcgcctgg CTGCCTTCCTTAGATGTGGTAGCT
<i>Plasmodium falciparum</i>	
Forward	ACCCCTCGCCTGGTGTITTT
Reverse	HEX- <u>aggcgc</u> atagcgcctgg TCGGGCCCCAAAATAGGAA

* La coda oligonucleotidica (sottolineata) è attaccata al 5' della sequenza; questa non mostra alcuna omologia con le sequenze di *Plasmodium* spp.

Tabella 2.4.2- sequenze primers PET-RT-PCR

2.4.3 Genotipizzazione

Per identificare la presenza di infezioni sostenute da più cloni di *P. falciparum*, è stato analizzato il gene polimorfico *Pfmsp1* (*Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1), e le rispettive sottofamiglie alleliche K1, MAD20 e RO33, come descritto in Soulama *et al.*, 2009, tramite PCR e visualizzazione dei prodotti di amplificazione su gel di agarosio. Per ognuna delle tre sottofamiglie alleliche è stato utilizzato un appropriato ceppo di controllo, rispettivamente 3D7, HB3 e RO33. La presenza di una singola banda risultante dall'amplificazione delle varie sottofamiglie alleliche è considerata come infezione determinata

da un singolo clone. Le infezioni policlonali sono definite in base alla positività di più di una sottofamiglia allelica per ogni singolo isolato, o dalla presenza, in un isolato, di bande multiple in una o più famiglie alleliche. Attraverso i risultati ottenuti tramite la genotipizzazione, è possibile calcolare la MOI, ovvero la molteplicità d'infezione.

2.4.3.1 Calcolo della Molteplicità di Infezione (MOI)

La molteplicità di infezione (MOI) rappresenta il numero di cloni di plasmodio co-infettanti un singolo ospite. Nelle aree ad endemia malarica, il calcolo della MOI è utilizzato come indicatore dei livelli di trasmissione (Arnot, 1998; Babiker et al., 1999). La MOI viene calcolata dividendo il numero totale di alleli osservati in un marcatore molecolare (*Pfmsp1*, *Pfmsp2* o *Pfglurp*) per il numero totale di campioni positivi per lo stesso marcatore. La media della MOI è calcolata dividendo il numero totale di alleli identificati in tutti i marcatori per il numero totale di campioni positivi per tutti i marcatori molecolari analizzati.

2.4.4 Amplificazione del gene *Pfk13*

Per l'analisi del gene *Pfk13* e l'identificazione di eventuali mutazioni puntiformi nel dominio propeller del gene, rappresentato in figura 2.4.4, è stata amplificata tramite PCR la regione genica compresa tra il codone 427 e il codone 690 descritto in Taylor *et al.*, 2015, come è riportato di seguito. A 10 µl di ciascun campione di DNA estratto, sono stati addizionati 40 µl di una miscela di reazione composta da: 25 µl di buffer Econo Taq® plus Green 2x Master Mix della Lucigen, 0,2 µl di primer forward e 0,2 µl di primer reverse, portati a volume con 14,6 µl di acqua sterile doppio distillata. Il programma di amplificazione utilizzato prevedeva 40 cicli alle seguenti temperature: 1 minuto 94 °C, 1 minuto a 60°C e 2 minuti a 72 °C. I prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% con bromuro di etidio e visualizzato con luce UV. La presenza di eventuali mutazioni nel gene *Pfk13* è stata valutata tramite il sequenziamento con metodo di Sanger presso la Eurofins Genomics (Germania), e l'analisi delle sequenze risultanti tramite l'utilizzo del programma dedicato DSGene 1.5 (Accelrys, Inc).

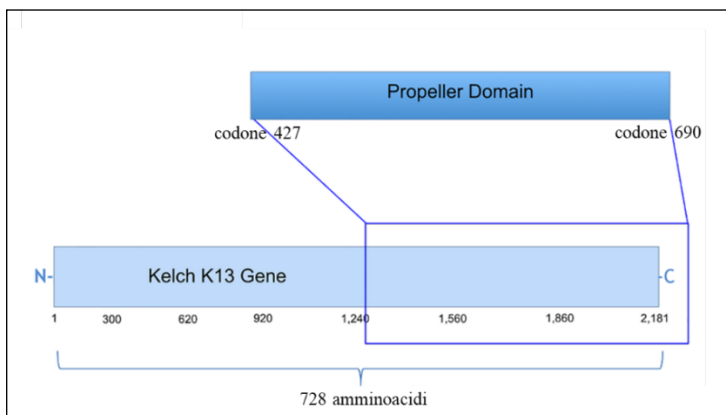


Fig. 2.4.4- Rappresentazione schematica gene *Pfk13*

2.4.5 Amplificazione del gene *Pfmdr1*

Il gene *Pfmdr1* è stato amplificato tramite PCR al fine di valutare e identificare la presenza di mutazioni puntiformi, come descritto in Duraisingh *et al.*, 2000 e Menegon *et al.*, 2009. I prodotti di amplificazione sono stati verificati mediante elettroforesi su gel di agarosio 2% con bromuro di etidio e visualizzato con luce UV. La presenza di eventuali mutazioni nel gene *Pfk13* è stata valutata tramite il sequenziamento col metodo di Sanger presso la Eurofins Genomics (Germania), e l'analisi delle sequenze risultanti tramite l'utilizzo del programma dedicato DSGene 1.5 (Accelrys, Inc).

2.4.6 **Determinazione del numero di copie del gene *Pfmdr1***

Il numero di copie del gene *Pfmdr1* è stato determinato tramite la tecnica di RT-PCR, valutando il rapporto tra i risultati ottenuti per l'*mdr1* e quelli ottenuti per il gene housekeeping β -*tubulina* di *P. falciparum*, utilizzando il Software LightCycler 480 della Roche. I primers utilizzati sono stati ottenuti da Price *et al.*, 2004. Il volume finale di reazione è stato di 20 μ l, di cui 10 μ l di Master Mix LightCycler 480 (Roche Diagnostic), 300 nM di primer forward e 300nM di primer reverse, 100nM di sonda e 2-3 μ l di DNA. Il programma impostato nel termociclatore è stato il seguente: 10 minuti a 95°C; 45 cicli composti da 10 secondi a 95 °C, 20 secondi a 55 °C e 5 secondi a 72 °C. In ciascun esperimento sono stati utilizzati due diversi controlli di DNA provenienti da ceppi di laboratorio: il 3D7, con una sola copia del gene *Pfmdr1*, e il Dd2 con 3 copie del gene. Ogni campione è stato testato in triplicato ed il numero di copie (CNV, copy number variation) del gene *mdr1* è stato calcolato basandosi sul modello comparativo del $\Delta\Delta$ Ct di Livak e Schmittgen, 2001, come descritto riportato di seguito:

$$\text{CNV} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{(\text{campione})} - \Delta\text{Ct}_{(\text{calibratore})}$$

$$\Delta\text{Ct}_{(\text{campione})} = [\text{Ct}_{(\text{P}f\text{mdr}1)} - \text{Ct}_{(\text{P}f\beta\text{-tubulina})}]_{\text{campione}}$$

$$\Delta\text{Ct}_{(\text{calibratore})} = [\text{Ct}_{(\text{P}f\text{mdr}1)} - \text{Ct}_{(\text{P}f\beta\text{-tubulina})}]_{\text{calibratore}}$$

Modello comparativo del $\Delta\Delta\text{Ct}$ di Livak e Schmittgen, 2001

Il risultato ottenuto quantifica l'incremento (o decremento) del gene *mdr1* nel campione in analisi relativo al campione calibratore rispetto all'espressione del gene housekeeping di riferimento (Livak *et al.*, 2001). Il valore di 1,6 è stato definito il cut-off per determinare un numero di copie del gene maggiore di 1.

2.4.7 Determinazione del numero di copie del gene *Pfpm2*

La valutazione del numero di copie del gene *Pfpm2* è stata effettuata tramite un saggio PET-RT-PCR, utilizzando il gene *Pfβ-tubulina* come gene di riferimento. I primers specifici per il legame al gene *Pfpm2*, e quelli specifici per la *Pfβ-tubulina* sono stati precedentemente descritti da Witkowski *et al.*, 2017. I primers reverse per entrambi i geni sono stati modificati con l'aggiunta

della coda oligonucleotidica PET marcata rispettivamente con la sonda FAM per la *Pfpm2*, e la sonda HEX per la *Pfβ-tubulina* come descritto in Lucchi *et al.*, 2013. La miscela di reazione è stata condotta in 20 µl contenenti 2X TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Applied Bio Systems), 0,5µM di ciascun primer, forward e reverse per la *Pfpm2*, 0,25µM per i primers della *Pfβ-tubulina* e 3µl di DNA. Il programma di amplificazione è stato impostato con le seguenti temperature: 95°C per 15 minuti; 95°C per 15 secondi, 58°C per 1 minuto, e 72°C per 20 secondi ripetuto per 45 cicli. Tutti i campioni sono stati saggiati in triplicato utilizzando il termociclatore Agilent Mx3005pro (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Il numero di copie del gene *Pfpm2* è stato determinato con il metodo comparativo del $\Delta\Delta C_t$ ($CNV = 2^{-\Delta\Delta C_t}$) usando il ceppo di laboratorio 3D7 come calibratore, poichè questo possiede una singola copia del gene *Pfpm2*.

2.4.8 **Determinazione della delezione dei geni *Pfhrp2* e *3***

Al fine di determinare l'eventuale delezione dei geni *Pfhrp2* e *3*, la cui struttura è rappresentata in figura 2.4.9 (Akinyi Okoth *et al.*, 2015), sono state effettuate delle amplificazioni di PCR utilizzando i primers forward F1 (5'-CAAAAGGACTTAATT-TAAATAAGAG-3') e reverse R1(5'-AATAAATTTAATGGCGTAGGCA-3') per il gene *Pfhrp2*, e i primers forward F1 (5'-AATGCAAAAGGACTTAATTC-3) e

reverse R1 (5'-TGGTGTAAAGTGATGCGTAGT-3') per il gene *Pfhrp3*, come descritto da Baker *et al.*,2005. La miscela di reazione, di volume finale di 20 μ l, è stata così composta: 3 μ l di DNA per ciascun campione analizzato, 10 μ l of EconoTaq® PLUS 2 \times Master (Lucigen Corporation WI, USA) 10 e 0,5 μ M di ciascun primer. I ceppi di laboratori 3D7, Dd2 e HB3, rispettivamente wild-type, deleto per *Pfhrp2* e deleto per *Pfhrp3*, sono stati utilizzati come controlli. Il programma di amplificazione è stato impostato con le seguenti temperature: 94 °C per 50 secondi, 50 °C per 50 secondi e 72 °C per 1 minuto, per 50 cicli di amplificazione. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati su gel di agarosio al 2% e visualizzati con un transilluminatore a UV. La dimensione di ciascun frammento è stata determinata riferendosi al marcatore Gel-Ready™ 100 bp DNA Ladder della Lucigen.

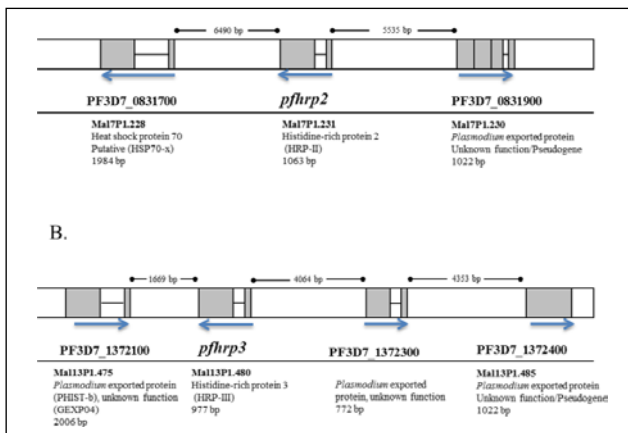


Fig. 2.4.9- Rappresentazione schematica geni *Pfhrp2* e *3* (Akinyi Okoth *et al.*, 2015)

2.5 Sequenziamento del DNA

2.5.1 Sequenziamento tramite metodo di Sanger

Messo a punto nel 1977, il sequenziamento di Sanger con deossinucleotermatori è un metodo di terminazione enzimatica parziale che permette di determinare l'ordine dei nucleotidi che compongono una sequenza di DNA. Il principio alla base di questa metodica prevede l'utilizzo di nucleotidi artificiali che inducono il blocco della reazione di sintesi del DNA in fase di elongazione. Il sequenziamento comincia con una fase di denaturazione del DNA target al fine di ottenere la separazione dei due singoli filamenti della molecola input. Successivamente, si verifica l'appaiamento di un primer complementare e l'elongazione della catena di DNA catalizzata dalla presenza della DNA-polimerasi e dei quattro deossinucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Alla miscela di reazione vengono inoltre aggiunti, in quantità stechiometricamente inferiore rispetto ai dNTPs, i nucleotidi artificiali definiti dideoxinucleotidi (ddNTPs), marcati con un fluoroforo e caratterizzati all'estremità 3' dalla mancanza del gruppo ossidrilico $-OH$ (fig. 2.12.1). I ddNTPs possono essere incorporati nel filamento di DNA sintetizzato esattamente come i dNTPs, ma essendo privi del gruppo $-OH$ causano la terminazione del filamento di DNA in fase di sintesi non fornendo il sito di legame fosfodiesterico per il dNTP successivo. Ogni qual volta che un ddNTP viene incorporato dalla DNA-polimerasi nel filamento di

nuova sintesi avviene la terminazione della catena. I frammenti così generati vengono fatti correre su un gel di poliacrilammide e visualizzati per autoradiografia. Per almeno un ventennio il metodo di Sanger ha rappresentato il gold standard del sequenziamento genomico fornendo le basi per lo sviluppo di quello automatico (Smith et al., 1986; Ansorge et al., 1987).

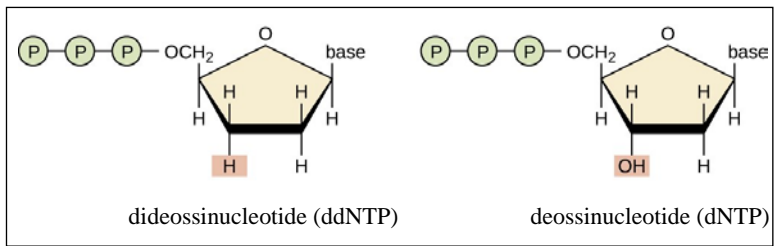


Fig. 2.12.1- Struttura di un ddNTP e di un dNTP

2.5.2 Next generation sequencing

Con l'introduzione di tecniche ad elevata produttività (high-throughput) sono aumentate le strategie di analisi degli acidi nucleici. Con il termine high-throughput si intende la capacità di sequenziare contemporaneamente numerosissimi frammenti di DNA; l'ambito della genomica che più di altri ha beneficiato di

questa tecnologia è il sequenziamento di nuova generazione, o next generation sequencing (NGS). L'introduzione delle piattaforme NGS ha aperto grandi prospettive nell'ambito del sequenziamento *de-novo*, nell'analisi di SNPs, di siti di metilazione e editing, e di siti di legame DNA-proteine o RNA-proteine, poiché sono caratterizzate dall'elevata processività, accuratezza dei dati di sequenza e costi di analisi ridotti rispetto alle metodiche più classiche, come il sequenziamento con il metodo di Sanger. Il sequenziamento di nuova generazione è stato impiegato per l'identificazione della diversità genetica e dell'evoluzione di patogeni, e, in particolare, per lo studio della resistenza legata ai farmaci antimalarici (Rao et al., 2016). Il NGS consente di analizzare una specifica regione del genoma con un intervallo di confidenza molto elevato, di identificare infezioni miste e di rilevare polimorfismi con frequenze alleliche minori (minor allele frequency, MAF) fino all'1% (Flaherty et al., 2012; Pulido-Tamayo et al., 2015), mentre con il metodo di sequenziamento Sanger la rilevazione del MAF è limitata al 15-30% (Tsiatis et al., 2010). Questo limite non permette spesso di ottenere una reale immagine del numero di popolazioni clonali che mediano un'infezione malarica. Esistono diversi sistemi NGS, tutti caratterizzati da quattro fasi fondamentali: la costituzione della "library" di DNA, la reazione di amplificazione, il sequenziamento, e l'analisi bioinformatica. Oltre a piattaforme come l'HiSeq 2500 di Illumina, o il Solid 5500 W con output elevati (fino a 600 Gb) normalmente impiegati nei sequenziamenti

di interi genomi, sono disponibili sul mercato sistemi più contenuti come il Personal Genome Machiner (PGM, Life Technologies) e il MiSeq di Illumina con output da 2 a 15 Gb, estremamente versatili per molte applicazioni. La piattaforma MiSeq rappresenta una delle ultime novità dei sistemi Illumina, e consente di ottenere una notevole quantità di risultati in brevissimo tempo. La tecnologia alla base della piattaforma si avvale del sequenziamento per sintesi utilizzando dNTPs (deossinucleotidi trifostato) marcati con quattro diversi fluorofori. Nella prima fase, il DNA target viene frammentato, e all'estremità di ciascun frammento vengono attaccati degli adattatori (brevi sequenze oligonucleotidiche), necessari per la fase di amplificazione. Una volta denaturati, i frammenti di DNA si legano tramite gli adattatori alla superficie della "flow-cell", ovvero un vetrino composto da otto lanes indipendenti sul quale avvengono tutte le reazioni del processo. L'estremità libera di ciascun frammento si lega all'oligonucleotide complementare presente sulla superficie della flow-cell creando una caratteristica struttura "a ponte" che dà inizio all'amplificazione dei frammenti di DNA. Attraverso il processo di amplificazione, definito bridge amplification (PCR a ponte) (Adessi et al., 2000; Fedurco et al., 2006), ogni frammento viene clonato generando fino a 1000 copie identiche di DNA, organizzate in cluster sulla flow-cell. A questo punto gli ampliconi generati vengono denaturati e linearizzati, e un primer funge da innesco per la reazione di sequenziamento. Oltre alla DNA-polimerasi, alla reazione vengono aggiunti i quattro dNTPs

adeguatamente marcati con un fluoroforo e un gruppo terminatore all'estremità 3', in modo che quest'ultimo impedisca, ad ogni ciclo di sequenziamento, l'aggiunta di più di un nucleotide per volta. Ad ogni ciclo, l'eccitazione con un laser del fluoroforo adeso al dNTP, e la successiva emissione di fluorescenza, ne permette l'identificazione; quindi, il gruppo terminatore e il gruppo fluorescente vengono rimossi, in maniera che sia consentito l'appaiamento e il successivo sequenziamento della base successiva. L'intero processo è rappresentato in figura 2.12 (Illumina sequencing protocol).

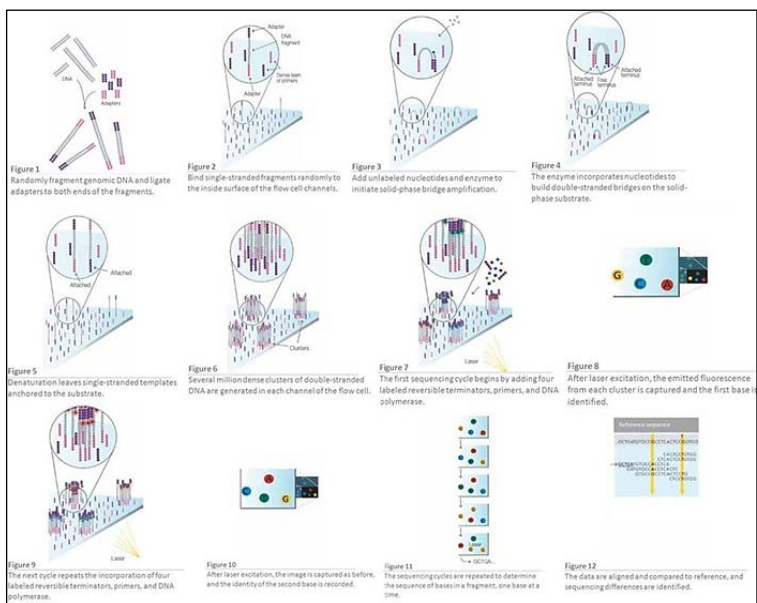


Fig. 2.12- Rappresentazione schematica NGS (Illumina sequencing protocol)

Protocollo:

Le diverse fasi operative che compongono il protocollo di sequenziamento NGS sono schematizzate in figura 2.13, come descritto in Talundzic *et al.*, 2018.

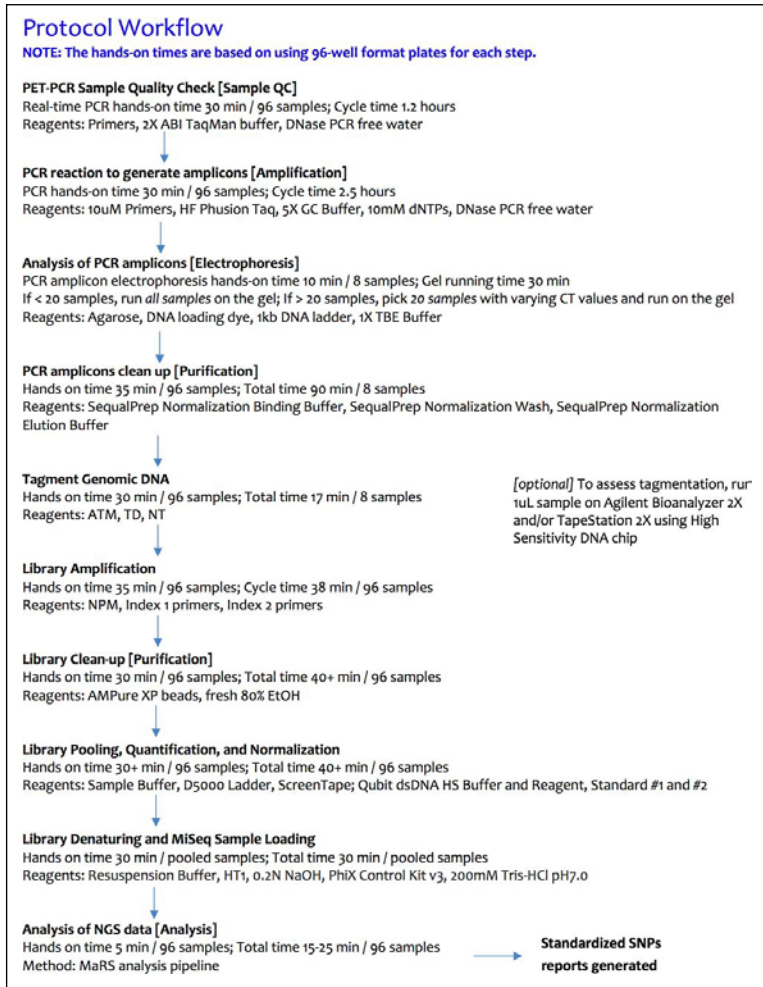


Fig. 2.13- Rappresentazione schematica del protocollo NGS (Talundzic *et al.*, 2018)

I campioni sono stati amplificati per l'intera lunghezza dei 6 geni legati alla resistenza ai farmaci antimalarici: *Pfk13*, *Pfmdr1*, *Pfcrt*, *Pfdhps*, *Pfdhfr* e *Pfcytb*, utilizzando il Kit High Fidelity PCR della New England BioLabs (NEB) in un volume di reazione finale di 50 μ l. Per la preparazione della library, i prodotti di amplificazione di ognuno dei sei geni, sono stati purificati per rimuovere l'eccesso dei primers e di altri reagenti di PCR, e normalizzati da 1 a 2 ng/l. Successivamente, sono stati raggruppati (pooled) 10 μ l di ogni amplicone utilizzando il Kit SequelPrep della ThermoFisher Scientific. Alla miscela di reazione sono stati poi aggiunti gli adattatori tramite il Kit Illumina Nextera XT. Questo step genera delle sequenze uniche, identificabili con uno specifico ID per ogni campione e per tutti i geni. Sono stati selezionati soltanto i prodotti di PCR di dimensioni uguali o maggiori a 300 coppie di basi, normalizzati e purificati con l'ausilio di sfere magnetiche Agentcourt Ampure XP (Beckman Coulter Genomics). Al termine di questi passaggi, sono stati prelevati 5 μ l di ciascuna library e uniti in un pool, e di questo 10 μ l sono stati denaturati con l'aggiunta di 10 μ l di NaOH 0,2 N e caricati su una singola flow-cell MiSeq (Illumina) insieme ad una libreria di controllo (PhiX Control, Illumina). Le sequenze dei primers e i programmi di amplificazione sono specificati nel protocollo allegato nell'appendice tecnica, e come descritto in Talundzic *et al.*, 2018.

L'analisi bioinformatica dei risultati di sequenziamento è stata effettuata utilizzando il software Geneious R10, con parametri e algoritmi ottimizzati per l'analisi. L'ottimizzazione di questi parametri ha permesso la creazione della *pipeline* “MaRS”, Malaria Resistance Surveillance, standardizzata e di libero accesso (open-source) per l'analisi dei geni utilizzati come marcatori di resistenza ai farmaci antimalarici, come descritto in Talundzic *et al.*, 2018.

3 RISULTATI

3.1 Camerun

In Camerun, paese dell’Africa centrale, *Plasmodium falciparum* è ampiamente considerato responsabile della quasi totalità dei casi di malaria registrati (WHO, world malaria report, 2017). Recentemente sono stati riportati studi condotti in Camerun descrittivi di casi di infezioni malariche mediate da *P. vivax* tra pazienti asintomatici (Ngassa Mbenda *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2017). Secondo l’OMS, soltanto l’8% dei casi di malaria stimati a livello mondiale è mediato da *P. vivax*, e di questi, una percentuale inferiore al 50% si registra nel continente africano, in particolar modo in Etiopia (WHO, world malaria report, 2017). Rispetto a *P. falciparum*, *P. vivax* possiede un’ampia distribuzione geografica. Ciò potrebbe dipendere dalla capacità di *P. vivax* di riprodursi e diffondersi nel vettore in condizioni climatiche meno favorevoli, in termini di temperatura, rispetto a *P. falciparum*. Inoltre, *P. vivax* è in grado di sopravvivere per lunghi periodi in forma di ipnozoite nell’uomo, rappresentando un possibile serbatoio di infezione e un’evidente ostacolo all’eradicazione della malaria da *P. vivax* (Baird *et al.*, 2007; White *et al.*, 2011). Lo scopo del lavoro condotto in Camerun è stato quello di valutare le specie di plasmodio circolanti, e di condurre una sorveglianza molecolare della resistenza legata ai farmaci antimalarici per tutti

i ceppi di *P.falciparum* tramite un approccio di biologia molecolare.

3.1.1 Area e modalità di campionamento

Lo studio è stato condotto in tre diverse aree del Camerun: nel distretto sanitario di Santchou (SHD), nel distretto sanitario di Dschang (DHD), e in quello di Kyé-ossi Ambam (AHD) (figura 3.1.1). Il villaggio di Santchou è un'area rurale ad ovest del Camerun (5°15'N; 9° 50' E) e si trova ad un'altitudine di 750 metri all'interno della vasta pianura di Mbo, il cui paesaggio è caratterizzato da una savana arbustiva. La temperatura media annuale è di $28 \pm 3^{\circ}\text{C}$, con escursioni termiche giornaliere fino a 10°C (Tchuinnkam *et al.*, 2010). Il censimento del 2016 contava una popolazione di 25.500 abitanti. Vista la maggiore accessibilità, il Santchou District Hospital e il Santchou Presbyterian Hospital sono stati scelti come centri clinici di arruolamento dei pazienti selezionati a partecipare allo studio. Il distretto di Dschang è il capoluogo di Menoua, nella regione occidentale del Camerun. La città, a $5^{\circ} 27'\text{N}$, $10^{\circ} 04'\text{E}$, si trova ad un'altitudine di 1400 metri, con una temperatura media annua di $20,5 \pm 6^{\circ} \text{C}$. Le quattro stagioni si possono distinguere in stagione secca principale (da novembre a metà marzo), la breve stagione delle piogge (da metà marzo a maggio), la breve stagione secca (da giugno a luglio) e la stagione delle piogge principale (da agosto a ottobre) (Tchuinnkam

et al., 2010). Il District Hospital di Dschang è stato scelto come struttura sanitaria di riferimento per la raccolta dei campioni. Infine, il centro clinico di Ambam (Ambam Health District) è stato identificato come il centro di raccolta campioni del comune di Kyé-ossi, a sud del Camerun. Kyé-ossi rappresenta il punto di confine tra il Camerun, la Guinea Equatoriale e il Gabon, e per questo un'area di estremo interesse per il monitoraggio delle specie di plasmodio circolanti. Nel censimento del 2016 è stata stimata una popolazione di 26.102 abitanti. Per la raccolta dei campioni da includere nello studio sono state scelte due strutture sanitarie, il "Medicalized Health Center" e la clinica "Yola Canaan" di Kyé-ossi. I campioni sono stati raccolti da pazienti ambulatoriali febbrili (37.5 °C o più) recatisi negli ospedali identificati come centri di arruolamento, durante un periodo di 6 mesi, da aprile a settembre 2017.



Fig.3.1.1- Siti di campionamento in Camerun

3.1.2 Risultati della diagnosi

L'identificazione delle specie di plasmodio circolanti in Camerun è ottenuta tramite diagnosi molecolare sulla base del protocollo nested-PCR descritto da Snounou *et al.*, 1993. Per un totale di 605 campioni raccolti, di cui 501 al nord del Camerun, tra i distretti sanitari di Dschang e Santchou, e 104 nel distretto sanitario di Kyé-ossi al sud del paese, il 50.6% (n=153/302) dei campioni risultati positivi alla diagnosi molecolare del genere *Plasmodium* è stato dovuto all'infezione da *P. falciparum*, il 59.3% (n=179/302) è dovuto all'infezione da *P. vivax*, e il 3% (n=11/302) circa

all'infezione da *P. malariae*, mentre nessun campione ha mostrato positività per *P. ovale*. La restante parte dei campioni analizzati, 303, sono risultati negativi. Dei 153 campioni positivi per *P. falciparum*, 124 provenivano dai distretti a nord del paese e 29 dal villaggio di Kyé-ossi; delle 179 infezioni mediate da *P. vivax* 177 sono state identificate in campioni provenienti dal distretto di Dschang e soltanto 2, lievemente positivi, dal distretto sanitario di Kyé-ossi. 36 sono state le co-infezioni *P. falciparum*/*P. vivax* in campioni raccolti al nord del Camerun. Degli 11 campioni positivi per *P. malariae*, di cui 2 con doppia infezione *P. malariae* /*P. falciparum* e 3 con doppia infezione *P. malariae*/*P. vivax*, 6 provenivano dal distretto di Dschang e 5 da Kyé-ossi. In totale, la proporzione delle infezioni mediate da *P. falciparum* è stata del 25.3%, 29.6% è stata la percentuale delle infezioni mediate da *P. vivax*, e dell'1.8% quelle da *P. malariae*.

3.1.3 Risultati della genotipizzazione

L'amplificazione del gene *Pfmsp1* è stata eseguita su un sottogruppo rappresentativo di 61 campioni di *P. falciparum* in cui sono state osservate tutte le tre sottofamiglie alleliche di *mSP1*: K1, MAD20 e RO33. La sottofamiglia K1 è stata riscontrata in tutti i 61 campioni analizzati mentre RO33 e MAD20 sono state osservate rispettivamente in 58 e in 27 campioni. Tra gli isolati analizzati, il 43% (26/61) era caratterizzato da genotipi misti

appartenenti a tutte le tre sottofamiglie alleliche. Inoltre, 32 campioni (52%) hanno mostrato positività per le due sottofamiglie alleliche K1 e RO33 del gene polimorfico *msp1*, e il 2% per le sottofamiglie K1 e MAD20. Infine il 3% degli isolati analizzati ha mostrato positività per la sola sottofamiglia allelica K1. Circa il 40% dei campioni (24/61) ha mostrato, per la stessa famiglia allelica, varianti alleliche multiple: 22 campioni erano caratterizzati da 2 varianti, e 2 campioni da 3 varianti, per un totale di 172 varianti alleliche osservate in 61 campioni (figura 3.1.3). La molteplicità di infezione (MOI) è risultata uguale a 2,82.

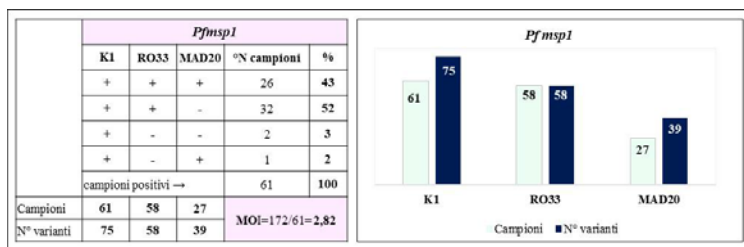


Fig. 3.1.3- MOI e rispettive varianti alleliche osservate in 61 campioni.

3.1.4 Risultati del sequenziamento NGS

Per i 116 campioni positivi all'infezione da *P. falciparum*, osservata tramite diagnosi molecolare, è stato applicato il protocollo MaRS presso il CDC (Centre for Disease Control and

Prevention) di Atlanta, USA. Per ognuno di questi campioni, collezionati su carta da filtro, è stato nuovamente estratto il DNA del parassita tramite l'utilizzo del Kit QIAmp DNA Blood della Qiagen, secondo le istruzioni del produttore. Per confermare la positività per *P. falciparum* è stata effettuata una PET-RT-PCR diagnostica. Per l'amplificazione dell'intera lunghezza dei sei geni (*crt*, *mdr1*, *k13*, *dhps*, *dhfr* e *cytb*) utilizzati come marcatori molecolari di farmaco-resistenza in *P. falciparum*, sono state utilizzate condizioni di reazioni leggermente modificate: una più lunga denaturazione (98° C per 3 minuti) e temperature di elongazione inferiori (65° C). La "read depth coverage", letteralmente la profondità di lettura, è una misura di ridondanza identificativa del numero di volte in cui un nucleotide è stato letto: all'aumentare della coverage aumenta l'intervallo di confidenza del risultato del sequenziamento. Sono stati considerati tutti i polimorfismi con una coverage minima di 35. Per ognuno dei sei geni analizzati la coverage è risultata non uniforme, come è mostrato in figura 3.1.2; per i polimorfismi dei geni *Pfcrt* e *Pfmdr1* è stata osservata una coverage più bassa rispetto ai geni *Pfk13*, *Pfdhps*, *Pfdhfr* e *Pfcytb*.

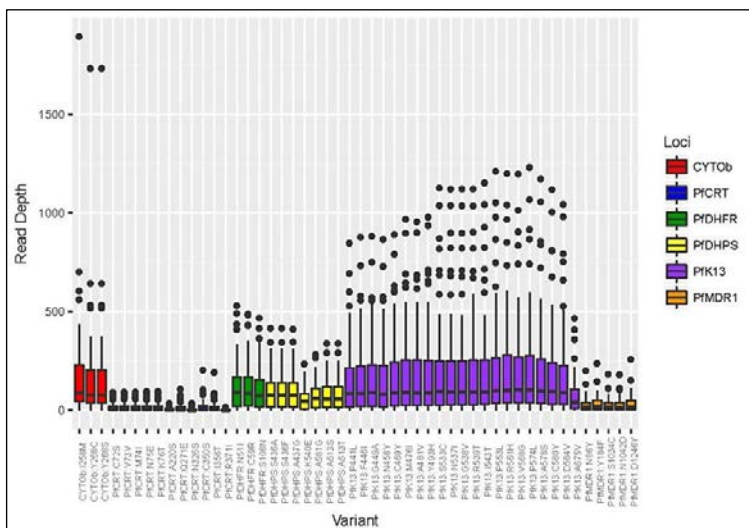


Fig. 3.1.2- Ready depth coverage per gli SNPs associati alla farmacoresistenza in *P. falciparum*

I loci di ogni SNP sono mostrati sull'asse delle x; sull'asse delle y è indicato l'intervallo di confidenza, “ready depth”, del sequenziamento. In rosso è rappresentato il gene *Pfcytb*, in blu il gene *Pfcrt*, in verde il gene *Pfdhfr*, in giallo il gene *Pfdhps*, in violetto il gene *Pfk13* e in arancione il gene *Pfmdr1*.

3.1.5 SNPs nei marcatori molecolari di farmacoresistenza

SNPs noti

Tra tutti i 116 campioni positivi per *P. falciparum*, sono stati osservati un totale di 408 polimorfismi in 86 isolati, relativi a 50 differenti codoni nei sei geni utilizzati come marcatori molecolari

di resistenza ai farmaci antimalarici; di questi SNPs, il 5.9% (24/408) è stato identificato come allele minore, ovvero con una frequenza allelica uguale o inferiore al 50%, mentre il 94.1% (384/408) è stato osservato come allele maggiore, ovvero con una frequenza allelica superiore al 50%, come mostrato in figura 3.1.4.

Nel gene *Pfcr1*, marcatore molecolare della resistenza alla cloroquina, i polimorfismi M74I, N75E e K76T sono stati osservati in un solo campione su 116 analizzati (0.8%), mentre la mutazione C72S non è mai stata osservata. La mutazione al codone 220 (A→S), la mutazione Q271E, e la I356T sono state identificate in un solo campione ciascuno, mentre gli SNPs V73V, N326S e C350S non sono mai stati osservati in nessuno dei 116 campioni analizzati. Tutti i polimorfismi descritti sono stati identificati come alleli maggiori, ovvero con una frequenza allelica (f.a.) > del 50% (figura 3.1.4.a).

Nel gene *Pfmdr1*, il cambiamento amminoacidico al codone 86 (N→Y) è stato osservato in 7 campioni di 116 (6%); la mutazione Y184F in 49 campioni di 116 sequenziati (42%). Ai codoni 1034, 1246 e 1042, le mutazioni rispettivamente S→C, D→Y e N→D, non sono state identificate in nessuno dei 116 campioni. I polimorfismi N86Y e Y184F sono stati trovati rispettivamente in 2 e 3 campioni come alleli minori; nei restanti campioni con le suddette mutazioni sono state osservate frequenze alleliche superiori al 50% (figura 3.1.4.a).

I polimorfismi N51I, C59R e S108N nel gene *Pfdhfr*, associati alla resistenza alla pirimetamina, sono stati riscontrati in 77 campioni (66.4%) su 116; di questi gli SNPs N51I e C59R, rispettivamente in 1 e 2 campioni, sono stati identificati come alleli minori (f.a. tra il 33 e il 50%), mentre i restanti polimorfismi sono stati osservati come alleli maggiori (f.a. compresa tra l'81 e il 100%) (figura 3.1.4.a).

Parallelamente, nel gene *Pfdhps* associato alla resistenza alla sulfadossina, il polimorfismo S436A è stato osservato in 40 campioni su 116, di cui 4 come alleli minori (f.a. compresa tra l'8 e il 40%), il A437G in 68 campioni, di cui 5 con frequenze alleliche comprese tra il 21 e il 50% (alleli minori) il K540E in 2 isolati entrambi come allele minore (f.a. compresa tra l'11 e il 22%), il A581G in 11 campioni, di cui 2 come alleli minori (f.a. del 14 e 19%), e il polimorfismo A631S in 16 osservato come allele minore in 3 isolati (f.a. tra il 16 e 27%). Nessuno dei 116 campioni analizzati ha mostrato mutazioni ai codoni 436 (S→F) e 631(A→T) (figura 3.1.4.a).

Per il gene *Pfcytb*, associato alla resistenza all'atovaquone-proguanil, e il gene *Pfk13*, marcatore molecolare di resistenza all'artemisinina, non sono stati osservati polimorfismi noti (figura 3.1.4.a).

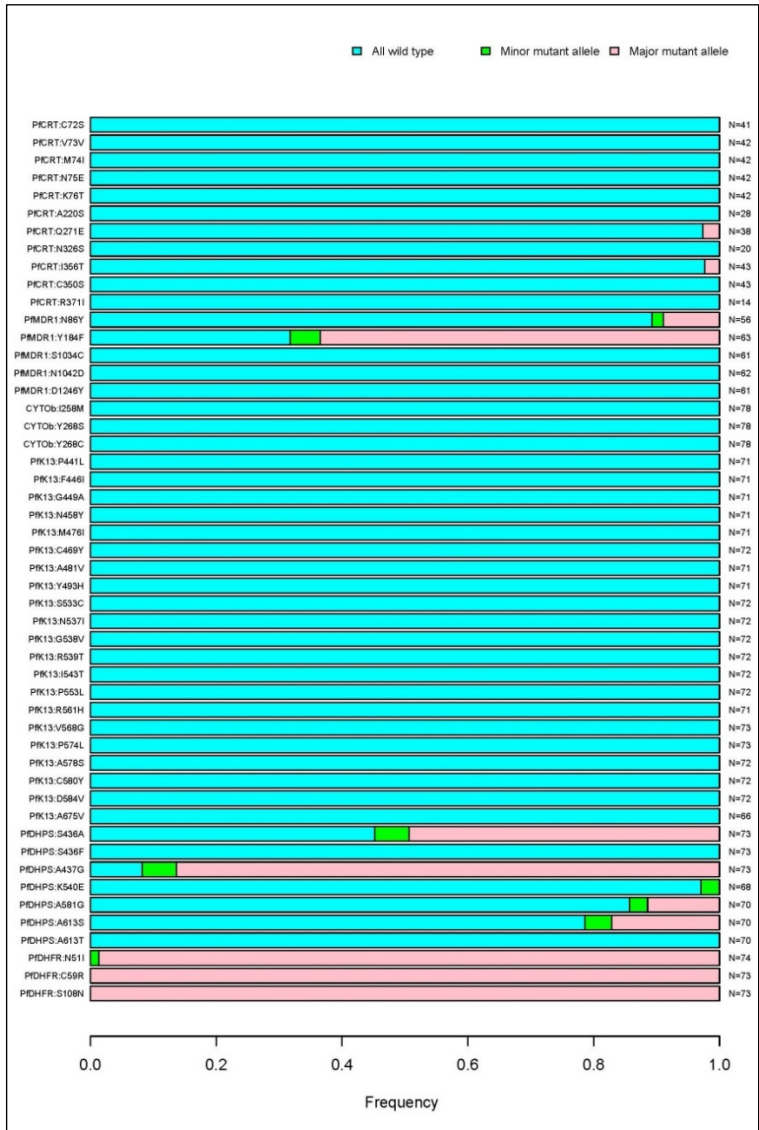


Fig. 3.1.4.a - SNPs noti nei 6 marcatori molecolari di resistenza antimalarica.

Il grafico mostra le frequenze alleliche degli SNPs identificati nell'intera lunghezza dei 6 geni marcatori molecolari di resistenza ai farmaci antimalarici.

Sull'asse delle x sono rappresentate le frequenze alleliche (%). A sinistra dell'asse delle y sono elencati gli SNPs noti (forma wt- codone- forma mutata) nei 6 geni associati a farmaco-resistenza, e a destra dello stesso asse il numero totale di campioni; l'aplotipo wild-type è rappresentato in azzurro, gli SNPs con frequenze alleliche inferiori al 50% in verde, e in rosa sono rappresentati gli alleli maggiori (f.a. > del 50%).

Nuove mutazioni, sinonime e non sinonime, sono state identificate nei geni *Pficyt*, *Pfdhfr*, *Pfdhps*, *Pfmdr1* e *Pfk13*.

- *Pficyt*: la mutazione sinonima I247I è stata identificata in un solo campione con una frequenza allelica del 19% (allele minore) (figura 3.1.4, b).
- *Pfdhfr*: la mutazione non sinonima S22Y è stata osservata in un solo campione con una frequenza allelica del 28% (allele minore) (figura 3.1.4.b).
- *Pfdhps*: sono state identificate tre mutazioni sinonime, la A437A in 6 campioni con una frequenza allelica del 100%, la mutazione K142K in 14 isolati di cui solo uno come allele minore (f.a. del 25%) e la mutazione T348T in un isolato con una frequenza allelica del 22%; in 22 isolati, di cui 3 come alleli minori (f.a. tra il 13 e il 48%) è stata osservata la mutazione non sinonima al codone I431V (figura 3.1.4.b).
- *Pfmdr1*: 14 polimorfismi sinonimi, A840A, D719D, E160E, E738E, F1226F, G102G, K757K, L1297L, S966S, S974S, T1069T, T230T e T816T sono stati

osservati in 27 campioni, di cui 6 come alleli minori (f.a. compresa tra 30 e 47%), e 11 polimorfismi non sinonimi, A1321D, D642N, D650N, F938Y, G968A, K34R, N504K, N652D, R137I, T496I e Y491F in 20 campioni; 9 di questi polimorfismi sono stati rilevati in diversi campioni come alleli minori (f.a. tra 16 e 35%) (figura 3.1.4.b).

- *Pfk13*: un totale di 10 polimorfismi, 3 sinonimi e 7 non sinonimi, sono stati identificati in questo gene: A617A, A627A, C469C, K189N, K189T, L258M, N217H, R255K, T149S e T573S. il polimorfismo K189T è stato osservato in 27 campioni, il K189N in 2, il L258M in 1, il N217H in 3, i polimorfismi A617A, A627A, C469C ciascuno in 3 isolati diversi, il polimorfismo R255K in 2 isolati, il T149S in 1 e il T573S in 1 campione. Il 10% di questi polimorfismi è stato osservato come allele minore (figura 3.1.4.b).

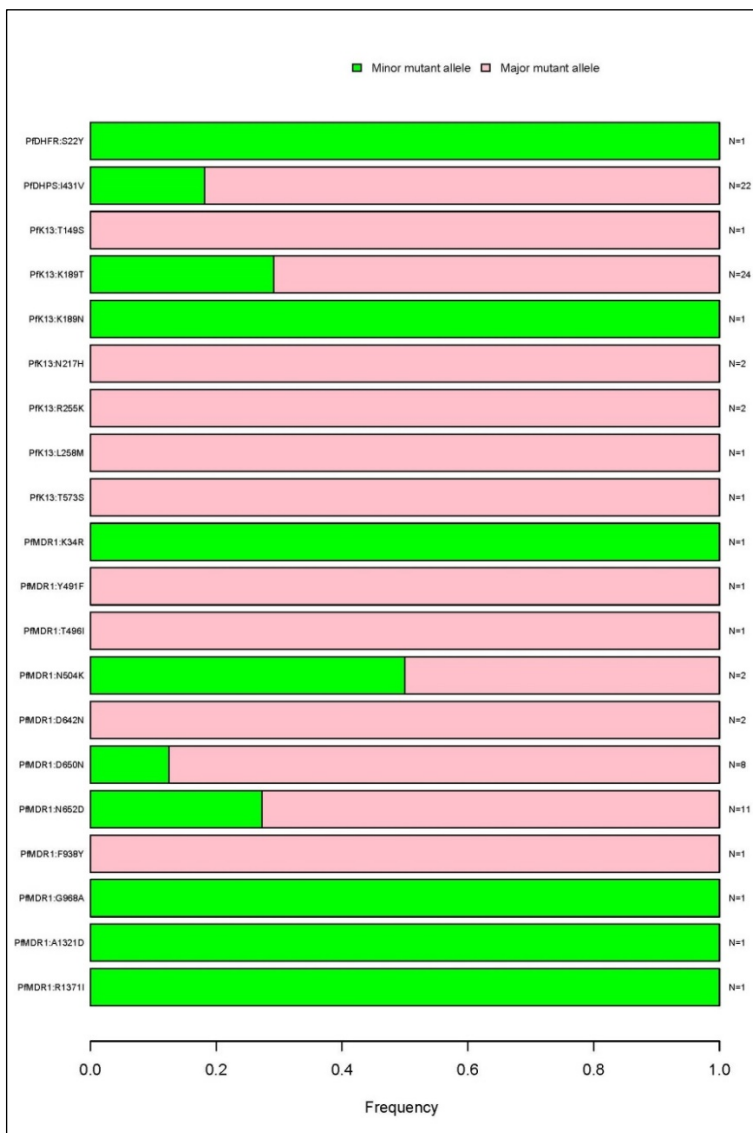


Fig. 3.1.4.b – Nuovi SNPs non sinonimi nei geni di resistenza antimalarica. Il grafico mostra le frequenze alleliche degli SNPs associati alla resistenza ai farmaci antimalarici identificati come wild-type, alleli minori o maggiori. Sull'asse delle

x sono rappresentate le frequenze alleliche (%). A sinistra dell'asse delle y sono elencati gli SNPs noti (forma wt- codone- forma mutata) nei 6 geni associati a farmaco-resistenza, e a destra dello stesso asse il numero totale di campioni n ; l'aplotipo wild-type è rappresentato in azzurro, gli SNPs con frequenze alleliche inferiori al 50% in verde, e in rosa sono rappresentati gli alleli maggiori (f.a. > del 50%).

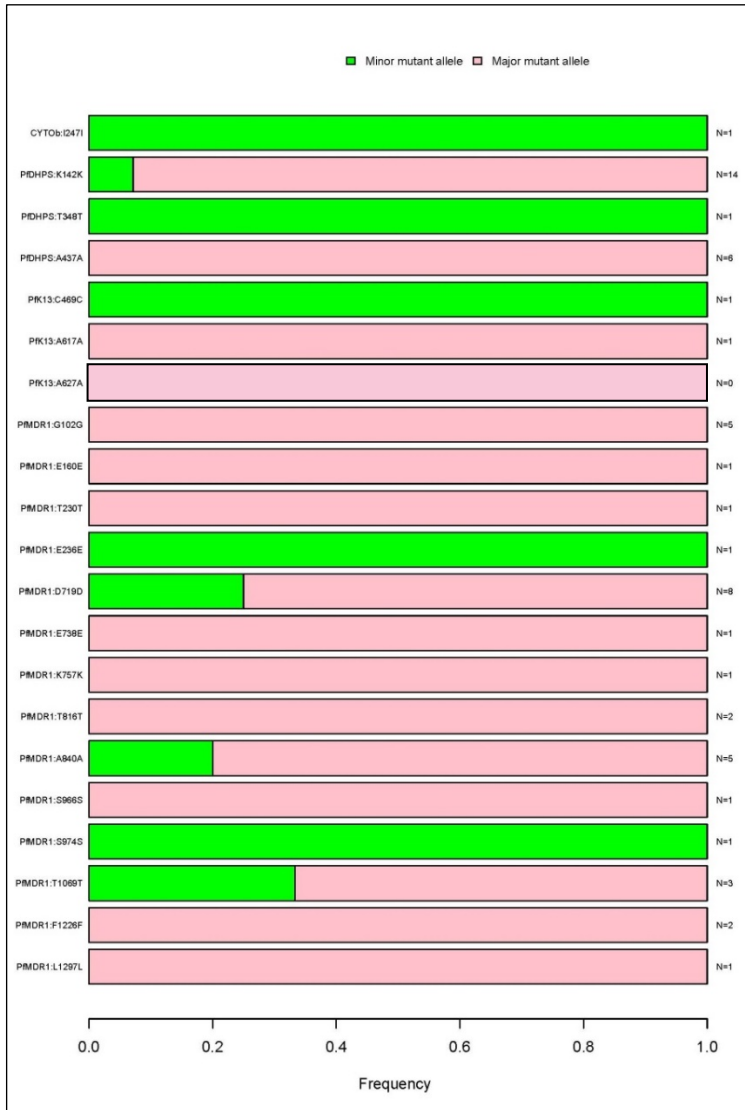


Fig. 3.1.4.b (seguito) – nuovi SNPs sinonimi nei geni di resistenza antimalarica.

3.2 Eritrea

In Eritrea, paese dell’Africa Orientale, la malaria continua a rappresentare un problema di sanità pubblica, con l’88% delle infezioni mediate da *P. falciparum* e il 12% da *P. vivax*. La combinazione terapeutica a base di artesunato-amodiachina (AS-AQ) è stata introdotta in questo paese nel 2007 come trattamento di prima scelta per la cura della malaria non complicata da *P. falciparum* (WHO, Eritrea Malaria Country Profile, 2016). Nel 2010, il programma nazionale di controllo della malaria ha condotto uno studio in cinque siti sentinella nella regione di Gash Barka, nella quale si registrano più del 50% dei casi di malaria di tutto il paese, per valutare l’efficacia della combinazione AS-AQ; i risultati hanno mostrato un fallimento dell’efficacia nel 7.6% dei pazienti trattati (Malaria Update, 2011). Questo rapporto è vicino al limite del 10%, ovvero il cut-off raccomandato dall’OMS, come il valore da considerare per il cambiamento della strategia farmacologica antimalarica del paese. Lo scopo del lavoro condotto in Eritrea è stato quello di indagare, tramite NGS, la presenza di eventuali mutazioni puntiformi nell’intera lunghezza dei geni *Pfk13* e *Pfcytb* al fine di fornire un quadro completo dello screening di sorveglianza molecolare svolta per gli stessi campioni con il sequenziamento tramite metodo di Sanger da Menegon *et al.*, 2016.

3.2.1 Area e modalità di campionamento

Un totale di 148 campioni di sangue con mono-infezione da *P. falciparum* sono stati collezionati in due regioni dell'Eritrea nel periodo compreso tra novembre 2013 e novembre 2014. Nella regione di Gash Barka sono stati raccolti 4 campioni provenienti dal villaggio di Agordat e 114 da quello di Barentu, e 9 campioni dal villaggio di Medefera, nella regione di Debub (figura 3.2.1). Queste regioni sono caratterizzate da livelli di endemia malarica stabile, con *P. falciparum* come principale specie infettante (75%). I pazienti sono stati arruolati dopo l'approvazione dello studio da parte del comitato etico del ministero della salute eritreo. I pazienti reclutati erano 52 donne, con un'età media di 22,5 anni (range da 4 a 70 anni) e 96 uomini, con un'età media di 27,1 anni (range da 3 a 70 anni). Dopo aver ottenuto il consenso informato fornito dai pazienti o dal loro tutore legale, è stato prelevato un campione di sangue mediante venipuntura del polpastrello di pazienti con infezione malarica da *P. falciparum* (confermata tramite emoscopia) collezionati in triplicato su carta da filtro e adeguatamente asciugati all'aria.

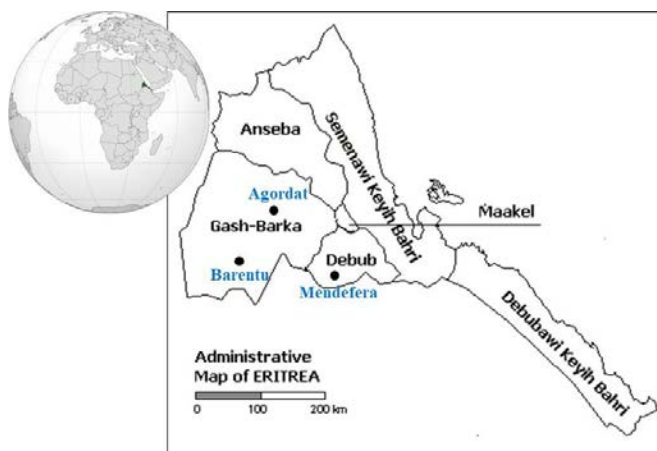


Fig.3.2.1- Siti di campionamento in Eritrea

Il DNA totale è stato estratto utilizzando il kit QIAmp della Qiagen. Per l'amplificazione genica e la successiva analisi sono stati utilizzati 4 ceppi di laboratorio di *P. falciparum* come controlli di riferimento: 3D7, HB3, e 7G8 wild-type per i geni *Pfk13* e *Pfcytb*, e il ceppo di laboratorio MRA 1236 mutato al codone 580 (C→Y) del gene *Pfk13*.

Per ognuno dei campioni sequenziati è prima stata effettuata una conferma di diagnosi mediante PET-PCR, come descritto in Lucchi *et al.*, 2013. Sono stati considerati positivi tutti i campioni con un Ct inferiore a 40, mentre tutti quelli con Ct superiore a 40 sono stati considerati negativi.

Tutte le analisi svolte tramite l'utilizzo del protocollo MaRS sui campioni eritrei sono state effettuate presso il laboratorio DPDM (Division of Parasitic Diseases and Malaria) del CDC di Atlanta.

3.2.2 Risultati del sequenziamento NGS

Dopo l'amplificazione dell'intera lunghezza dei geni *Pfk13* e *Pficytb* per 148 campioni è stato effettuato il sequenziamento NGS, in una singola corsa, utilizzando il supporto MiSeq di Illumina al fine di identificare la possibile presenza di mutazioni sinonime e non sinonime associate alla resistenza all'artemisinina e all'atovaquone-proguanil, rispettivamente. È stata rilevata la presenza di almeno un polimorfismo in 57 dei 148 isolati sequenziati per il gene *Pfk13* e la presenza di almeno uno SNP in soli 3 campioni di 148 per il gene *Pficytb*. La "coverage" per il sequenziamento dei due geni analizzati, *Pfk13* e *Pficytb*, è risultata non uniforme, come è mostrato in figura 3.2.2., anche in questo caso, 35 è stato il valore limite di coverage per considerare affidabili i risultati del sequenziamento.

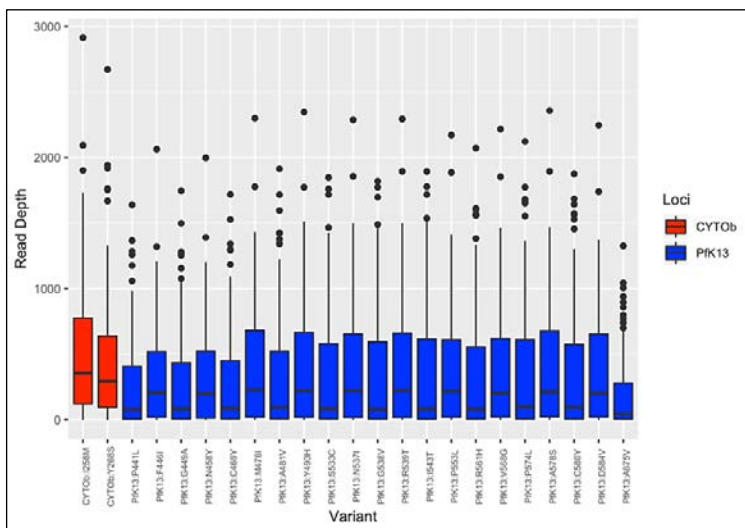


Fig. 3.2.2- Coverage per gli SNPs associati alla farmaco-resistenza in *P. falciparum*

I loci di ogni SNP sono mostrati sull'asse delle x; sull'asse delle y è indicato l'intervallo di confidenza, “ready depth”, del sequenziamento. In rosso è rappresentato il gene *Pficyt6*, e in violetto il gene *Pfk13*.

Pfk13

Il sequenziamento del gene *Pfk13* è stato effettuato per tutti i 148 isolati eritrei. I risultati relativi alla suddetta analisi sono riassunti in figura 3.2.2.a. Il sequenziamento dell'intera lunghezza del gene ha rivelato la presenza di 12 mutazioni non sinonime e 4 mutazioni sinonime in 83 campioni, di cui 20 caratterizzati da più di un polimorfismo. Delle 12 mutazioni non sinonime osservate, 9 sono state identificate al di fuori del dominio “propeller” del gene

Pfk13: M163I, K189N, K189T, E208K, R255K, D281V, E335G, E401Q e E433D. Di questi nove polimorfismi, il cambiamento amminoacidico più frequente è stato K189T (71/148) con una frequenza allelica del 100%, ad eccezione di un solo campione in cui il polimorfismo è stato identificato come allele minore (f.a. del 43%). Al di fuori del dominio propeller, sono stati osservati come alleli maggiori due polimorfismi sinonimi, S34S e L119L, in due diversi isolati (figura 3.2.2.b). All'interno del dominio propeller del gene *Pfk13* è stata osservata la presenza di 3 polimorfismi non sinonimi e due sinonimi. La mutazione non sinonima, R622I, è stata rilevata come allele maggiore, con una frequenza allelica del 100%; le altre due mutazioni non sinonime osservate all'interno del dominio propeller sono state identificate come alleli minori (< del 50%), al codone 535 (T → M) e al codone 703 (T → K). Inoltre, sono stati osservati all'interno del dominio propeller due SNPs sinonimi al codone 468 (Q → Q) e al codone 709 (G → G), il primo come allele maggiore e il secondo come allele minore. Nessun isolato ha mostrato mutazioni note associate alla resistenza all'artemisinina (figura 3.2.3).

Pfcytb

Il 93% degli isolati analizzati (138/148) è stato sequenziato con successo per il gene *Pfcytb*. Tra questi, il 97.8 % dei campioni era caratterizzato dalla presenza degli alleli wild-type 258I e 268Y. Inoltre, il suddetto sequenziamento ha identificato 2 polimorfismi sinonimi in tre distinti campioni: il polimorfismo V127V e il

L230L, entrambi con frequenze alleliche superiori al 50% (alleli maggiori) come mostrato in figura 3.2.2.b. Nessun isolato ha mostrato mutazioni note associate alla resistenza all'atovaquone-proguanil (figura 3.2.3).



Fig. 3.2.2.a – SNPs non sinonimi nel gene *Pfk13*. Il grafico mostra le frequenze alleliche degli SNPs osservati nell'intera lunghezza del gene *Pfk13*. Sull'asse delle *x* sono rappresentate le frequenze alleliche (%). A sinistra dell'asse delle *y* sono elencati gli SNPs (forma wt- codone- forma mutata) osservati ai diversi

codoni del gene *Pfk13*, e a destra dello stesso asse il numero totale di campioni; l'aplotipo con frequenze alleliche inferiori al 50% è rappresentato in verde; in rosa sono rappresentati gli alleli maggiori (f.a. > del 50%).

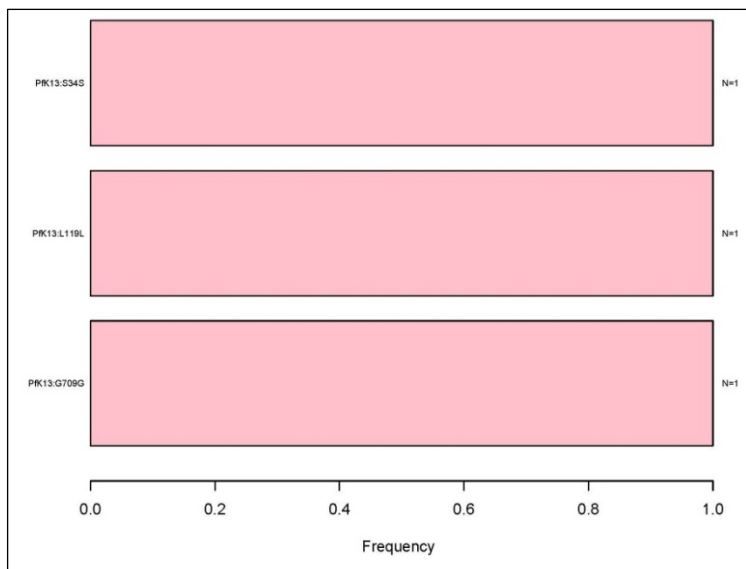


Fig. 3.2.2.b – SNPs sinonimi nei geni *Pficyt* e *Pfk13*. Il grafico mostra le frequenze alleliche degli SNPs sinonimi osservati nell'intera lunghezza dei geni *Pficyt* e *Pfk13*. Sull'asse delle x sono rappresentate le frequenze alleliche (%). A sinistra dell'asse delle y sono elencati gli SNPs osservati ai diversi codoni dei due geni, e a destra dello stesso asse il rispettivo numero dei campioni; l'aplotipo con frequenze alleliche inferiori al 50% è rappresentato in verde; ogni SNP è in rosa poiché alleli maggiori (f.a. > del 50%).

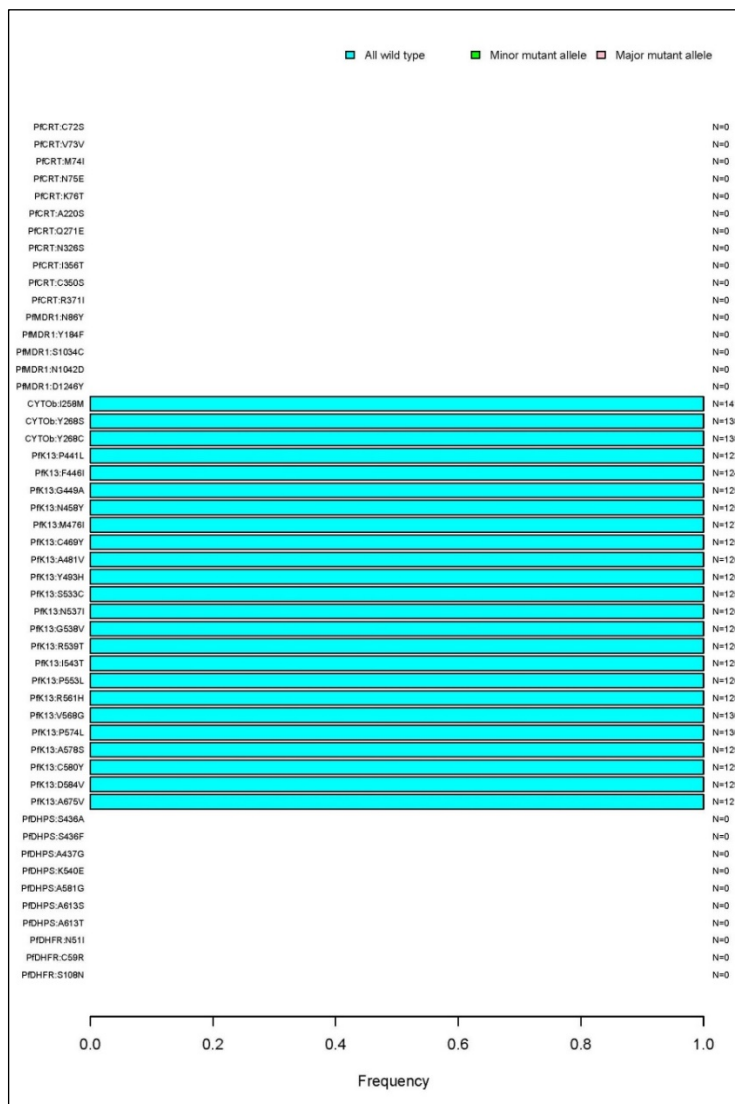


Fig. 3.1.4, a - SNPs noti nei 6 marcatori molecolari di resistenza antimalarica.

Il grafico mostra come tutti i campioni analizzati siano wild-type (barre azzurre) per i codoni che mutati sono associati alla resistenza ai farmaci antimalarici.

Sull'asse delle x sono rappresentate le frequenze alleliche (%). A sinistra dell'asse

delle *y* sono elencati gli SNPs noti (forma wt- codone- forma mutata) nei 6 geni associati a farmaco-resistenza, e a destra dello stesso asse il numero totale di campioni.

3.2.3 Studio delle delezioni dei geni *Pfhrp2* e *3*

La proteina hrp-2 (histidin-rich protein 2) di *P. falciparum* è l'antigene bersaglio che viene riconosciuto dai test diagnostici rapidi per la diagnosi specifica di *P. falciparum*. Recentemente, in isolati di *P. falciparum* provenienti dal Sud America, e da alcuni paesi endemici dell'Africa e dell'Asia, sono state documentate delezioni a carico del gene *Pfhrp2*. Gli isolati plasmodiali caratterizzati da tali delezioni geniche possono produrre risultati falsi negativi in seguito all'utilizzo di kit diagnostici rapidi basati sul riconoscimento dell'antigene HRP2. Nel presente lavoro, è stata valutata la prevalenza di isolati di *P. falciparum* che presentano la delezione del gene *Pfhrp2* (Mal7P1.231) e/o del gene *Pfhrp3* (Mal7P1.480), che codifica per un secondo antigene riconosciuto, per cross-reazione, dai test rapidi basati sulla PfHRP2 (Baker *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2006) in 135 isolati di *P. falciparum* collezionati nella regione di Gash Barka e in 9 isolati della regione di Debub in Eritrea. Contestualmente, negli stessi isolati è stata valutata la presenza di delezioni nei geni MAL7P1.228, MAL7P1.230, MAL13P1.475 e MAL13P1.485, geni che fiancheggiano i geni codificanti per *Pfhrp2/3*.

Risultati

Dei 144 isolati esaminati, 27 (18,7%) isolati sono stati raccolti nel 2013 nella regione di Gash Barka, e 117 (81,3%) nel 2014, compresi i 9 isolati provenienti della regione di Debub. Tra i 144 isolati di *P. falciparum* analizzati, i geni *Pfhrp2* e *Pfhrp3* sono stati amplificati con successo in poco più della metà degli isolati (56,2%), in particolare in 78 isolati dalla regione di Gash Barka e 3 della regione di Debub. Quattordici isolati (9,7%), di cui 12 raccolti nel 2014 nella regione di Gash Barka, hanno mostrato la delezione dell'esone 2 del gene *Pfhrp2*, mentre 62 isolati (43%) erano deleti del gene *Pfhrp3*. Tra questi isolati, la completa delezione di entrambi i geni, *Pfhrp2* e *Pfhrp3*, è stata osservata in 13 isolati (9%), 11 dei quali provenivano dalla regione di Gash Barka (Figura 3.2.4).

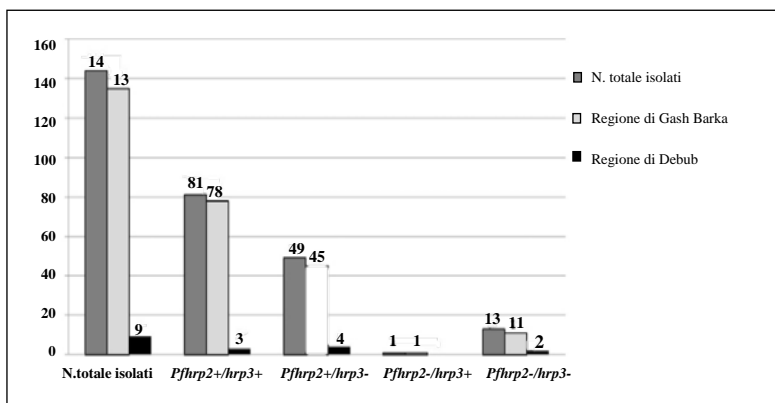


Fig. 3.2.4- Prevalenza delle delezioni nei geni *Pfhrp2* e 3

Per tutti i 13 isolati doppi negativi, al fine di confermare il risultato ottenuto, è stata ripetuta sia l'amplificazione genica tramite PCR per entrambi i geni in analisi, che l'amplificazione del gene *Pfmsp1*, per confermare l'integrità dei DNA dei parassiti, come descritto in Wooden *et al.*, 1993. In seguito alla caratterizzazione dei geni fiancheggiati, è stata osservata con maggiore frequenza la delezione del gene MAL13P1.475 (*Pf3D7-1372100*) fiancheggiante *Pfhrp3*, rispetto ai geni fiancheggiati *Pfhrp2*. In generale, nei 144 campioni eritrei analizzati sono stati osservati sedici diversi pattern di delezione *Pfhrp2* e *Pfhrp3*, come mostrato in tabella 1.

MAL7P1 .228	<i>Pfhr</i> <i>p2</i>	MAL7P 1.230	MAL13P 1.475	<i>Pfhrp</i> 3	MAL13P 1.485	No. samples (%)
+	+	+	+	+	+	57 (39.5)
+	+	+	+	+	—	1 (0.7)
+	+	+	—	+	+	14 (9.7)
+	+	+	—	—	+	23 (16)
+	+	+	—	+	—	1 (0.7)
+	+	+	—	—	—	16 (11.1)
+	+	—	+	+	+	3 (2.1)
+	—	—	+	+	+	1 (0.7)
—	+	+	+	+	+	1 (0.7)
+	—	—	—	—	—	8 (5.6)
+	—	—	—	—	+	1 (0.7)
+	+	—	—	—	+	7 (4.8)
+	+	—	—	+	+	3 (2.1)
+	+	—	—	—	—	3 (2.1)
+	+	—	+	+	—	1 (2.7)
—	—	—	—	—	—	4 (2.7)

Tabella 1- Aplotipi di delezione dei geni *Pfhrp2*, *Pfhrp3* e rispettivi geni fiancheggiati. Il simbolo “+” indica l’avvenuta amplificazione genica, il simbolo”-“ indica invece la delezione del gene.

Discussione

A supporto delle diverse strategie impiegate per il monitoraggio della malaria, l’utilizzo dei test diagnostici rapidi (RDTs) riveste un ruolo chiave nella sorveglianza dell’incidenza dei casi di malaria, specialmente in paesi con sistemi sanitari precari. In condizioni ottimali, la sensibilità degli RDTs è considerata simile a quella dell’emoscopia (Cheng *et al.*, 2014). Tuttavia, soprattutto nei paesi endemici, l’affidabilità degli RDTs è talvolta intaccata da risultati falsi negativi, dovuti spesso alla delezione del gene *Pfhrp2*, il quale codifica per l’antigene bersaglio riconosciuto da molti test rapidi. Alla fine del 2015, il programma nazionale di controllo della malaria del CDC eritreo, ha notificato all’OMS un incremento dei risultati falsi negativi prodotti dagli RDTs più utilizzati nel paese, per un elevato numero di casi di malaria da *P. falciparum* per i quali la positività era già stata confermata microscopicamente. Questa notifica ha dato origine all’avvio di uno screening volto ad indagare la sensibilità degli RDTs impiegati in Eritrea (Berhane *et al.*, 2017). L’indagine ha rivelato che per 50 casi di malaria da *P. falciparum* microscopicamente confermati, gli RDTs basati sul riconoscimento dell’antigene HRP2 producevano l’80% dei risultati falsi negativi.

L'analisi molecolare condotta ha evidenziato, per 135 campioni eritrei, una discreta percentuale di delezioni a carico dei geni *Pfhrp2* e *Pfhrp3* in isolati di *P. falciparum*. Questi dati sono coerenti con quelli riportati da Berhane, per cui su 15 campioni analizzati nella regione di Gash Barka (7 di Agordat e 8 di Barentu) 11 erano risultati negativi con i test rapidi; in particolare il 100% dei campioni di Agordat e il 37,5% dei campioni di Barentu avevano fornito risultati falsi negativi. I nostri risultati indicano che il 60% degli isolati provenienti da Agordat sono deleti per il gene *Pfhrp3*, e circa il 40% degli isolati provenienti da Barentu sono deleti per i geni *Pfhrp2* e/o *Pfhrp3*. In linea con quanto descritto da Berhane, a Mendefera, nella regione di Debub, è stato osservato il 66% delle delezioni a carico dei geni *Pfhrp2* e/o *Pfhrp3*. Questi risultati potrebbero dunque spiegare l'elevata percentuale di falsi negativi notificati nelle regioni di Gash Barka e Debub.

Secondo le linee guida dell'OMS, le delezioni dei geni *Pfhrp2* e *Pfhrp3* dovrebbero essere sospettate quando il numero di casi positivi microscopicamente confermati supera del 10-15 % il numero di casi positivi diagnosticati con i test rapidi. In tali condizioni, è necessario rivedere le politiche diagnostiche, indagando le eventuali delezioni a carico dei geni *Pfhrp2/3*. In conclusione, al fine di rendere più affidabili le diagnosi di malaria, e vista la discreta percentuale di delezioni riscontrate nei geni *Pfhrp2* e *3* in isolati di *P. falciparum* raccolti in Eritrea, dovrebbe essere incoraggiato l'utilizzo di kit diagnostici rapidi che

riconoscano sia l'antigene HRP2 che l'enzima lattato deidrogenasi del plasmodio, come avviene con il kit CareStart™Malaria **HRP2/pLDH Combo** Test.

3.3 Botswana

In Botswana, negli ultimi 50 anni si è osservato un considerevole declino degli indici di morbilità e mortalità malarica, che ha aperto la strada verso l'eliminazione della malattia. Affinché il Botswana riesca a raggiungere la meta dell'eliminazione della malaria è necessario che si basi su un solido sistema di sorveglianza epidemiologica ed entomologica, che fornisca dati in modo accurato e tempestivo. Il Botswana è un paese dell'Africa australe occupato da un altopiano di circa 1000 metri. Il clima è subtropicale, arido o semiarido a seconda delle zone. L'inverno, da maggio ad agosto, è secco e soleggiato; l'estate, da novembre a marzo, è una stagione molto calda, moderatamente piovosa. In primavera, tra settembre e ottobre, il caldo è spesso torrido, soprattutto al nord del paese. Le temperature medie annuali sono comprese tra i 18 e i 23°C, fino a raggiungere i 35°C in estate. La popolazione è pari a 2250 milioni di persone su una superficie di 581.730 km². Secondo le stime dell'OMS, *P. falciparum* rappresenta la specie di plasmodio maggiormente osservata, in particolare nella parte settentrionale del paese. Il modello di precipitazioni è variabile di anno in anno e occasionalmente si verificano periodi di lunga siccità, come accaduto nei primi anni '80 quando si è registrato un importante declino dei casi di malaria nel paese. Recentemente, sono stati osservati casi di infezioni mediate da *P. vivax* nelle regioni del centro, dell'est e del sud del

paese, con una prevalenza del 4.7% tra bambini asintomatici. La cloroquina ha rappresentato il trattamento di prima scelta per la malaria non complicata da *P. falciparum* fino al 1997, quando in seguito all'insorgenza di resistenza, è stata adottata la combinazione di sulfadossina-pirimetamina. Nel 2007 anche questa strategia terapeutica è stata sospesa e sostituita con l'ACT, a base di artemether-lumefantrina (Botswana Ministry of Health, 2015). Lo scopo del lavoro svolto in Botswana è stato quello di effettuare un monitoraggio di farmaco-resistenza in isolati di *P. falciparum*, valutando inoltre la molteplicità di infezione (MOI) per un sottogruppo di isolati analizzati.

3.3.1 Area e modalità di campionamento

Lo studio è stato condotto principalmente a Ngamiland, a nord-ovest del paese, e nel distretto Centrale, dove la circolazione di *P. falciparum* è maggiore. Sono stati inoltre collezionati campioni in altre regioni del Botswana ad endemia malarica. I campioni di sangue sono stati raccolti su dischetti di carta da filtro da pazienti febbrili, risultati positivi al RDT al giorno 0, recatisi in presidi ospedalieri tra novembre 2012 e aprile 2016, per un totale di 211 pazienti arruolati. Lo studio è stato autorizzato dal “National Malaria Programme” del Ministero della salute del Botswana.

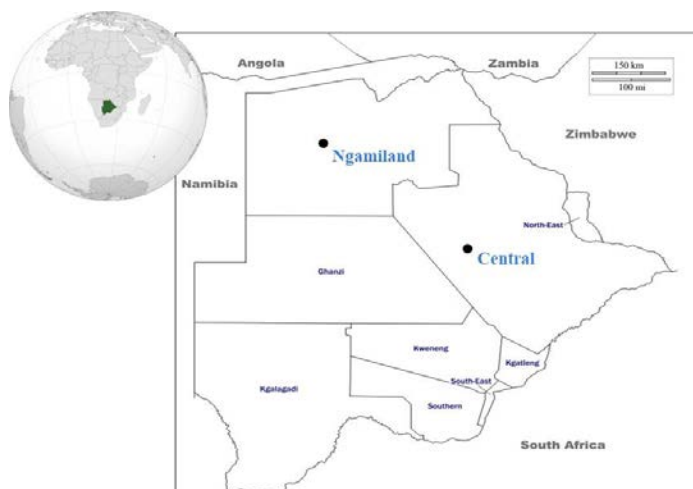


Fig.3.3.1- Siti di campionamento in Botswana

3.3.2 Risultati della genotipizzazione e calcolo della MOI

L'amplificazione del gene *Pfmsp1* è stata eseguita su un sottogruppo di 59 campioni di *P. falciparum* in cui sono state osservate tutte le tre sottofamiglie alleliche di *msp1*: K1, MAD20 e RO33. La sottofamiglia K1 è stata riscontrata con una frequenza del 88,1%, mentre RO33 e MAD20 sono state osservate rispettivamente nel 55,9% e nel 35,6% dei campioni. Tra gli isolati analizzati, il 49,2% (29/59) era caratterizzato da genotipi misti appartenenti a due diverse sottofamiglie alleliche. Inoltre, 9 campioni (15,2%) hanno mostrato tutte e tre le sottofamiglie alleliche del gene polimorfico *msp1* (figura 3.3.2). La maggior

parte dei campioni (43/59) ha mostrato, per la stessa famiglia allelica, varianti multiple: 21 campioni erano caratterizzati da 2 varianti, 10 campioni da 3 varianti, 10 da 4 varianti, mentre due diversi isolati hanno mostrato 5 e 6 varianti, per un totale di 139 varianti alleliche osservate in 59 campioni (figura 3.3.2). La molteplicità di infezione (MOI) è risultata uguale a 2,3. Non è stata stabilita un'associazione significativa tra età dei soggetti analizzati e MOI (coefficiente per rango di Spearman = 0,02; P = 0,8).

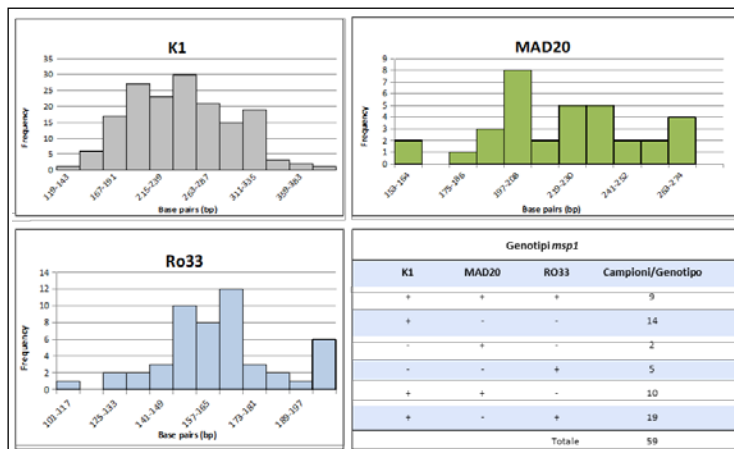


Fig.3.3.2- Numero di campioni per ciascuna sottofamiglia allelica di *PfmSP1* e rispettive varianti alleliche osservate in 59 campioni analizzati.

3.3.3 Valutazione dei marcatori molecolari di farmaco-resistenza

La caratterizzazione molecolare dei campioni di *P. falciparum* analizzati è stata effettuata tramite sequenziamento con il metodo di Sanger.

Pfk13

L'amplificazione e il successivo sequenziamento del gene *PfK13* è stato condotto su un totale di 127 isolati analizzati. Rispetto alla sequenza di riferimento wild-type PF3D7_1343700 del gene *PfK13*, sono state identificate due mutazioni sinonime, R513R e V555V in tre distinti isolati di *P. falciparum*. Tutti gli altri campioni sequenziati sono stati classificati come wild-type rispetto alla sequenza di riferimento PF3D7_1343700.

Pfmdr1

L'analisi molecolare delle mutazioni del gene *Pfmdr1* è stata ottenuta su 166 isolati di *P. falciparum* analizzati. I risultati relativi alla suddetta analisi sono riassunti in tabella 2. Il sequenziamento della regione comprensiva del codone 86 ha messo in evidenza un'alta frequenza della forma wild-type N86, presente nel 92,17% degli isolati (153/166), mentre la presenza dell'allele mutato 86Y è stato identificato in 13 isolati (7.83%), di cui 7 (4.2%) nella forma pura, e 6 (3.6%) come infezioni policlonali. Per 96 isolati è stata inoltre valutata l'espressione del

gene *Pfmdr1* come variazione del numero di copie del gene (CNV, copy number variation), tramite il metodo comparativo di Livak. L'analisi molecolare ha rivelato la presenza di 79 campioni (82.3%) caratterizzati da una singola copia del gene, 17 isolati (17.7%) con due copie del gene, e solo un isolato con 3 copie del gene *Pfmdr1*, come mostrato in tabella 3.

<i>Pfmdr1</i>		
166 Campioni	wt N86	mut Y86
n	153	13
%	92,17%	7,83%

Tabella 2 – Polimorfismi del gene *Pfmdr1* al codone 86

CNV <i>Pfmdr1</i>			
96 Campioni	1 Copia	2 Copie	3 Copie
N°	79	16	1
%	82,29%	16,67%	1,04%

Tabella 3 - Copy Number Variation del gene *Pfmdr1*

3.4 Guinea Conakry

La Guinea Conakry è uno stato dell’Africa occidentale. Si affaccia ad ovest sull’oceano Atlantico, a nord confina con la Guinea-Bissau e il Senegal e a nord-est con il Mali; a sud-est confina con la Costa D’Avorio, e con la Liberia e Sierra Leone a sud. È caratterizzata da un territorio prevalentemente montuoso a clima tropicale, con elevate temperature e modeste escursioni termiche. La stagione invernale, da novembre a marzo, è secca, mentre quella estiva, da aprile a ottobre, coincide con la stagione delle piogge. Tra luglio e agosto le piogge possono diventare di carattere torrenziale, con temperature elevate e intensa umidità. In Guinea, la malaria rappresenta la principale causa di ospedalizzazione e di morte, e la quasi totalità dei casi registrati è da attribuirsi all’infezione da *P. falciparum*. L’attuale approccio terapeutico adottato in questo paese prevede l’utilizzo di artesunato in combinazione con l’amodiachina (AS+AQ) nei casi di malaria non complicata, e di solo AS nei casi di malaria grave. Nel 2014, l’epidemia del virus Ebola ha avuto un significativo impatto negativo sulla salute pubblica del paese, sommandosi alla già importante endemia malarica. In risposta all’incalzante epidemia di Ebola, il Ministero della Salute, in collaborazione con il Programma nazionale di lotta alla malaria, ha avviato molteplici studi di valutazione dell’impatto della suddetta epidemia in tutte le strutture sanitarie del paese. In questo scenario, grazie alla collaborazione con il “Centre de Formation et de Recherche en

Santé Rurale de Mafèrinayah”, è nato il lavoro di sorveglianza molecolare alla resistenza ai farmaci antimalarici in Guinea, paese coinvolto anche, insieme a Burkina Faso e Nigeria, in un progetto di Formazione in Malariologia supportato dal Ministero degli Affari Esteri-Cooperazione Italiana e dal Centro Interuniversitario di Ricerca sulla Malaria, “Italia Malaria Network”. L’obiettivo primario di questo studio è stato quello di indagare la presenza di mutazioni nel gene *Pfk13* in isolati di *P. falciparum* per monitorare la possibile emergenza della resistenza all’artemisinina, e dei suoi derivati. Inoltre, sono stati analizzati i polimorfismi del gene *Pfmdr1*, utilizzato come marcatore molecolare di resistenza agli amminochinolinici.

3.4.1 Aree e modalità di campionamento

Il progetto è stato realizzato in collaborazione con il “Centre de Formation et de Recherche en Santé Rurale de Mafèrinayah” (CFRSR) a Conakry, che ha eseguito le attività di raccolta dei campioni in diversi villaggi nell’area di Mafèrinayah. Questo distretto si estende per 500 km², nella regione della Guinea-Basse; dista 75 km dalla capitale Conakry e circa 25 km da Coyah e Forécariah. Sono stati raccolti 50 campioni prelevati da pazienti con infezione da *P. falciparum* microscopicamente diagnosticata, non trattati con alcun tipo di terapia antimalarica. Al fine di condurre analisi molecolari sui suddetti campioni, il sangue del

paziente è stato prelevato tramite puntura del polpastrello, e raccolto su carta da filtro in triplicato. I campioni raccolti, una volta asciugati all'aria, sono stati inseriti separatamente in buste di plastica e opportunamente conservati fino al loro processamento. La raccolta dei campioni di sangue è stata effettuata dopo aver ottenuto il consenso informato da parte del paziente o del suo tutore legale, e l'approvazione etica di questo studio è stata ottenuta presso il Comitato Etico del CFRSR di Conakry.



Fig.3.3.1- Siti di campionamento in Guinea Conakry

3.4.2 Valutazione dei marcatori molecolari di farmaco-resistenza

L'analisi molecolare dei campioni di *P. falciparum* provenienti dalla Guinea Conakry è stata effettuata tramite amplificazione genica e successivo sequenziamento col metodo di Sanger.

Pfk13

L'amplificazione del gene *Pfk13* è stata effettuata su tutti i 50 campioni raccolti, ma di questi solo 43 sono stati sequenziati poiché 7 hanno fallito l'amplificazione. Rispetto alla sequenza di riferimento wild type PF3D7_1343700 del gene *PfK13*, sono state identificate due mutazioni non sinonime nel dominio propeller, G538S e A578S in due distinti isolati di *P. falciparum*. Tutti gli altri campioni sequenziati sono stati classificati come wild-type rispetto alla sequenza di riferimento PF3D7_1343700.

Pfmdr1

La caratterizzazione molecolare delle mutazioni del gene *Pfmdr1* è stata ottenuta su 43 isolati di *P. falciparum* amplificatisi con successo. I risultati relativi alla suddetta analisi sono riassunti di seguito in tabella 4a. Il sequenziamento della regione comprensiva dei codoni 86 e 184 ha messo in evidenza un'alta percentuale

dell'allele wild type N86 presente nell'83.72% degli isolati (36/43) e il 16.28% dei campioni mutati per lo stesso codone nella forma 86Y; il cambiamento amminoacidico alla posizione 184 nella forma 184F è stato osservato nel 39.54% (17/43) degli isolati mentre la presenza dell'allele wild type 184Y è stato identificato nel 60.46% dei campioni analizzati (26/43). I risultati ottenuti dall'analisi del gene *Pfmdr1* in campioni provenienti dalla Guinea Conakry ha prodotto 4 diversi aplotipi, come mostrato in tabella 4b.

<i>Pfmdr1</i>				
43 Campioni	wt N86	mut Y86	wt Y184	mut F184
N°	36	7	26	17
%	83,72%	16,28%	60,46%	39,54%

Tabella 4a– Mutazioni puntiformi del gene *Pfmdr1* ai codoni 86 e 184

<i>Pfmdr1</i>				
Aplotipi	86	184	N° isolate	%
wild-type	N	Y	16	37,20%
1 mut	Y	Y	7	16,27%
1 mut	N	F	17	39,53%
2 mut	Y	F	3	7%

Tabella 4b– Aplotipi risultanti dell'analisi del gene *Pfmdr1* ai codoni 86 e 184

3.5 Analisi dell'espressione del gene *Pfpm2*

La piperachina è un importante farmaco antimalarico utilizzato in combinazione con l'artemisinina (ACT) per il trattamento della malaria non complicata da *P. falciparum*. È stato osservato che un aumentato numero di copie dei geni plasmepsina 2 e 3 (*Pfpm2* e 3) è associato ad una diminuita suscettibilità di ceppi di *P.falciparum* alla piperachina. In collaborazione con il CDC di Atlanta, è stato sviluppato un nuovo ed innovativo saggio basato sul metodo di PET-RT-PCR per la quantificazione del numero di copie del gene *Pfpm2*. Questo saggio è stato validato utilizzando 3 campioni cambogiani, gentilmente forniti dal Dr. Didier Ménard, di cui si conosceva il numero di copie del gene *Pfpm2*, e testato per due campioni provenienti rispettivamente dalla Cambogia e dall'Etiopia, relativi a due distinti casi di importazione in Italia.

3.5.1 Case Report su un paziente italiano al rientro dalla Cambogia

Il caso di malaria importata preso in esame era stato causato da una doppia infezione mediata da *P. vivax* / *P. falciparum* in un paziente italiano che non aveva assunto il trattamento chemioprolattico mentre viaggiava in Cambogia. Rientrato in Italia, il paziente, talassemico, presentava febbre alta, brividi, tosse e diarrea. A

causa della persistenza della sintomatologia dopo trattamento con ciprofoxacina e paracetamolo, è stato ricoverato in ospedale dove è stata diagnosticata la malaria da *P. vivax* e *P. falciparum* tramite PCR. Il paziente è stato quindi trattato prima con diidroartemisinina-piperachina per 3 giorni, poi con primachina per 14 giorni, e dopo un rapido decorso clinico è stato dimesso. Sfortunatamente il paziente è stato riammesso in ospedale per la ricomparsa dei sintomi clinici della malaria, e sulla base delle analisi molecolari è stato identificato un ceppo di *P. falciparum* multiresistente. L'analisi dei polimorfismi degli isolati di *P. falciparum* ha mostrato un pattern di resistenza multipla derivante della presenza di mutazioni puntiformi nei geni *Pfcr1* e *Pfmdr1* associate alla resistenza ai chinolinici (inclusa l'amodiachina), mutazioni correlate alla resistenza alla sulfadossina/pirimetamina nei geni *Pfdhps* e *Pfdhfr*, e nel gene *Pfk13* mutazione al codone 580 (C→Y), classificata come un importante determinante di resistenza all'artemisinina in isolati di *P. falciparum* nel Sud-est asiatico. La valutazione dell'espressione del gene *Pfpm2* ha mostrato la presenza di 3 copie del suddetto gene, confermando così che il fallimento terapeutico era dovuto alla presenza di mutazioni nei geni marcatori di resistenza antimalarica. Non avendo osservato alcuna mutazione nel gene *Pfcytb*, il caso è infine stato risolto in seguito alla somministrazione di atovaquone-proguanile.

3.5.2 Case Report su un migrante Etiope

Il presente caso fa riferimento al fallimento terapeutico con diidroartemisinina e piperachina in un migrante etiope affetto da malaria non complicata da *P. falciparum*, arrivato in Italia dopo aver viaggiato nel suo paese di origine senza aver seguito alcun trattamento chemioprolattico. Dopo ammissione in ospedale, conferma di diagnosi malarica e trattamento con DHA-PPQ e Levofloxacina, il paziente ha manifestato nuovamente febbre, malessere, brividi e vomito dopo 30 giorni dalla fine del trattamento farmacologico. Il caso è stato risolto con la somministrazione di chinino endovena e meflochina per via orale. La caratterizzazione molecolare dell'isolato di *P. falciparum* responsabile dell'infezione non ha mostrato mutazioni nel gene *Pfk13*, associato alla resistenza all'artemisinina, mentre la quantificazione dell'espressione genica di *Pfpm2* ha identificato una singola copia del suddetto gene. Mutazioni puntiformi sono state invece indettificate nei geni *Pfcrt*, *mdr1*, *dhps* e *dhfr*. Il fallimento terapeutico nel paziente non è quindi stato imputato alla resistenza ai farmaci antimalarici utilizzati.

4 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La malaria rappresenta la più importante parassitosi umana, e per questo attualmente viene considerata uno dei più grandi problemi di salute pubblica mondiale. Nel 2016 i casi di malaria stimati nel mondo sono stati circa 216 milioni, con circa 445.000 decessi, la maggior parte dei quali concentrati nell’Africa Sub-sahariana nei bambini sotto i 5 anni di età. Considerando il numero dei paesi in cui ancora si verifica la trasmissione della malattia (91), circa la metà della popolazione mondiale è tutt’ora a rischio di contrarre la malaria (World Malaria Report, 2017). Per una corretta gestione e sorveglianza della malaria è cruciale una diagnosi precoce ed accurata, infatti le diagnosi errate o ritardate sono la principale causa degli elevati indici di morbilità e mortalità registrati soprattutto in Africa Sub-sahariana. A tutt’oggi, la chemioprolifassi e la chemioterapia antimalarica rimangono strumenti chiave per il controllo e l’eliminazione della malaria nelle aree ad elevata trasmissione. I farmaci utilizzabili per il trattamento della malaria sono ascrivibili ad almeno cinque classi distinte (chinolinici, antifolati, atovaquone antibiotici e derivati dell’artemisinina) che differiscono tra loro per il principio attivo utilizzato e/o per il meccanismo d’azione e per il target. Dalla fine degli anni ‘50, si è osservato come il ritmo con cui il plasmodio ha sviluppato resistenza ai farmaci antimalarici abbia nettamente superato il ritmo con cui sono state sviluppate nuove strategie farmacologiche. Nell’ultimo decennio, l’introduzione delle terapie

combinata a base di artemisinina, per il trattamento di prima scelta della malaria non complicata da *P. falciparum*, ha permesso il raggiungimento di straordinari risultati nel controllo della malattia, specialmente in Africa Sub-sahariana. Tuttavia, la comparsa della resistenza all'artemisinina nel Sud-Est Asiatico, e la possibile diffusione della stessa nel continente africano, mettono a rischio i traguardi raggiunti fino ad oggi nella lotta contro la malaria. Lo studio e la conoscenza dei pathways molecolari alla base della farmaco-resistenza rivestono un ruolo fondamentale nell'attività di sorveglianza della resistenza agli antimalarici. Numerosi studi di biologia molecolare hanno portato, infatti, in isolati di *P. falciparum*, all'identificazione di mutazioni puntiformi nei geni *Pfcr1*, *Pfmdr1*, *Pfdhps*, *Pfdhfr* e *Pfcytb*, associate alla resistenza alle principali classi di farmaci antimalarici. Queste mutazioni vengono correntemente utilizzate come marcatori molecolari di farmaco-resistenza. Studi recenti hanno permesso l'identificazione e la validazione del gene *Pfk13* come marcatore molecolare di resistenza all'artemisinina (Ariey et al., 2014). In particolare, è stato osservato come le mutazioni non sinonime P441L, F446I, G449A, N458Y, M476I, C469Y, A481V, Y493H, S533C, N537I, G538V, R539T, I543T, P553L, R561H, V568G, P574L, A578S, C580Y, D484V, e A675V siano associate nel Sud-Est Asiatico alla resistenza all'artemisinina. Per contro, in isolati africani di *P. falciparum*, sono stati descritti elevati livelli di polimorfismi nel dominio propeller del gene *k13*, ma nessuna delle mutazioni identificate è stata associata ad un'aumentata tolleranza e/o

resistenza all'artemisinina (Ménard *et al.*, 2016; Mohamed *et al.*, 2017; Ashley *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2017). Se nel continente africano la resistenza all'artemisinina e ai suoi derivati non è mai stata descritta, è invece ben nota la resistenza sviluppata da isolati di *P. falciparum* alle altre classi di farmaci antimalarici. Per determinare l'efficacia terapeutica di un farmaco, l'OMS identifica negli studi di efficacia terapeutica (*in vivo* test, o Therapeutic Efficacy Studies, TESs) il gold standard. Ciononostante, la realizzazione di questi studi richiede un grosso sforzo organizzativo, ed è caratterizzata da lunghi e complessi tempi di svolgimento. Inoltre, è stato dimostrato come i TESs possano essere condizionati da molti fattori, tra cui l'immunità del soggetto trattato, e la farmacocinetica. Al contrario, lo studio della farmaco-resistenza attraverso l'analisi dei marcatori molecolari si è dimostrato utile per la precoce individuazione (Chenet *et al.*, 2016) dell'eventuale emergenza e diffusione della farmaco-resistenza in *P. falciparum* (Abdul-Ghani *et al.*, 2014) (Taylor *et al.*, 2015). I saggi molecolari sono caratterizzati dall'enorme vantaggio di poter fornire informazioni epidemiologiche sui parassiti resistenti e circolanti nella popolazione in esame, utilizzando campioni biologici di facile reperibilità (per es. DBSs) (Nag *et al.*, 2017). Sebbene la presenza di mutazioni nei marcatori molecolari validati come determinanti di farmaco-resistenza non indichi necessariamente il fallimento del trattamento antimalarico (Picot *et al.*, 2009), è sicuramente un segnale di allarme che va preso nella giusta considerazione in fase di implementazione dei locali

programmi di lotta. Per questa ragione, i marcatori molecolari vengono sempre più impiegati come strumenti chiave nel monitoraggio della diffusione della resistenza ai farmaci antimalarici (Nsanjabana *et al.*, 2010). La recente introduzione di tecnologie di sequenziamento di nuova generazione, come le piattaforme NGS o WGS, consente di ottenere informazioni rapide e approfondite sui marcatori molecolari, e allo stesso tempo, di avere una valutazione dettagliata della diffusione dei ceppi plasmodiali resistenti (Miotto *et al.*, 2015; Imwong *et al.*, 2017).

In questo contesto, nel presente lavoro è stato condotto uno screening molecolare di valutazione delle resistenza associata ai farmaci antimalarici in campioni provenienti da quattro distinti paesi africani: Camerun, Eritrea, Botswana e Guinea Conakry. Sulla base dei risultati ottenuti e qui riportati, non sono stati identificati polimorfismi che possano indicare una possibile resistenza all'artemisinina. Cionondimeno, per i campioni provenienti dal Camerun e dall'Eritrea, grazie all'applicazione del protocollo MaRS di sequenziamento e analisi bioinformatica di nuova generazione, che ha permesso l'analisi dell'intera lunghezza del gene *Pfk13*, è stato osservato un discreto numero di polimorfismi all'interno e all'esterno della regione propeller; questo risultato è coerente con quanto descritto in precedenza in altri lavori di sorveglianza molecolare condotti in Africa Sub-Saharan (Amato *et al.*, 2016; Kamau *et al.*, 2015; Conrad *et al.*, 2014; Torrentino-Madamente *et al.*, 2014). Nel dominio propeller del gene *Pfk13* sono stati osservati un totale 7 polimorfismi, di cui

4 non sinonimi (T573S, T535M, R622I e T703K) e 3 sinonimi (A617A, A627A e C469C), nei campioni camerunensi ed eritrei. Di questi, il polimorfismo al codone 535 (T→M) era stato precedentemente descritto in Costa d'Avorio (Ménard *et al.*, 2016), mentre quello alla posizione 622 (R→I) era già stata osservato in Zambia ed Etiopia (Bayih *et al.*, 2016; Ménard *et al.*, 2016). All'esterno del dominio propeller, la sostituzione amminoacidica K189T è stata quella maggiormente rilevata sia nei campioni del Camerun sia in quelli Eritrei; questa mutazione è particolarmente frequente negli isolati africani sensibili all'artemisinina (Ocholla *et al.*, 2014), così come negli isolati dell'Asia meridionale (Zaw *et al.*, 2018). Anche le mutazioni non sinonime K189N e N217H, esterne al dominio propeller del gene *Pfk13*, sono molto comuni negli isolati africani sensibili all'artemisinina (Talundzic *et al.*, 2018). Inoltre, in Guinea Conakry e in Botswana, dove i campioni positivi all'infezione da *P. falciparum* sono stati sequenziati tramite il metodo di Sanger, all'interno del dominio propeller sono state identificate 2 mutazioni non sinonime, A538S e A578S, e due sinonime R515 e V555V, di cui nessuna associata alla resistenza all'artemisinina. In particolare, la mutazione A578S è comunemente diffusa negli isolati africani (Ménard *et al.*, 2016), e in quelli asiatici (Ashley *et al.*, 2014), pur non essendo mai stata associata al fallimento terapeutico o alla resistenza *in vitro* all'artemisinina (Ménard *et al.*, 2016). Il ruolo di questo SNP non è ancora definito. Tuttavia, questa mutazione al codone 578 è adiacente al codone 580, nel quale la sostituzione amminoacidica

C→Y è la principale mutazione associata alla resistenza all'artemisinina nel Sud-Est Asiatico (Ashley *et al.*, 2014; Ariei *et al.*, 2014), e per cui le analisi di modelling predicono un effetto significativo sulla struttura terziaria della proteina K13 (Mohon *et al.*, 2014).

Le mutazioni a carico dei geni *Pfcr* e *Pfmdr1* sono considerate determinanti di resistenza agli amminochinolinici.

I risultati dello screening molecolare effettuato sugli isolati camerunensi per il gene *Pfcr*, tramite il protocollo di sequenziamento NGS, hanno mostrato un'alta frequenza dell'allele wild type K76, che quando presente nella forma mutata 76T è associato alla resistenza alla cloroquina. È stato ampiamente dimostrato che in assenza della pressione selettiva della cloroquina sugli isolati plasmidiali si verifici un ritorno dell'aplotipo wild type sensibile al farmaco (Kublin *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2016). Questo fenomeno potrebbe essere alla base della così bassa percentuale di isolati mutati per il gene *Pfcr* osservati in Camerun, come risultato dell'interruzione del trattamento della malaria non complicata da *P. falciparum* con la cloroquina, e l'introduzione nel 2007 della terapia combinata a base di artemisinina.

I polimorfismi del gene *Pfmdr1* ai codoni 86, 184, 1034, 1042 e 1246 sono stati associati alla resistenza alla cloroquina (Reed *et al.*, 2000), e intervengono nella modulazione della suscettibilità o tolleranza del plasmodio al chinino, alla meflochina e all'amodiachina (Sidhu *et al.*, 2005). I dati risultanti dal sequenziamento e dall'analisi bioinformatica della piattaforma

MaRS per il gene *Pfmdr1*, per i campioni provenienti dal Camerun, dimostrano la presenza di mutazioni puntiformi ai soli codoni 86 e 184. Studi di sorveglianza molecolare condotti in Africa, suggeriscono che le mutazioni al codone 86 inducano una ridotta suscettibilità alla cloroquina, mentre le mutazioni al codone 184 possano essere coinvolte nella resistenza a diverse classi di farmaci antimalarici (Dokomajilar *et al.*, 2006). In particolare, tra gli isolati camerunensi analizzati, la forma 184F è stata la più frequente sostituzione osservata, nel 42% dei campioni, rispetto al 6% dei campioni per i quali è stata osservata la mutazione al codone 86 (N→Y). Questo dato è in linea con quanto osservato in Senegal (Wurtz *et al.*, 2014) e in Guinea Equatoriale (Li *et al.*, 2015). Inoltre, tramite il sequenziamento con il metodo di Sanger, nei campioni provenienti dalla Guinea Conakry, è stata osservata la stessa tendenza, ovvero una maggiore percentuale di isolati mutati al codone 184 (~40%) rispetto a quelli mutati al codone 86 (~16%). In Botswana, per il solo codone 86, si è osservata una piccola percentuale di isolati mutati (~8%), mentre il 92% degli isolati analizzati ha mostrato la forma wild-type N86. È stato dimostrato che la variante allelica wild type N86 induce una ridotta sensibilità alla lumefantrina e all'amodiachina (Wurtz *et al.*, 2014), mentre conferisce suscettibilità alla cloroquina. In aggiunta, l'identificazione del 17.7% degli isolati con un aumentato numero di copie del gene *Pfmdr1* è un dato rilevante in Africa, dove solo raramente si osserva un'amplificazione di questo gene. Come descritto in letteratura, l'amplificazione del suddetto gene è stata

associata, *in vivo* e *in vitro*, non solo alla diminuita suscettibilità ai derivati dell'artemisinina e alla meflochina, ma anche alla lumefantrina (Price *et al.*, 2004; Sidhu *et al.*, 2006; Uhlemann *et al.*, 2005). Questi dati suggeriscono un elevato potenziale per la rapida selezione di resistenza alla lumefantrina e all'amodiachina (Price *et al.*, 2010).

Come descritto, il gene *Pfcytb*, localizzato nel genoma mitocondriale di *P. falciparum*, è implicato nella resistenza all'AP. In particolare, le mutazioni I258M e Y268S/C in questo gene riducono drasticamente la sensibilità all'atovaquone in combinazione con il proguanil (Kamau *et al.*, 2015). Nei campioni camerunensi analizzati non è stata riscontrata alcuna di queste mutazioni, indicando la piena suscettibilità degli isolati al trattamento con l'associazione atovaquone/proguanil (A/P, Malarone®). Questo risultato conferma la validità della strategia profilattica basata sulla somministrazione di A/P nei viaggiatori verso l'Africa, e talvolta utilizzata come trattamento della malaria non complicata da *P. falciparum* in Europa e negli Stati Uniti (LaRocque *et al.*, 2012; Cordel *et al.*, 2013).

Le mutazioni nei geni *Pfdhfr* (N51I, C59R, e S108N) e *Pfdhps* (S436A, S436F, A437G, K540E, A581G, e A613S9) sono associate rispettivamente alla resistenza alla pirimetamina (Cowman *et al.*, 1988) e alla sulfadossina (Triglia *et al.*, 1997). L'analisi molecolare, tramite l'utilizzo della piattaforma MaRS per i campioni camerunensi, ha evidenziato un'elevata frequenza (66.4%) dell'aplotipo IRN per il gene *Pfdhfr*, mentre la mutazione

I164L non è stata osservata in nessuno degli isolati: questo dato è coerente con quanto precedentemente descritto in Camerun (Tahar *et al.*, 2007; McCollum *et al.*, 2008; Chauvin *et al.*, 2015).

La mutazione A437G nel gene *Pfdhps*, coinvolta nella resistenza alla sulfadossina, è molto comune in Africa e la sua prevalenza nel 2005 in Camerun era del 69% (Menemedengue *et al.*, 2011). Nel presente lavoro questa mutazione è risultata la più frequentemente osservata nei campioni analizzati (~60%). Gli altri polimorfismi nel gene *Pfdhps* che concorrono alla manifestazione della resistenza alla sulfadossina sono stati osservati con frequenze diverse: S436A (34%), K540E (1.7%), A581G (9%), e A613S (13%). Di questi, il polimorfismo al codone 540 è molto comune a bassa frequenza in Africa centrale ed occidentale, e in Camerun nel 2011 è stata osservata con una prevalenza del 2% (Chauvin *et al.*, 2015). Inoltre il polimorfismo I431V nel gene *Pfdhps*, precedentemente descritto in Camerun da Chauvin, è stato qui osservato in 22 isolati sempre in associazione con le mutazioni S436A/A437G.

In conclusione, i risultati ottenuti dall'analisi molecolare del sequenziamento tramite la piattaforma MaRS e tramite il metodo di Sanger, per un totale di 930 campioni provenienti da quattro paesi endemici africani, fanno dedurre la piena suscettibilità di tutti gli isolati di *P. falciparum* all'artemisinina. L'elevata frequenza di varianti alleliche wild type al codone 86, e le mutazioni al codone 184 del gene *Pfmdr1*, così come l'aumentata espressione di questo gene, suggeriscono un potenziale rischio di resistenza

all'amodiachina e alla lumefantrina, utilizzati come farmaci partner nelle diverse ACTs. Inoltre, l'indagine molecolare condotta sui campioni camerunensi dimostra come l'evoluzione delle politiche farmacologiche a base di ACT per il trattamento della malaria non complicata da *P. falciparum* possano gradualmente favorire il ritorno di genotipi sensibili alla cloroquina.

I marcatori molecolari di resistenza agli antifolati, *Pfdhfr* e *Pfdhps*, sono risultati avere un elevato numero di codoni mutati, rafforzando l'idea della presenza di genotipi circolanti altamente resistenti alla sulfadossina/pirimetamina in Africa occidentale: ciò mette in luce la possibilità di osservare una ridotta efficacia del trattamento intermittente preventivo di SP somministrato alle donne in gravidanza.

Data la preoccupante insorgenza della resistenza all'artemisinina nel Sud Est Asiatico, il maggior timore della comunità scientifica internazionale è quello che questa possa diffondersi nel continente africano, come è storicamente accaduto per gli altri farmaci antimalarici, poiché non esistono nuove formulazioni terapeutiche in fase di sviluppo preclinico, e non esistono terapie combinate che non prevedano l'utilizzo di derivati dell'artemisinina. In questo scenario, l'OMS raccomanda un costante monitoraggio dell'efficacia terapeutica dell'ACT in tutti i paesi endemici. Con questo scopo, è nato il "WWARN" (WorldWide Antimalarial Resistance Network), ovvero una piattaforma di ricerca globale che fornisce evidenze scientifiche aggiornate sulla diffusione della

resistenza ai farmaci antimalarici.

Nel contesto della sorveglianza alla resistenza ai farmaci antimalarici, e in particolare all'artemisinina, si inserisce il presente lavoro di tesi. I risultati fin qui raccolti, dimostrano la necessità di effettuare una costante attività di screening, soprattutto nei paesi endemici ad elevata trasmissione malarica, nel tentativo di non rendere vani gli sforzi compiuti fino ad oggi per garantire il controllo e l'eliminazione della malaria.

5 PUBBLICAZIONI PRODOTTE

Dell'Acqua R, Fabrizio C, Di Gennaro F, Lo Caputo S, Saracino A, Menegon M, **L'Episcopia M**, Severini C, Monno L, Castelli F, Angarano G. An intricate case of multidrug resistant *Plasmodium falciparum* isolate imported from Cambodia. **Malar J**. 2017 Apr 14;16(1):149. doi: 10.1186/s12936-017-1795-y. PubMed PMID: 28410610; PubMed Central PMCID: PMC5391556

Menegon M, **L'Episcopia M**, Nurahmed AM, Talha AA, Nour BYM, Severini C. Identification of *Plasmodium falciparum* isolates lacking histidine-rich protein 2 and 3 in Eritrea. **Infect Genet Evol**. 2017 Nov;55:131-134. doi: 10.1016/j.meegid.2017.09.004. Epub 2017 Sep 8. PubMed PMID: 28889944.

Souza SS, **L'Episcopia M**, Severini C, Udhayakumar V, Lucchi NW. Photo-Induced Electron Transfer Real-Time PCR for Detection of *Plasmodium falciparum* plasmepsin 2 Gene Copy Number. **Antimicrob Agents Chemother**. 2018 Jul 27;62(8). pii: e00317-18. doi: 10.1128/AAC.00317-18. Print 2018 Aug. PubMed PMID: 29866871; PubMed Central PMCID: PMC6105858.

Russo G, **L'Episcopia M**, Menegon M, Souza SS, Dongho BGD, Vullo V, Lucchi NW, Severini C. Dihydroartemisinin-piperazine treatment failure in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria case imported from Ethiopia. **Infection**. 2018 Jul 6. doi: 10.1007/s15010-018-1174-9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29980936.

Tawe L, Menegon M, Ramatlho P, Muthoga CW, Mutukwa N, Vurayai M, Bothudile W, Motshoge T, **L'Episcopia M**, Mosweunyane T, Kasvosve I, Severini C, Paganotti GM. Molecular Surveillance of *Plasmodium falciparum* Drug

Resistance Markers in Clinical Samples from Botswana. **Am J Trop Med Hyg**. 2018 Oct 22. doi: 10.4269/ajtmh.18-0440. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30350774.

5.1 Comunicazioni a Congressi

Corpolongo A, Paglia MG, Vulcano A, Mariano A, Bevilacqua N, Giancola ML, Oliva A, Migliorisi P, Mencarini P, Vairo F, Severini C, **L'Episcopia M**, Menegon M, Ippolito G, Nicastrì E. Polymorphisms of the artemisinin resistant marker (Pfk13) in Plasmodium falciparum isolates from imported malaria populations of Italy's national institute for infectious diseases Lazzaro Spallanzani. Abstract book: **XV Congresso Nazionale SIMIT**, Baveno 16 - 19 Oct, 2016. Abstract 34, p. 123.

Menegon M, **L'Episcopia M**, Boccolini D, Paglia MG, Gradoni L, Severini C. Valutazione di un nuovo test commerciale LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) per la diagnosi molecolare di malaria. Abstract book: **XV Congresso Nazionale SIMIT**, Baveno 16 -19 Oct, 2016. Abstract 19, p. 126.

Menegon M, **L'Episcopia M**, Boccolini D, Paglia MG, Gradoni L, Severini C. Comparison between a novel commercial assay based on loop mediated isothermal amplification (LAMP) and PCR-nested assay for molecular diagnosis of Plasmodium parasites. Abstract book: **ASTMH 65th Annual Meeting** November 13-17, 2016 Atlanta, Georgia, USA, abstract 278, p. 87.

L'Episcopia M, Menegon M, Paganotti G, Beavogui AH, Severini C. Molecular investigation on artemisinin resistance related genes in Plasmodium falciparum isolates from Botswana and Guinea Conakry. Oral communication: **CIRM-IMN Meeting** – ISS, 19-20 gennaio 2017.

L'Episcopia M, Poerio N, Taus F, Menegon M, Pardini E, Mariotti S, Santucci MB, Nisini R, Fraziano M, Severini C. Asymmetric liposomes restore phagocytic and killing functions in hemozoin loaded human macrophages. Poster Session: **CIRM–IMN Meeting** – ISS, 19-20 gennaio 2017.

L'Episcopia M, Menegon M, Paganotti GM, Beavogui AH, Modiano D, Severini C. Assessment of markers of antimalarial drug resistance in Plasmodium falciparum isolates from two African endemic countries. **VIII Seminar – PhD Day**. Interdisciplinary approaches in health sciences: a bridge to the future. Istituto Superiore di Sanità. Rome, June 5, 2017. Abstract book. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (ISTISAN Congressi 17/C3). p.30.

Dongho BGD, Sobze MB, **L'Episcopia M**, Menegon M, Georges MB, Tsapi AT, Kien-Atsu T, Sangong RE, Pallawo IB, Doll C, Severini C, Paganotti G, Russo G. Fever and malaria management involving misdiagnosis and over-treatment in sub-saharan african countries: the case of Santchou Hhealth District, Cameroon. Abstract book: **7th MIM Pan African Malaria Conference** - Dakar, April 15-20, 2018. B011, p. 94.

L'Episcopia M, Menegon M, Talundzic E, Nurahmed AM, Talha AA, Nour BYM, Dongho BGD, Russo G, Paganotti G, Beavogui AH, Menard D, Udhayakumar V, Lucchi N, Modiano D, Severini C. Molecular surveillance of artemisinin resistance in plasmodium falciparum isolates from malaria endemic countries of Africa. **IX Seminar – PhD Day**. FILLING THE SCIENCE COMMUNICATION GAP. Istituto Superiore di Sanità. Rome, May 17, 2018. Abstract book. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2017. (ISTISAN Congressi 18/C2). p.7.

Boccolini D, Menegon M, Di Luca M, Toma L, Severini F, **L'Episcopia M**, Caraglia A, D'Amato S, Maraglino F, Romi R, Gradoni L, Severini C. Malaria surveillance in Italy: a public health topic of relevance. Abstract book: **XXX Congresso Nazionale SoIPA**, Milano 26 -29 Giugno, 2018.

L'Episcopia M, Menegon M, Severini C, Nurahmed AM, Talha AA, Nour BYM, Kelley J, Patel D, Ravishankar S, Lucchi N, Udhayakumar V, Talundzic E. Targeted deep amplicon sequencing analysis of kelch 13 and cytochrome b genes in *Plasmodium falciparum* isolates from Eritrea. **67th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene**; New Orleans; Oct. 28- Nov. 1, 2018.

CASE REPORT

Open Access



An intricate case of multidrug resistant *Plasmodium falciparum* isolate imported from Cambodia

Raffaele Dell'Acqua^{1*}, Claudia Fabrizio¹, Francesco Di Gennaro¹, Sergio Lo Caputo¹, Annalisa Saracino¹, Michela Menegon², Mariangela L'Episcopia², Carlo Severini², Laura Monno¹, Francesco Castelli³ and Gioacchino Angarano¹

Abstract

Background: Imported cases of multidrug resistant *Plasmodium falciparum* and treatment failure with artemisinin-based regimens, although rare, have been described also in Western countries and their management is often challenging. This is also due to an inadequate knowledge and implementation of health prevention measures.

Case report: A complex case of imported malaria caused by *Plasmodium vivax/P. falciparum* isolates in a patient who was not taking chemoprophylaxis while he was travelling in Cambodia is reported in this article. After failures of artemisinin-based and both oral and intravenous quinine-based regimens, a multidrug resistant *P. falciparum* was detected. The patient was successfully treated with atovaquone-proguanil.

Conclusions: This experience highlights the importance of a careful management that should be based not only on the most up-to-date guidelines, but also on the awareness of a rapidly evolving scenario.

Keywords: Malaria, Vivax, Malaria, Falciparum, Malaria, Drug resistance, Multiple, Antimalarials, Genes, MDR, Travel medicine, Cambodia

Background

Imported cases of multidrug resistant (MDR) *Plasmodium falciparum* and treatment failure with artemisinin-based regimens, although rare, have been described also in Western countries and their management is often challenging [1, 2]. Even if uncommon, the possibility of imported infections by drug-resistant *Plasmodium* spp. should be considered, especially in travellers returning from highly endemic regions [3], where the most recent first-line artemisinin-based regimens are losing their effectiveness, also due to selective drug pressure [4, 5]. Moreover, the increasing accessibility to remote geographic areas of the world by do-it-yourself travellers not always keeps the pace with an adequate knowledge and

implementation of health prevention measures. The following case illustrates these issues.

Case presentation

A 27-years old male Italian patient, carrying thalassemia trait, returned on November 22nd, 2015 from a 4-week long pleasure trip to Cambodia, without taking any malaria chemoprophylaxis. This trip also included a 5-days trekking throughout the Pursat region. The day before his return, he had a rapid onset of fever up to 39 °C preceded by chills, cough and diarrhoea. Due to the persistence of fever despite therapy with ciprofloxacin and paracetamol, he was admitted to the Clinic of Infectious Diseases, Policlinico Hospital, Bari, on November 25th. Upon admission he had dehydration, mild leucocytosis (white blood cells $11.36 \times 10^9/L$), haemoglobin (Hb) 13.3 g/dL, platelets (PLTs) $62 \times 10^9/L$, C-reactive protein (CRP) 64.8 mg/L. On suspicion of malaria, peripheral blood smears and molecular biology testing (multiplex

*Correspondence: dellacqua.raffaele@gmail.com

¹ Clinic of Infectious Diseases, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Piazza G. Cesare, 11, 70124 Bari, Italy

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



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Real-Time PCR, Fast-Track Diagnostic) were performed, proving to be positive for *P. falciparum* and *Plasmodium vivax*, with a parasitaemia below 2%. A 3-day dihydroartemisinin-piperazine regimen was initiated, with rapid defervescence and good clinical progress. After the end of treatment, blood smears resulted negative and the patient was discharged with prescription of 30 mg/day of primaquine for 14 days for radical cure.

On December 11th he was readmitted due to the re-appearance of fever in the previous 2 days. Primaquine treatment had not been initiated due to delayed supply of the drug which is not readily available in Italy. Laboratory data showed anaemia (Hb 7.3 g/dL, requiring blood transfusion even in the absence of symptoms), thrombocytopenia (PLTs $84 \times 10^9/L$) and CRP elevation (40 mg/L). Peripheral blood smears were again positive for *P. falciparum* trophozoites; *P. vivax* gametocytes were also detected, as an expected biologic evolution without pathologic significance. This finding is consistent with missed start of primaquine. Therefore, a second-line therapy with oral quinine and doxycycline was started. A prompt clinical improvement was observed after 24 h; a 7-day course of therapy was completed leading to negative blood smears. Primaquine administration was withheld until the resolution of *P. falciparum* recrudescence and it was started on December 23rd shortly before hospital discharge. Indeed the patient was dismissed on December 24th with indication to complete a full 14-days course with weekly monitoring of complete blood count.

However, on January 18th the patient presented with fever and diarrhoea. After a few days of symptomatic home treatment with temporary benefit, he was readmitted showing thrombocytopenia (PLTs $110 \times 10^9/L$), anaemia (Hb 9.2 g/dL) and CRP elevation (40.3 mg/L). *Plasmodium falciparum* trophozoites were detected on blood smears and therapy was initiated with intravenous quinine (loading dose of 20 mg/kg, followed by maintenance dose of 10 mg/kg q8h for 7 days) at first and, subsequently, with atovaquone/proguanil, thus obtaining the definitive clearance of the parasite and healing.

The resistance of the *Plasmodium falciparum* isolate infecting this patient to anti-malarial drugs was assessed by the evaluation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of six molecular gene markers (*PfK13*, *Pfprt*, *Pfmdr1*, *Pfdhfr*, *Pfdhps* and *PfCytB*) linked to resistance to artemisinin derivatives, quinolines, antifolates-cycloguanil and atovaquone.

Total DNA was extracted (PureLink Genomic DNA Kits-Invitrogen) from 200 μ L of three patient's blood specimens collected on November 26th, 2015 (first hospital admission), December 15th, 2015 (second admission) and January 29th, 2016 (third admission). The polymorphism of the *P. falciparum* K13-propeller gene, from

codon 427 to codon 690, was assessed using the primers: ArtinnerF (GCCTTGTGAAGAAGCAGAA) and ArtouterR (CGCCATTTCTCCTCCTGTA) and with PCR conditions described by Taylor et al. [6]. Analysis of *Pfprt* and *Pfmdr1* genes was performed as previously reported [7, 8]. Different methods were used for the analysis of fragment of *Pfdhfr* gene spanning codons 51–108, *Pfdhps* domain (719 bp) and point mutation in *PfCytB* gene, according to Palmieri et al. [9], Menegon et al. [7] and Korsinczyk et al. [10], respectively. All PCR products were sent to Eurofins Genomics Company (Germany) for sequencing, and sequences were compiled and analysed by Accelrys DS Gene software.

Analysis of polymorphisms of *P. falciparum* isolates showed a pattern of multidrug resistance due to the presence of point mutations associated with quinoline (including amodiaquine), drug resistance in *Pfprt* and *Pfmdr1*, and mutations correlated to sulfadoxine/pyrimethamine resistance in *Pfdhps* and *Pfdhfr* genes (Table 1). In particular, in the *PfK13* gene was observed the presence of the mutation C580Y, which is an important determinant of artemisinin resistance in *P. falciparum* population circulating in Southeast Asia [11, 12]. The absence of mutations at codons 258 and 268 of *CytB* gene indicated a sensitivity of the *P. falciparum* isolate to atovaquone and is consistent with the good response of the patient to atovaquone/proguanil administration.

Discussion

This report shows the serious consequences, both in terms of clinical impact and health-related expenses, of a rare and extended resistance pattern of *P. falciparum* strain. Indeed, the management of this patient was complex; firstly, because he experienced three subsequent admissions, resulting in a prolonged hospitalization. Furthermore, once malaria recrudescence was confirmed, pharmacological treatment was cumbersome in terms of drug supply, costs, safety profile and consequent need of strict monitoring. An additional issue was represented by molecular analysis, which required the expertise of the Italian National Institute of Health (ISS) since these assays are not routinely available. Lastly, patient's anxiety regarding the course of the disease should also be taken into account.

A double recrudescence of *P. falciparum* in the same patient is a rare event to observe. Moreover, the chance of a recrudescence after a second-line treatment of oral quinine plus doxycycline is very low [13]. Reasons for failure with this regimen may include a decrease in the sensitivity or an inadequate exposure to the drug caused by unusual pharmacokinetics in an individual, scarce adherence to the prescribed regimen or poor quality of anti-malarial drugs [14]. In this case, therefore, the concurrence of

Table 1 Analysis of polymorphisms of the *P. falciparum* isolates

Marker	<i>Pfcr</i>	<i>Pfmdr1</i>					<i>PfL1</i>	<i>Pf</i> Cytochrome <i>b</i>	<i>PfPlfyr</i>	<i>PfDhps</i>				
Codons	74 75 76 97	86 184 1034 1042 1246	S80	258 268	S1 59 108	436 437 540 581 613								
Wild type	M N K H atg aat aaa cac	N Y S N D aag tat agt aat gat	C	I Y aat tat	N C S tct gct aca cgc gcc	S A K A A tct gct aca cgc gcc								
Mutant type	I E T V att gaa aca tac	V F C D V tat ttt tat gat tat	Y	M F/S atg ttg/tgt	I R N aat cgt aac	A/P G E G S/T gct/ttt ggt gaa gga gcc/acc								
Sample November 26, 2015	I E T V att gaa aca tac	N F S N D aat ttt agt aat gat	Y	I Y aat tat	I R N aat cgt aac	S G E G A tct ggt gaa gga gcc								
Sample December 15, 2015	I E T V att gaa aca tac	N F S N D aat ttt agt aat gat	Y	I Y aat tat	I R N aat cgt aac	S G E G A tct ggt gaa gga gcc								
Sample January 29, 2016	I E T V att gaa aca tac	N F S N D aat ttt agt aat gat	Y	I Y aat tat	I R N aat cgt aac	S G E G A tct ggt gaa gga gcc								

Pfcr and *Pfmdr1* genes point mutations are associated with quinoline (including amodiaquine) drug resistance; *PfL1* and *PfDhps* genes mutations are responsible for *P. falciparum* resistance to antifolate-cycloguanil. *PfC580Y* gene mutation is considered an important determinant of artemisinin resistance

Mutant codons from the three different samples are in *blue*

both pathogen- and host-related factors could have been responsible for the second recrudescence.

Based on the multidrug resistance pattern of *P. falciparum*, a complicated clinical course could have been expected. However, with the exception of a single blood transfusion, the patient did not require any extraordinary therapeutic measure. Thalassaemia trait probably played a relevant role in attenuating the severity of the disease, whereas the clinical impact of dual infection was unclear, based on the heterogeneous results of several studies regarding the mutual interactions between the two *Plasmodium* species and the role of immunity [15].

As Cambodia is known to be the cradle of anti-malarial drug resistance, patients returning from this area should be considered at risk for failure of artemisinin-based regimens [16]. Therefore, according to our experience, even the most up-to-date guidelines should be handled with care in this rapidly evolving scenario and to this regard, the atovaquone/proguanil combination may be considered as a valuable therapeutic option in some special cases [17].

In a context of increasing international travel and trades in which exotic regions are easier to reach, the relevance of a proper prophylaxis should be highlighted in order to obtain individual protection. Moreover, in this framework, an increased awareness about the possibility to manage such difficult cases also in non-endemic settings should become a matter of utmost importance.

Abbreviations

MDR: multidrug resistant; Hb: haemoglobin; PLTs: platelets; CRP: C reactive protein; SNPs: single nucleotide polymorphisms; ISS: Istituto Superiore di Sanità.

Authors' contributions

RDA, CF, CS and SLC drafted the manuscript. FDG and AS collected clinical and laboratory data. MM, MLE and CS performed the molecular tests. LM, FC and GA revised the paper critically. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Clinic of Infectious Diseases, Università degli Studi di Bari: Aldo Moro, Piazza G. Cesare, 11, 70124 Bari, Italy. ²Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy. ³University Department of Infectious and Tropical Diseases, Azienda Ospedaliera Spedali Civili di Brescia, Brescia, Italy.

Acknowledgements

None.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Written informed consent for the publication of the present case was obtained from the patient.

Publisher's Note

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

Received: 21 February 2017 Accepted: 1 April 2017

Published online: 14 April 2017

References

- Gobbi F, Bucinfrate D, Menegon M, Lunardi G, Angheben A, Severini C, et al. Failure of dihydroartemisinin-piperaquine treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in a traveller coming from Ethiopia. *Malar J*. 2016;15:525.
- Sondén K, Wyss K, Jovel I, da Silva AV, Pohanka A, Asghar M, et al. High rate of treatment failures in non-immune travelers treated with artemether-lumefantrine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Sweden: retrospective comparative analysis of effectiveness and case series. *Clin Infect Dis*. 2017;64:199–206.
- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amarapura C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2014;371:411–23.

- WHO. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd ed. Geneva: WHO; 2015. ISBN 978-92-4-1549127.
- Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C. Dihydroartemisinin-piperazine failure in Cambodia. *N Engl J Med*. 2014;371:484–5.
- Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kyentao K, Coulbaly SO, Greenwood SM, et al. Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *J Infect Dis*. 2015;211:680–8.
- Menegon M, Pearce RL, Inojosa WO, Pisani V, Abel PM, Matondo A, et al. Monitoring for multidrug resistant *Plasmodium falciparum* isolates and analysis of pyrimethamine resistance evolution in Uige province, Angola. *Trop Med Int Health*. 2009;14:1251–7.
- Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the *pfmdr1* gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;108:13–23.
- Palmieri F, Petrosillo N, Paglia MG, Conte A, Goletti D, Pucillo LP, et al. Genetic confirmation of quinine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria followed by postmalaria neurological syndrome in a traveler from Mozambique. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5424–6.
- Korsinczyk M, Chen N, Koteka B, Saul A, Beckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2100–8.
- Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, et al. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet*. 2013;45:548–55.
- Anley F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghani J, Langbui AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014;505:50–5.
- Tan K, Magill A, Parise M, Arguin P. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84:517–31.
- Gomes M, Vieira J, Couto A, Couto Y, Vieira M, Ferreira F, Machado R. Recurrence of *Plasmodium falciparum* after treatment with quinine and doxycycline in the Amazon basin. *Trop Med Int Health*. 2016;22:133–8.
- Haghdoust AA, Alexander N. Systematic review and meta-analysis of the interaction between *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in humans. *J Vector Borne Dis*. 2007;44:33–43.
- WHO. World Malaria Report 2015. Geneva: WHO; 2015. ISBN 978-92-4-156515-8.
- Saunders DL, Chaorattanakawee S, Gosi P, Lantieri C, Somethy S, Kuntawungin W, et al. Atovaquone-proguanil remains a potential stopgap therapy for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in areas along the Thai-Cambodian border. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:1896–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Short communication

Identification of *Plasmodium falciparum* isolates lacking histidine-rich protein 2 and 3 in Eritrea



Michela Menegon^{a,*}, Mariangela L'Episcopia^b, Abdueslam M. Nurahmed^b, Albadawi A. Talha^c, Bakri Y.M. Nour^d, Carlo Severini^a

^a Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità (ISS), Rome, Italy

^b Cardiff Laboratories, Penwyn Business Centre, Cardiff, UK

^c Faculty of Medical Laboratory Sciences, University of Gestrà, Wad Medani, Sudan

^d Blue Nile Research National Institute for Communicable Diseases University of Gestrà, Wad Medani, Sudan

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Keywords:

Malaria
Plasmodium falciparum
 Antigens
 Histidine-rich protein 2
 Histidine-rich protein 3
 Eritrea

The histidine-rich protein 2 of *Plasmodium falciparum* is the most common malaria antigen targeted by rapid diagnostic tests for the specific diagnosis of *P. falciparum*. Recently, *pfhrp2* gene deletions have been documented in *P. falciparum* isolates from South America and some multiple endemic countries in Africa and Asia. Parasites with such gene deletions can produce false negative diagnostic results using HRP2-based rapid diagnostic kits. In the present work, the prevalence of *P. falciparum* parasites lacking *pfhrp2*, *pfhrp3*, which produces a second *P. falciparum* antigen that is recognized by PHIRP2-based rapid diagnostic tests, and their flanking genes was evaluated in 135 *P. falciparum* isolates from Gash Barka region and in 9 isolates from Debub region, in Eritrea. In the analyzed samples, 56% (81/144) of isolates were *pfhrp2/pfhrp3* positive, while 9.7% (14/144) showed deletion of exon 2 of *pfhrp2* gene and 43% (62/144) of isolates lacked the *pfhrp3* gene. These results suggest that the *pfhrp2* and *pfhrp3* deletion phenomenon is present in a considerable proportion in the study areas, thus making the HRP2/3 based rapid diagnostic tests not completely reliable for malaria diagnosis in Eritrea.

1. Introduction

Malaria is a public health challenge world-wide, with an estimated 3.2 billion people at risk for infection in 95 countries. Notwithstanding there has been a 48% reduction in malaria mortality rates globally since 2000. The World Health Organization (WHO) estimates that 214 million cases occurred in 2015 which led to approximately 438,000 deaths (WHO, 2015).

Despite Eritrea being one of the least developed countries in the world, according to the (World Bank/Eritrea, 2016) this country has made significant progress in public health, including a consistent decline in malaria morbidity and mortality since 1999. Improvement in controlling malaria has been principally achieved by widespread implementation of prevention and control measures, including the use of rapid diagnostic tests (RDTs) (Molli, 2010). Between 2000 and 2012, the overall malaria morbidity and mortality have been reduced by 74% and by 83%, respectively (WHO, 2014). In 2012, the Malaria Indicator and Prevalence Survey showed a low parasite prevalence of 1.4% by RDT and 1.1% by microscopy indicating that the country is striving to achieve pre-elimination of malaria (WHO Country Cooperation Strategy

2014–2016: Eritrea). However, in the last three years, incidence of malaria has risen in four regions (Anseba, Debub, Gash-Barkia, and Semenawi Keih Bahri) of the country.

The immuno-based assay RDT is a diagnostic method that detects malaria antigen in a finger-prick blood sample. The three main groups of antigens detected by RDTs are: Histidine rich protein 2 (PHIRP2), produced by trophozoites and young gametocytes of *P. falciparum* only; Parasite Lactate Dehydrogenase enzyme (pLDH) (*falciparum* specific; *P. vivax* specific or pan specific), and Aldolase pan-specific enzyme (WHO, 2000).

PHIRP-2 is a histidine and alanine-rich protein, characterized by a highly polymorphic repeat domain and represents the most common malaria antigen targeted by RDTs for the specific diagnosis of *P. falciparum* (Howard et al., 1986).

Frequently, a second protein of *P. falciparum*, the PHIRP3 antigen (Wellems and Howard, 1986) is recognized by PHIRP2-based RDTs (Baker et al., 2010; Lee et al., 2006).

In 2010, Gamboa et al. (2010) first documented the deletion of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes in *P. falciparum* field isolates from Peru and, so far, such deletions have been recorded in many other countries (Houze

* Corresponding author at: Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases, Istituto Superiore di Sanità, viale Regina Elena, 299, 00161 Rome, Italy.
 E-mail address: michela.menegon@iss.it (M. Menegon).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.004>

Received 28 March 2017; Received in revised form 4 September 2017; Accepted 5 September 2017

Available online 08 September 2017

1567-1348/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

- Oyler, P., Oyibo, W., Wang, S.Q., McCarthy, J., Cheng, Q., 2010. Global sequence variation in the histidine rich protein 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malar. J.* 9, 126.
- Bachane, A., Russo, M., Dabha, I., Hago, F., Ghimri, M., Udooy, S., 2017. Rapid diagnostic tests failing to detect *Plasmodium falciparum* infections in Eritrea: an investigation of reported false negative RDT results. *Malar. J.* 16, 105.
- Bharti, P.K., Chandel, H.S., Ahnani, A., Kirihata, S., Udhayakumar, V., Singh, N., 2016. Prevalence of *pfrp2* and/or *pfrp3* gene deletion in *Plasmodium falciparum* population in eight highly endemic states in India. *PLoS One* 11 (8), e0157949.
- Cheng, Q., Getten, M.L., Barnwell, J., Ciodolai, P., McCarthy, J., Bell, D., Cunningham, J., 2014. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich proteins 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malar. J.* 13, 283.
- Deme, A.B., Fink, D.J., Bel, A.K., Sarr, O., Badane, A.S., Gueye, P., H., Abouali, A., Ndir, O., Mboop, S., Wirth, D.F., Ndiaye, D., Volkman, S.K., 2014. Analysis of *pfrp2* genetic diversity in Senegal and implications for use of rapid diagnostic tests. *Malar. J.* 13, 34.
- Dorado, E.J., Otsch, S.A., Montenegro, I.M., Diaz, G., Barnwell, J.W., Udhayakumar, V., Mueller, Solano, C., 2016. Genetic characterization of *Plasmodium falciparum* isolates with deletion of the *pfrp2* and/or *pfrp3* genes in Colombia: the Amazon region, a challenge for malaria diagnosis and control. *PLoS One* 11, e0163137.
- Gambou, D., Ho, M.F., Bandeira, J., Torres, K., Ciodolai, P.L., Barnwell, J.W., Incardona, S., Perkins, M., Bell, D., McCarthy, J., Cheng, Q., 2010. A large proportion of *P. falciparum* isolates in the Amazon region of Peru lack *pfrp2* and/or *pfrp3*: implications for malaria rapid diagnostic tests. *PLoS One* 5 (1), e008091.
- Houzé, S., Hubert, V., Le Pessec, G., Le Rest, J., Clain, J., 2011. Combined deletions of *pfrp2* and *pfrp3* genes result in *Plasmodium falciparum* malaria false-negative rapid diagnostic test. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2694–2696.
- Howard, R.J., Im, S., Alfonso, M., Aley, S.B., Leach, J.H., Lew, A.M., Wellens, T.E., Rexco, J., Taylor, D.W., 1998. Secretion of a malarial histidine-rich protein (PFHRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.* 103, 1269–1277.
- Kita, O.A., Dweiba, O.K., Ouattara, A., Tall, I.K., Konaré, A., Diakité, M., Diallo, M., Sissane, I., Méné, G.L., Doumbo, S.N., Doko, A., Touroum, A., Traoré, I., Krogstad, D.J., 2012. False-negative rapid diagnostic tests for malaria and deletion of the histidine-rich repeat region of the *hrp2* gene. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 194–198.
- Koayidi, C.T., Umalla, N., Rallan, S., Mwachango, E.L., Mutsaers, J.P., Habimana, J.P., Karama, C., Krogstad, D.J., 2017. False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of *Plasmodium falciparum* isolates lacking *hrp2* and declining malaria transmission. *Malar. J.* 16, 123.
- Kumar, N., Singh, J.P., Parule, V., Mishra, N., Sevastova, B., Kapoor, R., Valscha, N., Awitkar, A.R., 2012. Genetic variation in histidine rich proteins among Indian *Plasmodium falciparum* populations: possible cause of variable sensitivity of malaria rapid diagnostic tests. *Malar. J.* 11 (290).
- Kumar, N., Parule, V., Bhatt, R.M., Shah, N.K., Mishra, N., Sevastova, B., Valscha, N., Awitkar, A.R., 2013. Java. Gene deletion of HRP2 and HRP3 in Indian *Plasmodium falciparum* population and false negative malaria rapid diagnostic test. *Acta Trop.* 125 (1), 119–121.
- Lee, W., Baker, J., Andrews, K.T., Gatson, M.L., Bell, D., Cheng, Q., McCarthy, J., 2008. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: implications for rapid diagnostic tests. *Amalaris. J. Clin. Microbiol.* 44, 2773–2778.
- Li, P., Xing, H., Zhao, Z., Yang, Z., Cao, Y., Li, W., Yan, G., Sattabongkot, J., Cai, L., Fan, Q., 2015. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine rich protein 2 in the China-Myanmar border area. *Acta Trop.* 152, 26–31.
- Moneque, M., Numbere, A.M., Taha, A.A., Noor, R.V., Severini, C., 2016. Molecular surveillance of antimalarial drug resistance related genes in *Plasmodium falciparum* isolates from Eritrea. *Acta Trop.* 157, 158–161.
- Moff, 2010. Integrated vector management guidelines for the control of malaria and other vector-borne diseases in Eritrea. In: (2010–2014) National Malaria Control Programme. Ministry of Health, The State of Eritrea.
- Marillo Solano, C., Astivi Otsch, S., Abdallah, J.F., Pava, Z., Dorado, E., Incardona, S., Huber, C.S., Mucedo de Oliveira, A., Bell, D., Udhayakumar, V., Barnwell, J.W., 2015. Deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (*pfrp2*) and histidine-rich protein 3 (*pfrp3*) genes in Colombian parasites. *PLoS One* 10 (7), e0131576. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0131576>.
- Parr, J.B., Verity, R., Doctor, S.M., Jinkov, M., Carey-Ewend, K., Turman, B.J., Keeler, C., Slater, H.C., Whittell, A.N., Mwanjigallura, K., Ghani, A.C., Likwela, J.L., Tsheta, A.K., Emch, M., Juliano, J.J., Mshnick, S.R., 2016. Pfrp2-Deletions in *Plasmodium falciparum* parasites in the Democratic Republic of the Congo: a national cross-sectional survey. *J. Infect. Dis.* pii:6328. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiv659>.
- Ramuttoo, T., Hendriksen, L.C., Mwangi-Amunyire, J., Mwangi, G., Oluoch, K., Thebe, A.K., Onyamboka, M.A., Karera, C., Muliyil, G., Gomes, E., Gesse, S., Heyburn, H., Siamat, K., Choudhary, K., Premaratne, K., Fanello, C.J., van Seiden, L., Day, N.P., Whitt, N.J., Donnelly, A.M., Inwang, M., Woodrow, C.J., 2012. Sequence variation does not confound the measurement of plasma PfPR2-10 concentration in African children presenting with severe malaria. *Malar. J.* 11, 278.
- Veron, V., Siman, S., Carne, B., 2009. Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood smears. *Exp. Parasitol.* 121, 246–251.
- Wellens, T.E., Howard, R.J., 1998. Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8085–8090.
- WHO, 2000. WHO/MAL/2000.1091. New Perspectives in Malaria Diagnosis. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/cepr/publications/accurate-malaria-diagnosis.pdf>.
- WHO, World Malaria Report, 2014. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2014/en/>.
- WHO, 2015. World Malaria Report. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>.
- WHO Country Cooperation Strategy, 2014–2016. Eritrea. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/148559/1/9789290232759.pdf>.
- WHO guidelines for malaria control programs. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/208810>.
- Wooden, J., Kyes, S., Sibley, C.H., 1993. PCR and strain identifiers in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today* 9, 300–305.
- Worldbank. <http://www.worldbank.org/en/country/eritrea/overview>. **Q&A Updated: Dec 07, 2016** 2016.
- Wirth, N., Fell, B., Bui, K., Pascual, A., Fall, M., Camara, C., Diatta, B., Fell, E.B., Mbaye, F.S., Diémé, Y., Kerekou, R., Wade, B., Brelvi, S., Prizbans, B., 2013. *pfrp2* and *pfrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. *Malar. J.* 12 (34).



Photo-Induced Electron Transfer Real-Time PCR for Detection of *Plasmodium falciparum plasmepsin 2* Gene Copy Number

Samaly Santos Souza,^a Mariangela L'Episcopia,^b Carlo Severini,^b Venkatchalam Udhayakumar,^a Naomi W. Lucchi^a

^aCenters for Disease Control and Prevention, Center for Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria, Atlanta, Georgia, USA

^bIstituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

ABSTRACT Piperazine is an important partner drug used in artemisinin-based combination therapies (ACTs). An increase in the *plasmepsin 2* and 3 gene copy numbers has been associated with decreased susceptibility of *Plasmodium falciparum* to piperazine in Cambodia. Here, we developed a photo-induced electron transfer real-time PCR (PET-PCR) assay to quantify the copy number of the *P. falciparum plasmepsin 2* gene (*PIPM2*) that can be used in countries where *P. falciparum* is endemic to enhance molecular surveillance.

KEYWORDS PET-PCR, piperazine, copy number, malaria

Malaria is one of the most common and serious tropical diseases in the world, with roughly 216 million cases and an estimated 445,000 malaria deaths globally (1). Malaria is caused by intracellular parasitic protozoa of the genus *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* is the most virulent among the human malarial parasites and causes disease with high morbidity and mortality (1, 2). The first-line therapy recommended by the World Health Organization for uncomplicated malaria caused by *P. falciparum* is artemisinin-based combination therapy (ACT) (4, 5), which consists of an artemisinin derivative combined with a partner drug of another class of antimalarial. However, resistance to artemisinin and partner drugs has been reported in Southeast Asia and confirmed by therapeutic efficacy studies (6–10). Dihydroartemisinin and piperazine combination therapy is considered one of the remaining effective therapies against *P. falciparum* malaria; however, with the recent emergence of resistance to piperazine, along with artemisinin in Southeast Asia, molecular surveillance to detect piperazine-resistant parasites is now of utmost importance (7, 11–14). Recently, an increase in the copy number of the *plasmepsin 2–3* gene cluster in *P. falciparum* (*PIPM2–3*) was demonstrated to be associated with piperazine resistance in Cambodia (11, 15, 16). This gene amplification was determined using genome-wide analysis of copy number variation and a singleplex TaqMan probe-based real-time-PCR (16). This real-time PCR method requires two separate singleplex PCRs (to amplify the single-copy housekeeping *P. falciparum* β -tubulin gene and the *PIPM2* gene of interest) and the use of a TaqMan probe or DNA intercalating dye. We previously demonstrated that the self-quenching photo-induced electron transfer (PET) fluorogenic primers used in the PET-PCR assay provide a more convenient to use and less expensive real-time PCR assay than conventional probe-based real-time PCR formats, as no internal probes (e.g., TaqMan probes) or intercalating dyes are required (17, 18). We designed and evaluated a multiplex PET-PCR assay (results obtained using a single PCR) to determine the number of copies of *PIPM2* gene in *P. falciparum*. This novel assay was compared with the previously published singleplex TaqMan probe-based real-time PCR assay (16).

The *PIPM2* and *P. falciparum* β -tubulin gene primers used in this study were previously reported by Witkowski and collaborators (16). In our multiplex PET-PCR

Received 26 February 2018. Returned for modification 5 April 2018. Accepted 30 May 2018.

Accepted manuscript posted online 4 June 2018.

Citation Souza SS, L'Episcopia M, Severini C, Udhayakumar V, Lucchi NW. 2018. Photo-induced electron transfer real-time PCR for detection of *Plasmodium falciparum plasmepsin 2* gene copy number. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00317-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00317-18>.

Copyright © 2018 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Samaly Santos Souza, ynp4@cdc.gov, or Naomi W. Lucchi, fdp@cdc.gov.

TABLE 1 Oligonucleotide primer sequences used in the PET-PCR *PPM2* copy number assay^a

PET-PCR primer	PET-PCR sequence (5' to 3')	T _m (°C)	Product size (bp)	Melting temp range (°C)
PPM2_F	TGGTGTGCAGAAAGTTGGAG	59.8	79	76.8–77.2
PPM2_R_FAM	aggcgatagcctctgg TGGGACCCATAAAATTAGCAGA	59.4		
Pf β -tubulin_F	TGATGTGCGCAAGTATGCC	61.9	87	79.0–79.2
Pf β -tubulin_R_HEX	aggcgatagcctctgg TCCCTTGTGGACATTCTCCTC	60.5		

^aThe PET-tag (lowercase letters in bold) attached to the 5' end of the target-specific sequences does not show any homology to *Plasmodium* species. The *PPM2* (gene accession no. PF3D7_1408000-811659) and β -tubulin gene (gene accession no. PF3D7_1008700) primers were previously reported in the singleplex probe-based real-time PCR assay (16).

assay, the reverse primers of both *PPM2* and the *P. falciparum* β -tubulin gene were modified with the PET tag and labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM; *PPM2*) and HEX (*P. falciparum* β -tubulin gene) fluorophores, as previously described by Lucchi et al. (17) (Table 1). The PET-PCR was carried out in a 20- μ l volume containing 2 \times TaqMan Environmental master mix 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.5 μ M each forward and reverse primer for *PPM2*, 0.25 μ M for the *P. falciparum* β -tubulin gene primers, and 3 μ l of template DNA. The amplifications were performed under the following conditions: 95°C for 15 min, 45 cycles of 95°C for 15 s, 58°C for 1 min, and 72°C for 20 s. All samples were tested in triplicate, and the assays were performed using Agilent Mx3005pro thermocyclers (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Evaluation of PET-PCR amplification efficiency and reproducibility was performed using a 10-fold dilution of a *P. falciparum* control strain (3D7), with parasite densities of 2,000 parasites/ μ l to 2 parasites/ μ l. The amplification efficiencies of the *PPM2* and the *P. falciparum* β -tubulin gene PET-primers were 97% and 100%, respectively (Fig. 1A and B). The *PPM2* copy number was determined by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method ($\Delta C_T = C_T$ *PPM2* – C_T *P. falciparum* β -tubulin gene; C_T , threshold cycle) using the 3D7 *P. falciparum* strain, known to have a single copy of the *PPM2* gene, as a calibrator and two additional controls (control 2 [Ctrl-2] and Ctrl-3 obtained from Cambodia with one copy and three copies, respectively). To validate the accuracy of the PET-PCR for copy number variation determination, six additional clinical samples, all obtained from Cambodia, with known *PPM2* copy numbers were tested in a blinded fashion using both the novel PET-PCR and the previously reported singleplex TaqMan probe-based assay. These specimens were kindly provided by R. M. Fairhurst's (samples MB-PPQ-001 to MB-PPQ-004) and D. Fidock's (samples MB-PPQ-005 and MB-PPQ-006) laboratories and were previously evaluated for *PPM2* copy numbers using probe-based real-time PCR assays and/or whole-genome sequencing. The PET-PCR multiplex *PPM2* copy number results had 100% agreement with the previously published results of the singleplex TaqMan probe-based assay (16) (Table 2).

Simple molecular tools are valuable for conducting molecular surveillance of drug

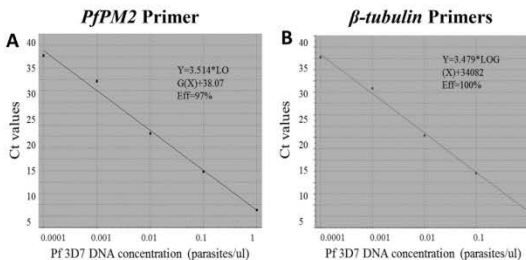


FIG 1 Amplification efficiencies of the novel PET-PCR primers. The amplification efficiency (Eff) of the *PPM2* primers were 97% (A), and that of the *P. falciparum* β -tubulin gene primers was 100% (B).

TABLE 2 Comparison between PET-PCR and TaqMan probe-based real-time PCR assay^a

Sample ID ^b	Observed no. of <i>PFPM2</i> copies	
	PET-PCR	TaqMan-based real-time PCR
Ctrl-1 (strain 3D7)	1	1
Ctrl-2	1	1
Ctrl-3	3	3
MB-PPQ-001	1	1
MB-PPQ-002	1	1
MB-PPQ-003	1	1
MB-PPQ-004	3	3
MB-PPQ-005	2	2
MB-PPQ-006	3	3

^aThe PET-PCR multiplex *PFPM2* copy number results had 100% agreement with previously published singleplex real-time PCR assay results (16). Ctrl, control samples; MB-PPQ-001 to -006, clinical samples that were kindly provided by R. M. Fairhurst and D. Fidock.

^bID, identification number.

resistance markers. The PET-PCR is a molecular diagnostic assay with performance characteristics that are similar to those of commonly used real-time PCR methods, but the PET-PCR is less expensive, easy to use, and can be used for large-scale surveillance studies, even in developing country settings (17). The novel multiplex PET-PCR assay for *PFPM2* copy number determination has performance characteristics similar to those of a singleplex TaqMan probe-based assay but without the need for running two independent PCRs. The novel assay provides a useful cost-effective alternative for the evaluation of the *PFPM2* copy number. As monitoring for piperazine resistance is gaining momentum and urgency, it is hoped that this new method will help enhance molecular surveillance in a timely manner even in reference laboratories in countries endemic for the disease. In addition, the PET-PCR format described here provides an alternative real-time PCR format that can be utilized for the determination of any gene amplification of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Malaria Branch, CDC, for supporting this project, and David Fidock, Leila Ross, Rick M. Fairhurst, and Didier Menard for proving the clinical samples and controls used in this study. Also, we give a special thank you to Ira Goldman for reviewing the article.

We acknowledge funding support for this study from the CDC Antimicrobial Resistance Working Group.

The use of trade names and names of commercial sources is for identification only and does not imply endorsement by the Centers for Disease Control and Prevention or the U.S. Department of Health and Human Services. The findings and conclusions in this presentation are those of the authors and do not necessarily represent those of the Centers for Disease Control and Prevention.

REFERENCES

- WHO. 2016. World malaria report. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Bousema T, Drakeley C. 2011. Epidemiology and infectivity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocytes in relation to malaria control and elimination. *Clin Microbiol Rev* 24:377–410. <https://doi.org/10.1128/CMR.00051-10>.
- Reference deleted.
- Ashley EA, White NJ. 2005. Artemisinin-based combinations. *Curr Opin Infect Dis* 18:531–536. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000186848.46417.5c>.
- World Health Organization. 2006. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Dondorp AM, Fairhurst RM, Slutsker L, Macarthur RR, Breman JG, Guerin PJ, Wellens TE, Ringwald P, Newman RD, Plowe CV. 2011. The threat of artemisinin-resistant malaria. *N Engl J Med* 365:1075–1075. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1108322>.
- Fairhurst BM. 2015. Understanding artemisinin-resistant malaria: what a difference a year makes. *Curr Opin Infect Dis* 28:417–425. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000199>.
- Packard RW. 2014. The origins of antimalarial drug resistance. *N Engl J Med* 371:397–399. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1403340>.
- Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zarewiski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR. 2003. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2418–2423. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2418-2423.2003>.
- Price RN, Cassar C, Brockman A, Duraisingh M, van Vuot M, White NJ, Nosten F, Krishna S. 1998. The *pfmdr1* gene is associated with a

- multidrug-resistant phenotype in *Plasmodium falciparum* from the western border of Thailand. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2943–2949.
11. Amato R, Lim P, Miotto O, Amaratunga C, Dek D, Pearson RD, Almagro-Garcia J, Neal AT, Sreng S, Suon S, Druy E, Jyothi D, Stalker J, Kwiakowski DP, Fairhurst RM. 2017. Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis* 17:164–173. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30409-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30409-1).
 12. Arley F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chhor CM, Bout DM, Menard S, Rogers WO, Gerlton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Pujalon O, Menard D. 2014. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505:50–55. <https://doi.org/10.1038/nature12876>.
 13. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chhor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthom C, Rincharoen R, Hien TT, Thuay Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htu Y, Han KT, Aye KH, Mosokee OJ, Claessens RB, Folarinmi OO, Mawya M, Khirathavong B, Hongjanthong B, Newton PM, Onyamboko MA, Fanello C, Tshetu AK, Alidra N, Valocha N, Phyoo AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Bormann S, Daswahel M, Peshu N, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, et al. 2014. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 371:411–423. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1314981>.
 14. Parobek CW, Parr JB, Brazeau NF, Lon C, Chaorattanakawee S, Gosi P, Barnett EJ, Norris LD, Mieshnick SR, Spring MD, Lantieri CA, Bailey JA, Saunders DL, Lin JJ, Juliano JJ. 2017. Partner-drug resistance and population substructuring of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Genome Biol Evol* 9:1673–1686. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx126>.
 15. Dondorp AM. 2017. New genetic marker for piperazine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Lancet Infect Dis* 17:119–121. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30414-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30414-5).
 16. Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N, Eam P, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domingue A, Ma L, Bouchier C, Leano R, Huy R, Ruel G, Barale JC, LeGrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Pujalon O, Arley F, Menard D. 2017. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a genotype-phenotype association study. *Lancet Infect Dis* 17:174–183. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30415-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30415-7).
 17. Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, Hill V, Udhayakumar V. 2013. Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PEI-PCR. *PLoS One* 8:e56677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056677>.
 18. Talunzije E, Ndiaye YD, Deme AB, Olsen C, Patel DS, Bilya S, Daniels R, Vannberg FG, Volkmann SK, Udhayakumar V, Ndiaye D. 2017. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* *kelch13* mutations in Senegal determined by using targeted amplicon deep sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02116–16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02116-16>.



Dihydroartemisinin–piperazine treatment failure in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria case imported from Ethiopia

Gianluca Russo¹ · Mariangela L'Episcopia² · Michela Menegon² · Samaly Santos Souza³ · Bruna Ghyslaina Djeunang Dongho¹ · Vincenzo Vullo¹ · Naomi W. Lucchi³ · Carlo Severini²

Received: 30 April 2018 / Accepted: 4 July 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Dihydroartemisinin–piperazine (DHA–PPQ) is the artemisinin combination therapy that was recently introduced for the treatment of *Plasmodium falciparum* uncomplicated malaria, but emerging resistance in South-East Asia is threatening its use. This report describes a case of DHA–PPQ treatment failure in uncomplicated malaria occurring in an immigrant living in Italy, after a travel to Ethiopia. Thirty days after malaria recovery following DHA–PPQ therapy, the patient had malaria recrudescence. According to the genotyping analysis, the same *P. falciparum* was responsible for both episodes. Thus, it seems important to consider possible malaria recrudescence occurring after DHA–PPQ therapy in patients from African countries

Keywords Dihydroartemisinin · Piperazine · Malaria recrudescence · Failure · Ethiopia

Background

Dihydroartemisinin–piperazine (DHA–PPQ) is one of the five artemisinin combination therapy (ACTs) regimens recommended by World Health Organization (WHO) for uncomplicated malaria [1]. For decades, the South-East Asian region (mainly the Thailand–Cambodian border) has been the epicentre for the emergence of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance, including that related to DHA–PPQ which was recognized in Cambodia and rapidly spread throughout the country (25% in 2010, 46% in 2014) [2].

According to studies performed between 2002 and 2010 (mainly in African countries) comparing clinical efficacy of DHA–PPQ with artemether–lumefantrine (AL), DHA–PPQ

showed a lower treatment failure rate and a longer prophylactic effect on new infections [3] possibly because the half-life of PPQ (2–3 weeks) is longer than that of lumefantrine (LUM) (4.5 days). Furthermore, recent studies conducted in Burkina Faso [4], Kenya [5], Sudan [6] and Angola [7] confirmed the high efficacy of DHA–PPQ regimen, and showed very rare cases of recrudescence within 28 days. Currently, although some evidence of slow parasite clearance in patients treated with AL for uncomplicated malaria has been reported [6, 8], there is no confirmation of artemisinin resistance spread in Africa [9]. The present study describes a potential DHA–PPQ treatment failure in an Ethiopian immigrant living in Italy who developed uncomplicated malaria after visiting relatives and friends in her country of origin.

Case report

Clinical description

A 39-year-old Ethiopian woman (living in Italy) was admitted at the Infectious Disease Unit of Policlinico Umberto I in Rome (Italy) on 29th September 2016 because of a 4-day history of fever (up to 39 °C), headache, arthromyalgia, malaise, nausea, and diarrhoea. Symptoms appeared 10 days after returning from a trip to Ethiopia

✉ Gianluca Russo
gianluca.russo@uniroma1.it

¹ Department of Public Health and Infectious Diseases, Sapienza University of Rome, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy

² Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena Rome 299, 00161 Rome, Italy

³ Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Malaria Branch, 1600 Clifton Rd, Atlanta, GA 30333, USA

(Adama city, Centre region) during which no malaria prophylaxis was taken. Physical examination at admission was normal and the patient's weight was 56.5 kg. Blood tests showed normal white blood cell (WBC) count (3840/ μ L), slight anaemia (haemoglobin 11.9 g/dL), thrombocytopenia (48,000/ μ L), increased aspartate aminotransferase (AST 183 IU/L), alanine aminotransferase (ALT 125 IU/L), lactate dehydrogenase (LDH 595 IU/L) and C-reactive protein (CRP 99,000 μ g/L). Microscopic urine exam showed micro-hematuria (131/ μ L); creatinine was normal. Markers for hepatitis A, B, and C were negative. Peripheral blood films showed asexual forms of *P. falciparum* on microscopic exam with an estimated parasitaemia of 3%. Moreover, a routine X-ray showed a small pulmonary infiltrate. The patient was treated with DHA-PPQ 320–40 mg, three tablets/day for three consecutive days, plus levofloxacin (750 mg/day/7 days). Symptoms disappeared after the second dose of DHA-PPQ, and the parasitaemia dropped to <1%. On the 4th day, the patient was discharged. A follow-up blood microscopic exam and chest X-ray were planned, however, the patient did not return for follow-up. Thirty days after treatment, a recurrence of symptoms (fever, malaise, nausea and vomit) was reported and, 2 days later the patient was readmitted to our hospital. No additional travel abroad or contact with persons with recent journey to malaria-endemic countries was reported. Physical examination was normal. The blood tests showed normal WBCs count (4900/ μ L), anaemia (haemoglobin 10 g/dL), thrombocytopenia (106,000/ μ L), increased LDH (453 IU/L) and CRP (70,000 μ g/L); liver enzymes, creatinine, and microscopic urine exam were normal. Chest X-ray and abdomen ultrasound examination were normal. Microscopic diagnosis showed asexual forms of *P. falciparum* (parasitaemia of 1%). Treatment with i.v. quinine hydrochloride (QN) was started given that the patient was unable to take any medication orally. Two days after, the drug was shifted to 1-day oral mefloquine (MFQ) (total dose: 1500 mg). After 1 day, symptoms disappeared and the parasitaemia dropped to <0.1%. After two negative blood microscopic exams, performed 24 and 48 h after stopping antimalarial therapy, the patient was discharged. At 1- and 2-month follow-up visit, all blood tests were normal, and blood microscopic exams remained negative.

Molecular analysis

Total genomic DNA was extracted using PureLink Genomic DNA Kits-Invitrogen, from 200 μ L of whole blood samples collected from the patient at both hospital admissions (pre-treatment and 30 days post-treatment). To determine if the two malaria infections were caused by the same parasite isolates (recrudescence), genotyping of the pre-treatment and 30 days post-treatment *P. falciparum* isolate(s) was performed by amplification of three polymorphic markers, allowing the detection of multiclonal *P. falciparum* infections: the merozoite surface protein 1 (*Pfmsp1*) and merozoite surface protein 2 (*Pfmsp2*), as previously described [10], and glutamate-rich protein (*Pfglurp*) genes as described by Viriyakosol et al. [11]. In addition, seven neutral microsatellite markers were also analysed. Genetic characterization confirmed the presence of the same parasite isolates in both the pre-treatment and 30 days post-treatment samples implying that the second infection was a recrudescence (Table 1).

Sanger sequencing of known genetic point mutations associated with various antimalarial drug resistance (artemisinin: *P. falciparum* Kelch 13 gene, *PfK13*; chloroquine: *P. falciparum* chloroquine resistance transporter gene, *Pfcr1*; amodiaquine: *P. falciparum* multidrug resistance 1 gene, *Pfmdr1*; sulphadoxine-pyrimethamine: *P. falciparum* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase genes, *Pfahps* and *Pfahfr*, respectively; and atovaquone: *P. falciparum* cytochrome B, *PfCytB*) was performed as previously described [12]. In addition, the copy number of *P. falciparum* *plasmepsin 2* (*PfPM2*) gene, a known marker of piperaquine resistance was investigated using a PET-PCR based assay as described by Souza et al. [13]. The two sequential *P. falciparum* isolates had a single copy of *PfPM2* gene. No mutations associated with artemisinin resistance (*PfK13* gene) and atovaquone resistance (*PfCytB*) were detected; however, previously described mutations in the *Pfcr1*, *Pfahps*, *Pfmdr1* and *Pfahfr* genes were observed (Table 2).

Discussion

Resistance to artemisinin and its partner drugs is a serious threat to malaria control programs [8, 14]. Reliable molecular markers for artemisinin resistance (mutations

Table 1 Neutral microsatellites analysis for the *P. falciparum* isolates from patient samples (first and second malaria episodes)

Microsatellite markers	TA1	PolyA	PFPK2	TA109	2490	C2M34	C3069
September 29, 2016 sample	169	146	183	175	85	236	124
November 3, 2016 sample	169	146	183	175	85	236	124

Each number represents the size of the microsatellite repeat for each of the 7 markers

Table 2 Analysis of the molecular markers of *P. falciparum* associated with drug resistance

Marker	<i>Pfcr1</i> ^(a)				<i>Pfmdr1</i> ^(a)				<i>PfK13</i> ^(b)	<i>Pfdhfr</i> ^(c)		<i>Pfdhps</i> ^(c)					<i>PfCytB</i> ^(d)			
codons	74	75	76	97	86	184	1034	1042	1246	580	51	59	168	436	437	540	581	613	268	
Wild type	M	N	K	H	N	Y	S	N	D	C	N	C	S	S	A	K	A	A	Y	
	atg	aat	aaa	cac	aat	tat	agt	aat	gat	tgt	aat	tgt	age	tet	gct	aaa	gag	gcc	tat	
Mutant type	I	E	I	Y	Y	F	C	D	Y	Y	I	R	N	A/F	G	E	G	S/T	S	
	att	gaa	aca	tac	tat	ttt	tgt	gat	tat	tat	att	egt	aac	gct/ttt	ggt	gaa	ggg	tcc/acc	tct	
Present work	Sample September 29, 2016	I	E	I	H	N	F	S	N	D	C	N	R	N	S	A	E	A	A	Y
		att	gaa	aca	cac	aat	ttt	agt	aat	gat	tgt	aat	egt	aac	tet	gct	gaa	gag	gcc	tat
Sample November 3, 2016	I	E	I	H	N	F	S	N	D	C	N	R	N	S	A	E	A	A	Y	
		att	gaa	aca	cac	aat	ttt	agt	aat	gat	tgt	aat	egt	aac	tet	gct	gaa	gag	gcc	tat
Gabbi, 2016 [12]	Sample November 27, 2014	I	E	I	H	N	Y	S	N	Y	C	N	R	N	S	G	E	A	A	Y
		att	gaa	aca	cac	aat	tat	agt	aat	tat	tgt	aat	egt	aac	tet	ggt	gaa	gag	gcc	tat
Sample January 7, 2015	I	E	I	H	N	Y	S	N	Y	C	N	R	N	S	G	E	A	A	Y	
		att	gaa	aca	cac	aat	tat	agt	aat	tat	tgt	aat	egt	aac	tet	ggt	gaa	gag	gcc	tat

^aMutations in *Pfcr1* and *Pfmdr1* gene are associated to some quinoline-based antimalarial resistance (e.g., chloroquine)

^b*PfK13* is the molecular markers for artemisinin resistance

^cMutations in *Pfdhfr/Pfdhps* genes are responsible for *P. falciparum* resistance to antifolate-cycloguanil

^dPolymorphisms in *PfCytB* gene were associated to atovaquone resistance

in the propeller domain of *PfK13* gene) and piperaquine resistance (multiplication of the plasmepsin 2–3 gene) have been observed in *P. falciparum* circulating in South-East Asia [15, 16]. Although some mutations in the *PfK13* gene and slow clearing parasites in patients treated with AL for uncomplicated malaria have been reported in several African countries [6, 8, 17], there is no confirmation of artemisinin resistance in Africa [9]. Resistance to PPQ has also not been confirmed in any African parasites. In this study, we report on *P. falciparum* recrudescence, 30 days post-treatment with DHA–PPQ, of a traveller returning from Ethiopia after visiting friends or relatives (VFR). No known mutations in the *PfK13* gene were observed nor did we observe an increase in the *P. falciparum* plasmepsin-2 gene, associated with PPQ resistance, implying that resistant parasites harbouring these known polymorphisms were not responsible for the recrudescence. There may be other explanations for this DHA–PPQ treatment failure such as sub-therapeutic drug exposure due to lack of efficient drug absorption by the patient or suboptimal DHA–PPQ formulation, or other unknown parasites or host genetic factors. Malabsorption due to the underlined medical reason was ruled out according to the anamnestic and clinical presentation of the patient. Moreover, DHA–PPQ was administered directly by the health personnel who ensured that the fasting condition necessary for the intake of the drug was properly carried out. Pharmacokinetic data was not collected for this patient and therefore the drug-related factors cannot be ruled out. However, the DHA–PPQ formulation used to treat

the patient, Eurartesim[®], is a drug regularly distributed in Italy, and currently, AIFA (the Italian competent authority for drugs) has not reported any concerns about the drug's quality. Furthermore, considering that levofoxacin is primarily excreted unchanged in the urine and its metabolism is minimal, the concurrent administration with DHA–PPQ will not result in an under-exposure of the antimalarial drug. To date, there is no evidence of different pharmacogenetic/pharmacokinetic profiles of DHA–PPQ in different ethnic populations [18], although individual absorption rates would differ.

Interestingly, a similar case of DHA–PPQ treatment failure was reported in Verona, Italy, in 2014 [12], in which an Italian woman also returning from a travel to Ethiopia (Omo River Valley, Southwest region) had a malaria recrudescence 35 days post DHA–PPQ therapy. In this case, pharmacokinetic data excluded under-exposure to DHA–PPQ as the cause of treatment failure, whereas genetic analysis of these *P. falciparum* isolates showed mutations in the *Pfmdr1*, *Pfcr1*, *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes [12] (Table 1). Our analysis of these genes in the *P. falciparum* isolates from our patient revealed similar point mutations (Table 1). This is consistent with what is commonly observed in Africa where previously used antimalarials such as chloroquine, sulphadoxine–pyrimethamine, and amodiaquine led to selection of these known polymorphisms, which are now common in circulation. *Pfmdr1* mutations and/or amplification has been proposed to confer resistance to artemisinin partner drugs such as mefloquine (MFQ) and lumefantrine (LUM)

[14]. In addition, *Pfmdr1* 86N/184F mutations together with *Pfprt* CVIET (codons 72–76) and *Pfprt*101F haplotype are associated with a slight decrease in PPQ susceptibility in field isolates [14, 19].

The main limitation of this study is the lack of pharmacokinetic data related to DHA–PPQ. Notwithstanding that we cannot rule out the possibility of pharmacological factors in this case report, this study, together with the previously published case report of recrudescence post DHA–PPQ treatment [12] raises the possibility of a potential DHA–PPQ failure in an Ethiopian isolate. We cannot rule out the possibility that other unknown factors, e.g., mutations in other known or unknown genes are involved. Multicopy occurrence of the *PfPM2* was shown to be a molecular marker associated with PPQ resistance in Cambodia [16]; however, the Ethiopian *P. falciparum* isolates in our study had only one copy of the *PfPM2*.

Our study highlights the need to consider possible malaria recrudescence after DHA–PPQ therapy for patients coming from African countries like Ethiopia, for which a longer clinical follow-up seems necessary. It is important to determine the cause of these recrudescences associated with DHA–PPQ treatment in travellers returning from Ethiopia. To this end, it is worthwhile for clinicians presented with similar cases to preserve such parasite isolates to further investigate if the failure is associated with reduction in *in vitro* drug sensitivity. This will further help to investigate parasite genetic factors if there is any *in vitro* evidence to suggest potential resistance to one of the drugs.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- World Health Organization (WHO). Geneva, Switzerland. Guidelines for the treatment of malaria. 3rd edn. 2015. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1. Accessed 1 Mar 2018.
- Duru V, Witkowski B, Ménard D. *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine: a major challenge for malaria eradication in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95:1228–38.
- Zani B, Gathu M, Donegan S, Oliaro PL, Sinclair D. Dihydroartemisinin–piperazine for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;1:CD010927. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010927>.
- Zongo J, Somé FA, Somba SA, Parikh S, Rouamba N, Rosenthal PJ, et al. Efficacy and day 7 plasma piperazine concentrations in African children treated for uncomplicated malaria with dihydroartemisinin–piperazine. *PLoS One*. 2014;9:e103200.
- Agarwal A, McMorrow M, Onyango P, Otieno K, Odero C, Williamson J, et al. A randomized trial of artemether–lumefantrine and dihydroartemisinin–piperazine in the treatment of uncomplicated malaria among children in western Kenya. *Malar J*. 2013;12:254.
- Mohamed AO, Abdel Hamid MM, Mohamed OS, Elkando NS, Suliman A, Adom MA. Efficacies of DHA–PPQ and AS/SP in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in an area of an unstable seasonal transmission in Sudan. *Malar J*. 2017;16:163. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1817-9>.
- Plucinski MM, Talundzic E, Morton L, Dimbu PR, Macaisa AP, Fortes F, et al. Efficacy of artemether–lumefantrine and dihydroartemisinin–piperazine for treatment of uncomplicated malaria in children in Zaire and Uige provinces, Angola. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:437–43.
- Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amarantunga C, Lim P, Suen S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2014;371:411–23.
- Haldar K, Bhattacharjee S, Sifeukui I. Drug resistance in *Plasmodium*. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:156–70. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.161>.
- Soulama I, Nèbe I, Ouedraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, et al. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J*. 2009;8:135.
- Vinyakosol S, Siripoon N, Petcharaprat C, Petcharaprat P, Jarra W, Thaithong S, et al. Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull World Health Organ*. 1995;73:85–95.
- Gobbi F, Buonfrate D, Mengoni M, Lunardi G, Angheben A, Severini C, et al. Failure of dihydroartemisinin–piperazine treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in a traveller coming from Ethiopia. *Malar J*. 2016;15:525.
- Santos Souza S, L’Episcopia M, Menegon M, Russo G, Saracino A, Lo Caputo S, et al. Detection of piperazine resistant marker plasmipain 2 gene amplification using PEIT-PCR real time assay. 66th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, 2017;11B-5226 (Abstract).
- Veigs M, Dhingra SK, Henrich PP, Stramer J, Gnidig N, Uhlemann AC, et al. Globally prevalent PFMDR1 mutations modulate *Plasmodium falciparum* susceptibility to artemisinin-based combination therapies. *Nat Commun*. 2016;7:11553. <https://doi.org/10.1038/ncomms11553>.
- Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shañul-Alam M, Anodu O, et al. A worldwide map of *Plasmodium falciparum* K13-propeller polymorphisms. *N Engl J Med*. 2016;374:2453–64.
- Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis*. 2017;17:174–83. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30415-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30415-7).
- Lu F, Culletter R, Zhang M, Ramaprasad A, von Seidlein L, Zhou H, et al. Emergence of indigenous artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *N Engl J Med*. 2017;376:991–3. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1612765>.
- Sugiarto SR, Davis TME, Salman S. Pharmacokinetic considerations for use of artemisinin-based combination therapies against *falciparum* malaria in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2017;13:1115–33. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017>.
- Dhingra SK, Radhi D, Combrinck JM, Yeo T, Okombo J, Henrich PP, et al. A variant PKCRT isozyme can contribute to *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line partner drug piperazine. *mBio*. 2017. <https://doi.org/10.1128/mBio.0303-17>.

Molecular Surveillance of *Plasmodium falciparum* Drug Resistance Markers in Clinical Samples from Botswana

Leabaneng Tawe,^{1,2,3} Michela Menegon,⁴ Pleasure Ramatlho,⁵ Charles W. Muthoga,² Naledi Mutukwa,⁶ Moses Vurayai,⁷ Wame Bothudile,¹ Thato Motshoge,⁸ Mariangela L'Episcopia,⁹ Tjantilli Mosweunyane,⁸ Ishmael Kasvosve,¹ Carlo Severini,¹ and Giacomo M. Paganotti^{2,9,10*}

¹Department of Medical Laboratory Sciences, University of Botswana, Gaborone, Botswana; ²Botswana-University of Pennsylvania Partnership, Gaborone, Botswana; ³Sub-Saharan African Network for TB/HIV Research Excellence (SANthe) at Botswana-Harvard Partnership, Gaborone, Botswana; ⁴Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; ⁵Department of Biological Sciences, University of Botswana, Gaborone, Botswana; ⁶Department of Pathology, University of Botswana, Gaborone, Botswana; ⁷National Health Laboratory, Department of Microbiology, Gaborone, Botswana; ⁸Ministry of Health and Wellness, National Malaria Programme, Gaborone, Botswana; ⁹Pereira School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania; ¹⁰Department of Biomedical Sciences, University of Botswana, Gaborone, Botswana

Abstract. Drug-resistant *Plasmodium falciparum* is a major threat to global malaria control and elimination efforts. In Botswana, a southern African country approaching malaria elimination, *P. falciparum* molecular data are not available. Parasites were assessed through polymerase chain reaction (PCR) for confirmation of positive rapid diagnostic tests, multiplicity of infection (MOI), and drug resistance markers among isolates from clinical uncomplicated malaria cases collected at health facilities. Of 211 dried blood spot samples selected for the study, 186 (88.2%) were PCR positive for *P. falciparum*. The mean MOI based on *MSP1* genotyping was 2.3 and was not associated with age. A high prevalence of wild-type parasites for *pfprt* and *pfmdr1* was found, with a haplotype frequency (K76/N86) of 88.8% and 17.7% of the isolates having two copies of the *pfmdr1* gene. For *pATPase6*, all the parasites carried the wild-type S769 allele. Sequencing showed no evidence of non-synonymous mutations associated with reduced artemisinin derivative sensitivity in the *P. falciparum* *k13* gene. In conclusion, we found that *P. falciparum* parasites in Botswana were mostly wild type for the drug resistance markers evaluated. Yet, there was a high rate of a molecular marker associated to reduced sensitivity to lumefantrine. Our results indicate the need for systematic drug efficacy surveillance to complement malaria elimination efforts.

INTRODUCTION

Malaria is a major public health problem in sub-Saharan Africa, although there is evidence of declining morbidity and mortality. In Botswana, where a considerable decline in the parasite prevalence has occurred over the last 50 years,¹ there is impetus for not only reducing the burden of malaria across the country, but also optimizing efforts toward elimination. This drive has emphasized the need for molecular data on current parasite population and the risk assessments of human populations in areas that are prone to endemic or epidemic *Plasmodium falciparum* circulation.

Botswana is a semi-arid to arid country with few permanent bodies of water and two seasons, summer and winter, with rainfall in the summer season occurring between October and April. The mean annual temperatures are between 18 and 23°C; however, in summer and winter, temperatures can be above 35°C or below 0°C, respectively. The population is sparse, with current figures standing at 2.250 million over a land area of 581,730 km².

Malaria due to *P. falciparum* is highest in the northern part of the country, which has an annual rainfall of 650 mm between the months of November and April. In the southwestern part, which consists of the mostly arid Kalahari desert, an average of 250 mm of rainfall is estimated. The rainfall pattern varies from year to year and occasionally there is drought, which affects malaria disease patterns. Recently, *Plasmodium vivax* has been detected in Botswana in parts of the Eastern, Southern, and Central districts,^{2,3} with a national prevalence of 4.7% among asymptomatic children. However, most

clinical malaria is due to *P. falciparum* infection, the focus of this report.

Chloroquine was the first-line treatment for uncomplicated *P. falciparum* malaria in Botswana until 1997, when it was replaced with sulfadoxine/pyrimethamine.¹ In 2007, sulfadoxine/pyrimethamine was discontinued and currently combination therapy with artemether/lumefantrine is recommended as the first-line treatment.¹ Molecular data on *P. falciparum* drug resistance from prior time points are not available for Botswana, apart from anecdotal reports of an apparent increase in chloroquine treatment failures in the nineties;⁴ however, neither data on sensitivity nor molecular and review studies have been published in peer-reviewed journals.

In general, antimalarial drugs act principally to eliminate the erythrocytic stages of malaria parasites that are responsible for human illness. Unfortunately, *P. falciparum* has developed resistance to most classes of antimalarials. The genetic basis of drug resistance is because of well-known polymorphisms in *P. falciparum* genes. For example, mutations in the *pfprt* and *pfmdr1* genes are known to confer resistance against chloroquine.⁴ However, the *pfprt* gene has also been associated with artemisinin resistance,⁵ whereas parasite *pfmdr1* polymorphisms also confer reduced susceptibility to other antimalarial drugs, including mefloquine, lumefantrine, and quinine.⁶ Several *P. falciparum* candidate genes have been associated with artemisinin resistance. The endoplasmic and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase ortholog of *P. falciparum* (*pATPase6*) has been postulated to be the target of artemisinin, although evidence varies.⁷ Finally, genome-wide analysis of artemisinin resistance in *P. falciparum* has demonstrated that mutations in the propeller domain of the gene encoding the Kelch 13 protein (*pfK13*) are associated with delayed parasite clearance in vitro and in vivo in SE Asia.⁵

*Address correspondence to Giacomo M. Paganotti, Botswana-University of Pennsylvania Partnership, P.O. Box AC 157 ACH, Gaborone, Botswana. E-mail: paganotti@bup.org.bw

With this in mind, we analyzed *P. falciparum* isolates from uncomplicated clinically identified malaria cases diagnosed at health facilities in Botswana. In particular, we assessed the following: 1) parasite PCR confirmation of rapid diagnostic test (RDT)-positive detection, 2) multiplicity of infection (MOI), and 3) drug-resistance marker polymorphisms.

METHODS

Study area. The study was primarily conducted in Ngamiland (North-West) and Central districts where *P. falciparum* malaria prevalence is the highest. However, samples were also collected in other parts of Botswana where malaria is present. Samples were collected from patients with febrile illness, seeking health care in the public sector between November 2012 and April 2016. Permission was granted by the National Malaria Programme at the Botswana Ministry of Health and Wellness to analyze dry blood spots (DBS) from those testing positive for *P. falciparum* using RDT. Two hundred and eleven subjects with uncomplicated malaria symptoms who tested positive on the RDT at day 0 were selected for the study. Sample sizes differ slightly between analyses because of different efficiencies of molecular tests.

DNA extraction and MSP1 genotyping. Total genomic DNA was extracted from DBS using the EasyMag (Biomerieux, Lyons, France) automated platform. Allelic families (K1, MAD20, and RO33) of parasite *MSP1* gene were analyzed using nested-PCR.⁹ Appropriate controls for all three allelic families (3D7, HB3, and RO33) were run with the field samples. The detection of a single PCR fragment of an allelic family was considered as an infection with one genotype. Length variations of PCR fragments were detected by gel electrophoresis and analyzed through Image Lab software (version 4.1; Bio-Rad, Hercules, CA). Alleles with closely similar sizes were grouped around an average size. Multiple infections of *P. falciparum* were defined as the presence of more than one genotype of *MSP1* in a single isolate. The MOI or number of genotypes per infection was calculated by dividing the total number of fragments detected in one antigenic marker by the number of samples positive for the same marker.

Assessment of *P. falciparum* drug-resistant polymorphisms. DNA samples were amplified by PCR-restriction fragment length polymorphism technique to identify K76T polymorphism in *pfprt* and N86Y in *pfmdr1* gene, according to existing protocols.⁹⁻¹² Appropriate *P. falciparum* controls (3D7 and Dd2, wild-type and mutant strains, respectively) were used for each analysis. Copy number of *pfmdr1* gene was determined by comparing the ratio of *pfmdr1*/ β -tubulin on the LightCycler 480 V1.5.0 software (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland), taking into account the efficiency of each PCR. The primers were obtained from Price et al.¹³ The reaction was carried out in a final volume of 20 μ L (10 μ L of LightCycler 480 Probe master mix [Roche Diagnostics], 300 nM each forward and reverse primer, 100 nM each probe, and 2–3 μ L of template DNA). The amplification program was as follows: 10 minutes at 95°C; and 45 cycles, with one cycle consisting of 10 seconds at 95°C, 20 seconds at 55°C, and 5 seconds at 72°C. In each experiment, DNA from the laboratory strains 3D7 (one copy of *pfmdr1*) and Dd2 (three copies of *pfmdr1*) were used as controls. The efficiency of each PCR (*pfmdr1* and β -tubulin) was determined using a scale dilution of the 3D7 DNA. Each sample was analyzed three times (three replicate assays). The PCR results of all the samples considered in this study could be localized to the

linear portion of the efficiency curve in terms of C_p (crossing point = C_t , threshold cycle). The copy number was calculated with the comparative $\Delta\Delta C_t$ method.¹³ Assays were repeated if any of the following results were obtained: C_p value was > 35; $\Delta\Delta C_t$ (cycle threshold) spread was > 1.5; and the 95% confidence interval around the estimation was > 0.4.¹³ The cutoff value of a multicopy was considered to be > 1.6.

For *pfATPase6* polymorphism S769N, we designed a nested-PCR using different combinations of primers from Ferreira et al.¹⁴ and Menegon et al.¹⁵ Briefly, parasite DNA was amplified using the following primers: first, outer forward 5'-TCACCAAGGGGTATCAACAA-3'15 and outer reverse 5'-AATTATCCTTTTCATCATCTCC-3'14 to amplify an 808-bp pair (bp) fragment; and then by applying nested-PCR using primers: nested forward 5'-ACTTAGCTTTGGTTATAAAAA AcTTAA-3'14 and nested reverse 5'-ACGTGGTGGATCA ATAATACCT-3'15 to amplify a 125-bp fragment. An artificial mismatch (nucleotide c) was introduced in the nested forward sequence to generate a restriction site (AflII) for the wild-type form.¹⁴ Substitutions at position S769N were subsequently distinguished through enzyme digestion with AflII. Undigested PCR product was used to illustrate the behavior of a mutant genotype, as control samples of mutant genotype were unavailable.

Polymorphism analysis of the propeller domain of the *pfrK13* gene was performed by PCR amplification and sequencing, with PCR conditions described by Taylor et al.¹⁶ All PCR products were subsequently sequenced. The obtained sequences were compiled and analyzed by Discovery Studio Gene software (Accelrys Inc., San Diego, CA). PlasmidDB gene identification no. PF3D7_1343700 (*P. falciparum* 3D7 strain) was used as reference in the numbering of nucleotide and amino acid positions.

All stated activities are prescribed by the Revised Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Malaria in Botswana 1, and permission was granted by the Ministry of Health and Wellness research ethics board.

RESULTS

Rapid diagnostic test accuracy and patient characteristics.

Of the 211 DBS samples selected for the study, 186 (88.2%) were PCR positive for *P. falciparum* by at least one molecular assay. Age of the participants ranged from 7 months to 80 years, median age was 24.2 years, and 52.9% were male. The most represented age groups were 16–50 years (38.0%), followed by 5–15 years (32.8%), with children < 5 years old representing only 15% of the sample, and adults > 50 years being 14.2%. The more represented district of Botswana was Ngamiland (50.7%) with others as follows: Central, 37.7%; South-East, 6.5%; Ghanzi, 2.2%; Kgalegadi, 1.5%; Kgatleng, 0.7%; and North-East, 0.7%.

MSP1 genotyping and MOI. *MSP1* gene amplification was performed on a subset of 59 samples in which all three *MSP1* allelic families (K1, MAD20, and RO33) were detected. The K1 allelic family was found most frequently (88.1%), whereas RO33 and MAD20 were observed in 55.9% and 35.6% of the samples, respectively. Among the analyzed isolates, 49.2% (29/59) harbored mixed genotypes belonging to two different allelic families. In addition, nine samples (15.2%) harbored all three *MSP1* allelic families (Figure 1). Most samples (43/59) showed multiple size variants from the same allelic family; 21 samples harbored two size variants, 10 samples harbored

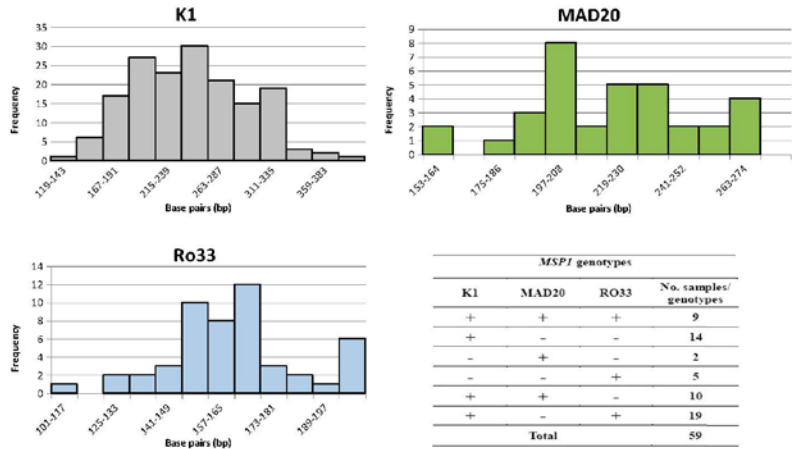


FIGURE 1. Size variant allele frequency for each allelic family observed in the analyzed samples and number of samples harboring each *MSP1* allelic family. For K1, the mean size \pm SE of PCR fragments was 247 base pairs (bp) \pm 4 bp, *K-S D* statistic = 0.18, *P* = n.s.; for MAD20, the mean size \pm SE was 222 bp \pm 5 bp, *K-S D* statistic = 0.22, *P* = n.s.; and for RO33, the mean size \pm SE was 165 bp \pm 3 bp, *K-S D* statistic = 0.23, *P* = n.s. This figure appears in color at www.ajtmh.org.

three variants, 10 samples harbored four variants, and five and six size variants were identified in the two different isolates, for a total of 139 size alleles detected in 59 samples (Figure 1). The overall mean MOI was 2.3. There was no significant association between age and MOI (Spearman rank coefficient = 0.02; *P* = 0.8).

***Pfprt* and *pfmdr1* polymorphisms.** Of 186 *P. falciparum*-positive isolates, wild-type *pfprt* K76T and *pfmdr1* N86Y polymorphisms were amplified in 167 and 166 samples, respectively. The mutant allele *pfprt* 76T was identified in only 10 (6.0%) isolates, six (3.6%) of which were pure mutants and four (2.4%) mixed with both K and T alleles. In *pfmdr1*, mutant 86Y allele was identified in only 13 (7.8%) isolates, seven (4.2%) being pure form and six (3.6%) associated with codon N86 as mixed infections. Most examined isolates were found to carry K76 and N86 alleles in *pfprt* and *pfmdr1* genes, respectively (Table 1). The combination of *pfprt* and *pfmdr1* genotypes (total number of successfully genotyped isolates for both genes being 152) showed seven distinct haplotypes (Table 1). In addition, *pfmdr1* gene copy number was determined in 96 isolates. Of these, 79 (82.3%) had one and 17 (17.7%) had two copies of the gene.

***pfATPase6* and *pfK13* polymorphisms.** The *pfATPase6* S769N polymorphism was investigated in 152 samples. All examined isolates were found to carry the wild-type allele S769. The *pfK13* gene was amplified and sequenced from 127 samples. Compared with the *pfK13* wild-type reference sequence PF3D7_1343700, the synonymous mutations R513R and V555V were detected in two and one *P. falciparum* isolates, respectively. All the other samples were classified as wild type when compared to the PF3D7_1343700 sequence.

DISCUSSION

Antimalarial drugs are a key tool for the control and elimination of malaria. Resistance to most of the currently available antimalarials, including the artemisinins, which have played a central role in the global decreases in malaria burden since 2000, has already been confirmed in Southeast Asia (Greater Mekong subregion).^{17,18} Currently, Botswana represents an ecosystem similar to the Greater Mekong subregion, as it includes areas of low to very low malaria transmission. In such low transmission areas advancing toward elimination, the incidence of infection is too infrequent for the development of partial malaria immunity needed to compensate for failing treatments. In fact, it has been demonstrated that the capacity to clear *P. falciparum* drug-resistant infections is proportional to the level of acquired immunity.¹⁹ In addition, the low level of multiple infections increases inbreeding, which

TABLE 1
Frequencies of the single nucleotide polymorphisms in the *pfprt* and *pfmdr1* genes associated with drug resistance among samples collected in Botswana

<i>pfprt</i> K76T	<i>pfmdr1</i> N86Y	No. of <i>pfprt/pfmdr1</i> haplotypes (%)
K	N	135 (88.8)
K	Y	3 (2.0)
K	N/Y	4 (2.6)
T	N	3 (2.0)
T	Y	3 (2.0)
K/T	N	2 (1.3)
K/T	N/Y	2 (1.3)
Total		152 (100.0)

2. Howes RE et al., 2015. *Plasmodium vivax* transmission in Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004222.
3. Motshoge T et al., 2016. Molecular evidence of high rates of asymptomatic *P. vivax* infection and very low *P. falciparum* malaria in Botswana. *BMC Infect Dis* 16: 520.
4. Wongsrichanalai C, Pockard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR, 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis* 2: 209–218.
5. Miotto O et al., 2015. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 47: 226–234.
6. Wurtz N et al., 2014. Role of Pfmdr1 in *in vitro* *Plasmodium falciparum* susceptibility to chloroquine, quinine, monodesethylamodiaquine, mefloquine, lumefantrine, and dihydroartemisinin. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 7032–7040.
7. David-Bosne S, Clausen MV, Poulsen H, Møller JV, Nissen P, le Maire M, 2016. Reappraising the effects of artemisinin on the ATPase activity of PfATP6 and SERCA1a E255L expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Nat Struct Mol Biol* 23: 1–2.
8. Tanabe K, Mackay M, Goman N, Scaife JG, 1987. Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 195: 273–287.
9. Fidock DA et al., 2000. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 6: 861–871.
10. Djimdé A et al., 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 344: 257–263.
11. Duch NO, Wilson MD, Ghaneah A, Abuaku B, Edoh D, Quashie NB, Koram KA, 2007. Mutations in *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter and multidrug resistance genes, and treatment outcomes in Ghanaian children with uncomplicated malaria. *J Trop Pediatr* 53: 27–31.
12. Dahlstrom S et al., 2011. *Plasmodium falciparum* polymorphisms associated with *ex vivo* drug susceptibility and clinical effectiveness of artemisinin-based combination therapies in Benin. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 1–10.
13. Price RN et al., 2004. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased pfmdr1 gene copy number. *Lancet* 364: 438–447.
14. Ferreira ID, Martinelli A, Rodrigues LA, do Carmo EL, do Rosário VE, Fovoa MM, Cravo P, 2006. *Plasmodium falciparum* from Pará state (Brazil) shows satisfactory *in vitro* response to artemisinin derivatives and absence of the S769N mutation in the SERCA-type PfATPase6. *Trop Med Int Health* 13: 199–207.
15. Menegon M, Sannella AR, Mori C, Severini C, 2008. Detection of novel point mutations in the *Plasmodium falciparum* ATPase6 candidate gene for resistance to artemisinins. *Parasitol Int* 57: 233–235.
16. Taylor SM et al., 2015. Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *J Infect Dis* 211: 680–688.
17. Mita T, Tanabe K, 2012. Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. *Jpn J Infect Dis* 65: 465–475.
18. Bustos MD, Wongsrichanalai C, Delcotte C, Burkholder B, 2013. Monitoring antimalarial drug efficacy in the Greater Mekong Subregion: an overview of *in vivo* results from 2008 to 2010. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 44: 201–230.
19. Djimdé AA et al., 2003. Clearance of drug-resistant parasites as a model for protective immunity in *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69: 558–563.
20. González R, Alside R, Naniche D, Menéndez C, Mayor A, 2012. HIV and malaria interactions: where do we stand? *Expert Rev Anti Infect Ther* 10: 153–165.
21. Kublin JG, Cortese JF, Njunu EM, Mukadam RA, Wrima JJ, Kazembe PN, Djimdé AA, Kouriba B, Taylor TE, Plowe CV, 2003. Reemergence of chloroquine-sensitive *Plasmodium falciparum* malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 187: 1870–1875.
22. Huang B et al., 2016. Prevalence of *ort* and *mdr-1* mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from Grande Comore island after withdrawal of chloroquine. *Malar J* 15: 414.
23. Conrad MD et al., 2014. Comparative impacts over 5 years of artemisinin-based combination therapies on *Plasmodium falciparum* polymorphisms that modulate drug sensitivity in Ugandan children. *J Infect Dis* 210: 344–353.
24. Tumwebaze P et al., 2015. Impact of antimalaria treatment and chemoprevention on the drug sensitivity of malaria parasites isolated from Ugandan children. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 3018–3030.
25. Sidhu AB, Uhlmann AC, Valderamos SG, Valderamos JC, Krishna S, Fidock DA, 2006. Decreasing pfmdr1 copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis* 194: 528–535.
26. Uhlmann AC, Ramharitar M, Lei B, Krenselner PG, Krishna S, 2005. Amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 in isolates from Gabon. *J Infect Dis* 192: 1830–1835.
27. Witkowski B, Nicolau ML, Soh PN, Inratt X, Menard S, Alvarez M, Marchou B, Magnaval JF, Benoit-Vical F, Berry A, 2010. *Plasmodium falciparum* isolates with increased pfmdr1 copy number circulate in west Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 3049–3051.
28. Agyeman-Budu A, Brown C, Adje G, Adams M, Dosoo D, Dery D, Wilson M, Asante KP, Greenwood B, Ovasu-Agyei S, 2013. Trends in multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic residents in the middle belt of Ghana. *Malar J* 12: 22.
29. Congpuong K, Sukaram R, Prompan Y, Dornae A, 2014. Genetic diversity of the *msp-1*, *msh-2*, and *glurp* genes of *Plasmodium falciparum* isolates along the Thai-Myanmar borders. *Asian Pac J Trop Biomed* 4: 596–602.
30. Simon C, Moskoth K, Moswunyane T, Jibril HB, Nkomo B, Motaleng M, Ntshaba DS, Chanda E, Haque U, 2013. Malaria control in Botswana, 2008–2012: the path towards elimination. *Malar J* 12: 458.
31. Chhanga S, Haque U, Chanda E, Moswunyane T, Moskoth K, Jibril HB, Motaleng M, Zhang W, Grass GE, 2016. Malaria elimination in Botswana, 2012–2014: achievements and challenges. *Parasit Vectors* 9: 99.
32. Kari S, White MT, Mine GJ, Gurarie D, Hay SI, Barry AE, Felger I, Mueller I, 2016. Spatial effects on the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections. *PLoS One* 11: e0164054.
33. Nioumi F, Contamin H, Roaiz C, Bonneloy S, Trape JF, Mercereau-Pujalon O, 1995. Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 52: 81–88.
34. Vata M, Troye-Bomberg M, Anchang J, Garcia A, Migot-Nabias F, 2008. Multiplicity of *Plasmodium falciparum* infection in asymptomatic children in Senegal: relation to transmission, age and erythrocyte variants. *Malar J* 7: 17.

6 BLIOGRAFIA

Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale JC, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O, Ménard D. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2014 Jan 2;505(7481):50-5. doi: 10.1038/nature12876. Epub 2013 Dec 18. PubMed PMID: 24352242; PubMed Central PMCID: PMC5007947.

Abdul-Ghani R, Al-Maktari MT, Al-Shibani LA, Allam AF. A better resolution for integrating methods for monitoring *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop*. 2014;137: 44–57. pmid:24801884.

Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2000 Oct 15;28(20):E87. PubMed PMID:11024189; PubMed Central PMCID: PMC110803.

Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Ceron N, Adhin MR, Chandrabose J, Krishnalall K, Huber CS, Goldman IF, Macedo de Oliveira A, Barnwell JW, Udhayakumar V. Variation in *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (Pfhrp2) and *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 3 (Pfhrp3) Gene Deletions in Guyana and Suriname. *PLoS One*. 2015 May 15;10(5):e0126805. doi: 10.1371/journal.pone.0126805. eCollection 2015. PubMed PMID: 25978499; PubMed Central PMCID: PMC4433255.

Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Mao S, Sopha C, Sam B, Dek D, Try V, Amato R, Blessborn D, Song L, Tullo GS, Fay MP, Anderson JM, Tarning J, Fairhurst RM. Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in

Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2016 Mar;16(3):357-65. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00487-9. Epub 2016 Jan 8. PubMed PMID: 26774243; PubMed Central PMCID: PMC4792715.

Amato R, Miotto O, Woodrow CJ, Almagro-Garcia J, Sinha I, Campino S, et al. Genomic epidemiology of artemisinin resistant malaria. *Elife.* 2016;5. pii: e08714.

Ansorge W, Sproat B, Stegemann J, Schwager C, Zenke M. Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1987 Jun 11;15(11):4593-602. PubMed PMID: 3588303; PubMed Central PMCID: PMC340882.

Arnot D. Unstable malaria in Sudan: the influence of the dry season. Clone multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections in individuals exposed to variable levels of disease transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 Nov-Dec;92(6):580-5. PubMed PMID: 10326095.

Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM, Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runcharoen R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Physo AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J, Kwiatkowski DP, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulthaew T, Chalk J, Intharabut B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung S, Woodrow CJ, Flegg JA, Das D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K, Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ; Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC). Spread of

artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. N Engl J Med. 2014 Jul 31;371(5):411-23. doi:10.1056/NEJMoa1314981. Erratum in: N Engl J Med. 2014 Aug 21;371(8):786. PubMed PMID: 25075834; PubMed Central PMCID: PMC4143591.

Babiker HA, Ranford-Cartwright LC, Walliker D. Genetic structure and dynamics of *Plasmodium falciparum* infections in the Kilombero region of Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999 Feb;93 Suppl 1:11-4. Review. PubMed PMID: 10450420.

Baird JK. Neglect of *Plasmodium vivax* malaria. Trends Parasitol. 2007 Nov; 23(11):533-9. Epub 2007 Oct 22. Review. PubMed PMID: 17933585.

Baker J, Ho MF, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, Albertini A, Arie F, Barnwell J, Bell D, Cunningham J, Djalle D, Echeverry DF, Gamboa D, Hii J, Kyaw MP, Luchavez J, Membi C, Menard D, Murillo C, Nhem S, Ogutu B, Onyor P, Oyibo W, Wang SQ, McCarthy J, Cheng Q. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 2010 May 17;9:129. doi:10.1186/1475-2875-9-129. PubMed PMID: 20470441; PubMed Central PMCID: PMC2893195.

Baker, J., McCarthy, J., Gatton, M., Kyle, D.E., Belizario, V., Luchavez, J., Bell, D., Cheng, Q., 2005. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. J Infect Dis 192, 870–877.

Bannister, L.H., Hopkins, J.M, Fowler, R.E., Krishana, S., and Mitchell, G.H.. (2000). A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. Parasitology today 16, 427-433.

Barnes KI, White NJ. Population biology and antimalarial resistance: The transmission of antimalarial drug resistance in

Plasmodium falciparum. Acta Trop. 2005 Jun;94(3):230-40. Review. PubMed PMID: 15878154.

Basco LK. 2007. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. WHO Press, Geneva.

Bayih AG, Getnet G, Alemu A, Getie S, Mohon AN, Pillai DR. A Unique *Plasmodium falciparum* K13 Gene Mutation in Northwest Ethiopia. Am J Trop Med Hyg. 2016 Jan;94(1):132-5. doi: 10.4269/ajtmh.15-0477. Epub 2015 Oct 19. PubMed PMID: 26483118; PubMed Central PMCID: PMC4710417.

Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. Int J Parasitol. 2004 Feb;34(2):163-89. Review. PubMed PMID:15037104.

Berhane, A., Russom, M., Bahta, I., Hagos, F., Ghirmai, M., Uqubay, S., 2017. Rapid diagnostic tests failing to detect *Plasmodium falciparum* infections in Eritrea: an investigation of reported false negative RDT results. Malar. J. 16, 105.

Birth D, Kao WC, Hunte C. Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. Nat Commun. 2014 Jun 4;5:4029. doi: 10.1038/ncomms5029. PubMed PMID: 24893593.

Botswana, Ministry of Health. Department of Public Health, National Malaria Programme, 2015. Revised Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Malaria in Botswana.

Boudreau EF, Webster HK, Pavanand K, Thosingha L. Type II mefloquine resistance in Thailand. Lancet. 1982 Dec 11;2(8311):1335. PubMed PMID: 6128616.

Bronner U, Divis PC, Färnert A, Singh B. Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo.

Malar J. 2009 Jan 16;8:15. doi:10.1186/1475-2875-8-15. PubMed PMID: 19146706; PubMed Central PMCID: PMC2634766.

Chauvin P, Menard S, Iriart X, Nsango SE, Tchioffo MT, Abate L, Awono-Ambéné PH, Morlais I, Berry A. Prevalence of *Plasmodium falciparum* parasites resistant to sulfadoxine/pyrimethamine in pregnant women in Yaoundé, Cameroon: emergence of highly resistant pfdhfr/pfdhps alleles. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Sep;70(9):2566-71. doi: 10.1093/jac/dkv160. Epub 2015 Jun 16. PubMed PMID:26080363.

Chenet SM, Akinyi Okoth S, Huber CS, Chandrabose J, Lucchi NW, Talundzic E, Krishnalall K, Ceron N, Musset L, Macedo de Oliveira A, Venkatesan M, Rahman R, Barnwell JW, Udhayakumar V. Independent Emergence of the *Plasmodium falciparum* Kelch Propeller Domain Mutant Allele C580Y in Guyana. *J Infect Dis.* 2016 May 1;213(9):1472-5. doi: 10.1093/infdis/jiv752. Epub 2015 Dec 21. PubMed PMID:26690347.

Cheng, Q., Gatton, M.L., Barnwell, J., Chiodini, P., McCarthy, J., Bell, D., Cunningham, J., 2014. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malar. J.* 13, 283.

Conrad MD, Bigira V, Kapisi J, Muhindo M, Kanya MR, Havlir DV, et al. Polymorphisms in K13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in *Plasmodium falciparum* isolated from Ugandan children. *PLoS One.* 2014;9(8):e105690.

Cooper RA, Lane KD, Deng B, Mu J, Patel JJ, Wellems TE, Su X, Ferdig MT. Mutations in transmembrane domains 1, 4 and 9 of the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter alter susceptibility to chloroquine, quinine and quinidine. *Mol Microbiol.* 2007 Jan;63(1):270-82. Epub 2006 Dec 5. Erratum in: *Mol Microbiol.* 2007 May;64(4):1139. PubMed PMID: 17163969.

Cordel H, Cailhol J, Matheron S, Bloch M, Godineau N, Consigny PH, Gros H, Campa P, Bourée P, Fain O, Ralaimazava P, Bouchaud O. Atovaquone-proguanil in the treatment of imported uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a prospective observational study of 553 cases. *Malar J*. 2013 Nov 7;12:399. doi: 10.1186/1475-2875-12-399. PubMed PMID: 24200190; PubMed Central PMCID: PMC3831254.

Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:1143–7.

Cowman AF, Galatis D, Thompson JK. Selection for mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* is linked to amplification of the *pfmdr1* gene and cross-resistance to halofantrine and quinine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Feb 1;91(3):1143-7. PubMed PMID: 8302844; PubMed Central PMCID: PMC521470.

Cowman AF, Morry MJ, Biggs BA, Cross GA, Foote SJ. 1988. Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:9109–9113.

Darío Mendez, C.M.a.J.M.B.. (2010). Blood stages of *P.falciparum* (Wikimedia Commons).

Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourté Y, et al. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001;344:257–63.

Dogovski C, Xie SC, Burgio G, Bridgford J, Mok S, McCaw JM, Chotivanich K, Kenny S, Gnädig N, Straimer J, Bozdech Z, Fidock DA, Simpson JA, Dondorp AM, Foote S, Klonis N, Tilley L. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol*. 2015 Apr 22;13(4):e1002132. doi: 10.1371/journal.pbio.1002132.

eCollection 2015 Apr. PubMed PMID: 25901609; PubMed Central PMCID: PMC4406523.

Dokomajilar C, Nsobya SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G. Selection of *Plasmodium falciparum* pfm_{dr1} alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May;50(5):1893-5. PubMed PMID: 16641472; PubMed Central PMCID: PMC1472234.

Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, Lwin KM, Arie F, Hanpithakpong W, Lee SJ, Ringwald P, Silamut K, Imwong M, Chotivanich K, Lim P, Herdman T, An SS, Yeung S, Singhasivanon P, Day NP, Lindegardh N, Socheat D, White NJ. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2009 Jul 30;361(5):455-67. doi: 10.1056/NEJMoa0808859. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009 Oct 22;361(17):1714. PubMed PMID: 19641202; PubMed Central PMCID:PMC3495232.

Dormond L, Jatou-Ogay K, de Vallière S, Genton B, Bille J, Greub G. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Mar;17(3):469-75. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03218.x. PubMed PMID: 20298268.

Dpdx-CDC, Parasitology Diagnostic Web Site:
<http://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>

Duraisingh MT, Cowman AF. Contribution of the pfm_{dr1} gene to antimalarial drug-resistance. *Acta Trop.* 2005 Jun;94(3):181-90. Review. PubMed PMID: 15876420.

Duraisingh MT, Jones P, Sambou I, von Seidlein L, Pinder M, Warhurst DC. The tyrosine-86 allele of the pfm_{dr1} gene of *Plasmodium falciparum* is associated with increased sensitivity to the anti-malarials mefloquine and artemisinin. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Apr 30;108(1):13-23. PubMed PMID: 10802315.

Duru V, Khim N, Leang R, Kim S, Domergue A, Kloeung N, Ke S, Chy S, Eam R, Khean C, Loch K, Ken M, Lek D, Beghain J, Arieu F, Guerin PJ, Huy R, Mercereau-Puijalon O, Witkowski B, Menard D. Plasmodium falciparum dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine in vitro assays: retrospective and prospective investigations. BMC Med. 2015 Dec 22;13:305. doi: 10.1186/s12916-015-0539-5. PubMed PMID: 26695060; PubMed Central PMCID: PMC4688949.

Eriksen J, Mwankusye S, Mduma S, Veiga MI, Kitua A, Tomson G, Petzold MG, Swedberg G, Gustafsson LL, Warsame M. Antimalarial resistance and DHFR/DHPS genotypes of Plasmodium falciparum three years after introduction of sulfadoxine-pyrimethamine and amodiaquine in rural Tanzania. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Feb;102(2):137-42. Epub 2007 Dec 21. PubMed PMID: 18082233.

Eshar, S., Dahan-Pasternak, N., Weiner, A., and Dzikowski, R.. (2011). High resolution 3D perspective of Plasmodium biology: advancing into a new era. Trends in parasitology 27, 548-554.

Eyles De, Hoo Cc, Warren M, Sandosham Aa. Plasmodium Falciparum Resistant To Chloroquine In Cambodia. Am J Trop Med Hyg. 1963 Nov;12:840-3. Pubmed Pmid:14072437.

Falk N, Maire N, Sama W, Owusu-Agyei S, Smith T, Beck H-P, et al. Comparison of PCR-RFLP and Genescan-based genotyping for analyzing infection dynamics of *Plasmodium falciparum*. Am J Trop Med Hyg. 2006;74:944–50.

Färnert A, Lindberg J, Gil P, Swedberg G, Berqvist Y, Thapar MM, Lindegårdh N, Berezcky S, Björkman A. Evidence of Plasmodium falciparum malaria resistant to atovaquone and proguanil hydrochloride: case reports. BMJ. 2003 Mar 22;326(7390):628-9. PubMed PMID: 12649236; PubMed Central

PMCID: PMC151974.

Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res.* 2006 Feb 9;34(3):e22. PubMed PMID: 16473845; PubMed Central PMCID: PMC1363783.

Fernando, S.D., Rodrigo, C., and Rajapakse, S.. (2010). The 'hidden' burden of malaria: cognitive impairment following infection. *Malaria journal* 9, 366.

Fidock D.A., Nomura T., Talley A.T., Cooper R.A., Dzekunov S., Ferdig M.T., Ursos L.M., Sidhu A.S., Naude B., Deitsch K., Su X.Z., Wootton J.C., Roepe P.D., Wellems T.E.. (2000). Mutations in the *Plasmodium falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol. Cell.*, 6: 861-871.

Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* 2000;6:861–71.

Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC, Pasvol G. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar J.* 2002 Feb 8;1:1. PubMed PMID: 12057021; PubMed Central PMCID: PMC111499.

Flaherty P, Natsoulis G, Muralidharan O, Wwinters M, Buenrostro J, Bell J, Brown S, Holodniy M, Zhang N, Ji HP. 2012. Ultrasensitive detection of rare mutations using next-generation targeted resequencing. *Nucleic Acids Res* 40:e2.

Footo SJ, Cowman AF. The mode of action and the mechanism of resistance to antimalarial drugs. *Acta Trop.* 1994 Mar;56(2-3):157-71. Review. PubMed PMID:8203302.

Footo SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AMJ, Forsyth K, Kemp DJ, et al. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 1990;345:255–8.

Foundation for Innovative New Diagnostic (FIND): Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDT round 7 (2015-2016). Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255836/9789241512688-eng.pdf?sequence=1>.

Fry M, Pudney M. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl)cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol*. 1992 Apr 1;43(7):1545-53. PubMed PMID: 1314606.

Greenhouse B, Dokomajilar C, Hubbard A, Rosenthal PJ, Dorsey G. Impact of transmission intensity on the accuracy of genotyping to distinguish recrudescence from new infection in antimalarial clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3096–103.

Greenwood, B.M., Bojang, K., Whitty, C.J., and Targett, G.A.. (2005). Malaria. *Lancet* 365, 1487-1498.

Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev*. 2005 Mar;57(1):117-45. Review. PubMed PMID: 15734729.

Haldar, K., Murphy, S.C., Milner, D.A., and Taylor, T.E.. (2007). Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annual review of pathology* 2, 217-249.

Hankins EG, Warhurst DC, Sibley CH. Novel alleles of the *Plasmodium falciparum* dhfr highly resistant to pyrimethamine and chlorocycloguanil, but not WR99210. *Mol Biochem Parasitol*. 2001 Sep 28;117(1):91-102. PubMed PMID: 11551635.

Höfler W. [Sulfadoxine-pyrimethamine resistant falciparum malaria from Cambodia]. *Dtsch Med Wochenschr.* 1980 Mar 7;105(10):350-1. German. PubMed PMID: 6988185.

Hurwitz ES, Johnson D, Campbell CC. Resistance of *Plasmodium falciparum* malaria to sulfadoxine-pyrimethamine ('Fansidar') in a refugee camp in Thailand. *Lancet.* 1981 May 16;1(8229):1068-70. PubMed PMID: 6112445.

Hyde JE. Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. *Microbes Infect.* 2002 Feb;4(2):165-74. Review. PubMed PMID: 11880048.

Idro, R., Marsh, K., John, C.C., and Newton, C.R.. (2010). Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatric research* 68, 267-274.

Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, Sutawong K, Mayxay M, Rekol H, et al. The spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in the Greater Mekong subregion: a molecular epidemiology observational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:491–497. pmid:28161569.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Snlnsky, J. J., White, T. J. (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press, New York.

Jiang H, Li N, Gopalan V, Zilversmit MM, Varma S, Nagarajan V, Li J, Mu J, Hayton K, Henschen B, Yi M, Stephens R, McVean G, Awadalla P, Wellems TE, Su XZ. High recombination rates and hotspots in a *Plasmodium falciparum* genetic cross. *Genome Biol.* 2011;12(4):R33. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-r33. Epub 2011 Apr 4. PubMed PMID: 21463505; PubMed Central PMCID: PMC3218859.

Kain KC, Shanks GD, Keystone JS. Malaria chemoprophylaxis in

the age of drug resistance. I. Currently recommended drug regimens. *Clin Infect Dis*. 2001 Jul 15;33(2):226-34. Epub 2001 Jun 14. Review. PubMed PMID: 11418883.

Kamau E, Campino S, Amenga-Etego L, Drury E, Ishengoma D, Johnson K, et al. K13-propeller polymorphisms in *Plasmodium falciparum* parasites from subSaharan Africa. *J Infect Dis*. 2015;211(8):1352-5.

Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2100–8.

Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K, Cheng Q. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Aug;44(8):2100-8. PubMed PMID: 10898682; PubMed Central PMCID: PMC90020.

Krotoski, W.A., Collins, W.E., Bray, R.S., Garnham, P.C., Cogswell, F.B., Gwadz, R.W., Killick-Kendrick, R., Wolf, R., Sinden, R., Koontz, L.C., *et al.* (1982). Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 31, 1291-1293.

Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese JF, Martino LM, Mukadam RA, Rogerson SJ, Lescano AG, Molyneux ME, Winstanley PA, Chimpeni P, Taylor TE, Plowe CV. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 2002 Feb 1;185(3):380-8. Epub 2002 Jan 17. PubMed PMID: 11807721.

LaRocque RC, Rao SR, Lee J, Ansdell V, Yates JA, Schwartz BS,

Knouse M, Cahill J, Hagmann S, Vinetz J, Connor BA, Goad JA, Oladele A, Alvarez S, Stauffer W, Walker P, Kozarsky P, Franco-Paredes C, Dismukes R, Rosen J, Hynes NA, Jacquerioz F, McLellan S, Hale D, Sofarelli T, Schoenfeld D, Marano N, Brunette G, Jentes ES, Yanni E, Sotir MJ, Ryan ET; Global TravEpiNet Consortium. Global TravEpiNet: a national consortium of clinics providing care to international travelers--analysis of demographic characteristics, travel destinations, and pretravel healthcare of high-risk US international travelers, 2009-2011. *Clin Infect Dis*. 2012 Feb 15;54(4):455-62. doi: 10.1093/cid/cir839. Epub 2011 Dec 5. PubMed PMID: 22144534.

Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, Taylor TE, Plowe CV. Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med*. 2006 Nov 9;355(19):1959-66. PubMed PMID: 17093247.

Lazarus, M.D., Schneider, T.G., and taraschi, T.F.. (2008). A new model for hemoglobin ingestion and transport by human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of cell science* 121, 1937-1949.

Leang R, Barrette A, Bouth DM, Menard D, Abdur R, Duong S, Ringwald P. Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Feb;57(2):818-26. doi: 10.1128/AAC.00686-12. Epub 2012 Dec 3. PubMed PMID: 23208711; PubMed Central PMCID: PMC3553743.

Leang R, Ros S, Duong S, Navaratnam V, Lim P, Arie F, Kiechel JR, Ménard D, Taylor WR. Therapeutic efficacy of fixed dose artesunate-mefloquine for the treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Kampong Speu, Cambodia. *Malar J*. 2013 Sep 23;12:343. doi: 10.1186/1475-2875-12-343. PubMed PMID: 24060207; PubMed Central PMCID: PMC3852322.

Leang R, Taylor WR, Bouth DM, Song L, Tarning J, Char MC, Kim S, Witkowski B, Duru V, Domergue A, Khim N, Ringwald P, Menard D. Evidence of *Plasmodium falciparum* Malaria Multidrug Resistance to Artemisinin and Piperaquine in Western Cambodia: Dihydroartemisinin-Piperaquine Open-Label Multicenter Clinical Assessment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Aug;59(8):4719-26. doi:10.1128/AAC.00835-15. Epub 2015 May 26. PubMed PMID: 26014949; PubMed Central PMCID: PMC4505193.

Lee N, Baker J, Andrews KT, Gatton ML, Bell D, Cheng Q, McCarthy J. Effect of sequence variation in *Plasmodium falciparum* histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2773-8. PubMed PMID: 16891491; PubMed Central PMCID: PMC1594627.

Lew, V.L., Tiffert, T., and Ginsburg, H.. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood* 101, 4189-4194.

Li J, Chen J, Xie D, Eyi UM, Matesa RA, Obono MMO, Ehapo CS, Yang L, Yang H, Lin M, Wu W, Wu K, Li S, Chen Z. Molecular mutation profile of *Pfprt* and *Pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* isolates from Bioko Island, Equatorial Guinea. *Infect Genet Evol.* 2015 Dec;36:552-556. doi: 10.1016/j.meegid.2015.08.039. Epub 2015 Aug 29. PubMed PMID: 26325683.

Liljander A, Wiklund L, Falk N, Kweku M, Mårtensson A, Felger I, et al. Optimization and validation of multi-coloured capillary electrophoresis for genotyping of *Plasmodium falciparum* merozoite surface proteins (*m*sp1 and 2). *Malar J.* 2009;8:78.

Lim P, Dek D, Try V, Sreng S, Suon S, Fairhurst RM. Decreasing *pfmdr1* copy number suggests that *Plasmodium falciparum* in Western Cambodia is regaining in vitro susceptibility to

mefloquine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 May;59(5):2934-7. doi: 10.1128/AAC.05163-14. Epub 2015 Feb 23. PubMed PMID:25712365; PubMed Central PMCID: PMC4394809.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. PubMed PMID: 11846609.

Illumina sequencing protocol. <http://www.illumina.com>.

Lu F, Culleton R, Zhang M, Ramaprasad A, von Seidlein L, Zhou H, et al. Emergence of Indigenous Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Africa. *N Engl J Med* 2017;376(10):991-3. doi: 10.1056/NEJMc1612765.

Lucchi NW, Narayanan J, Karell MA, Xayavong M, Kariuki S, DaSilva AJ, Hill V, Udhayakumar V. Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. *PLoS One.* 2013;8(2):e56677. doi:10.1371/journal.pone.0056677. Epub 2013 Feb 20. PubMed PMID: 23437209; PubMed Central PMCID: PMC3577666.

Malaria Update, Eritrean Ministry of Health bi-annual report. Issue of 18 July 2011.

Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, Rizk SS, Njimoh DL, Ryan Y, Chotivanich K, Nguon C, Ghorbal M, Lopez-Rubio JJ, Pfrender M, Emrich S, Mohandas N, Dondorp AM, Wiest O, Haldar K. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2015 Apr 30;520(7549):683-7. doi: 10.1038/nature14412. Epub 2015 Apr 15. PubMed PMID: 25874676; PubMed Central PMCID: PMC4417027.

McCullum AM, Basco LK, Tahar R et al. . Hitchhiking and selective sweeps of *Plasmodium falciparum* sulfadoxine and

pyrimethamine resistance alleles in a population from central Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4089–97.

McCutchan TF, Piper RC, Makler MT. Use of malaria rapid diagnostic test to identify *Plasmodium knowlesi* infection. *Emerg Infect Dis.* 2008 Nov;14(11):1750-2. doi: 10.3201/eid1411.080480. PubMed PMID: 18976561; PubMed Central PMCID:PMC2630758.

Ménard D, Khim N, Beghain J, Adegnika AA, Shafiul-Alam M, Amodu O, Rahim-Awab G, Barnadas C, Berry A, Boum Y, Bustos MD, Cao J, Chen JH, Collet L, Cui L, Thakur GD, Dieye A, Djallé D, Dorkenoo MA, Eboumbou-Moukoko CE, Espino FE, Fandeur T, Ferreira-da-Cruz MF, Fola AA, Fuehrer HP, Hassan AM, Herrera S, Hongvanthong B, Houzé S, Ibrahim ML, Jahirul-Karim M, Jiang L, Kano S, Ali-Khan W, Khanthavong M, Kreamsner PG, Lacerda M, Leang R, Leelawong M, Li M, Lin K, Mazarati JB, Ménard S, Morlais I, Muhindo-Mavoko H, Musset L, Nabangchang K, Nambozi M, Niaré K, Noedl H, Ouédraogo JB, Pillai DR, Pradines B, Quang-Phuc B, Ramharter M, Randrianariveლოსია M, Sattabongkot J, Sheikh-Omar A, Silué KD, Sirima SB, Sutherland C, Syafruddin D, Tahar R, Tang LH, Touré OA, Tshibangu-wa-Tshibangu P, Vigan-Womas I, Warsame M, Wini L, Zakeri S, Kim S, Eam R, Berne L, Khean C, Chy S, Ken M, Loch K, Canier L, Duru V, Legrand E, Barale JC, Stokes B, Straimer J, Witkowski B, Fidock DA, Rogier C, Ringwald P, Ariey F, Mercereau-Puijalon O; KARMA Consortium. A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms. *N Engl J Med.* 2016 Jun 23;374(25):2453-64. doi:10.1056/NEJMoa1513137. PubMed PMID: 27332904; PubMed Central PMCID: PMC4955562.

Menegon M, Nurahmed AM, Talha AA, Nour BY, Severini C. 2016. Molecular surveillance of antimalarial drug resistance related genes in *Plasmodium falciparum* isolates from Eritrea. *Acta Trop.* 157, 158-161.

Menegon M, Pearce RJ, Inojosa WO, Pisani V, Abel PM, Matondo

A, Bisoffi Z, Majori G, Ord R, Warhurst DC, Roper C, Severini C. Monitoring for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* isolates and analysis of pyrimethamine resistance evolution in Uige province, Angola. *Trop Med Int Health*. 2009 Oct;14(10):1251-7. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02369.x. Epub 2009 Aug 25. PubMed PMID: 19708897.

Menemedengue V, Sahnouni K, Basco L et al. . Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXX. Sequence analysis of *Plasmodium falciparum* ATPase 6, dihydrofolate reductase, and dihydropteroate synthase resistance markers in clinical isolates from children treated with an artesunate/sulfadoxine/pyrimethamine combination. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 85: 22–5.

Miotto O, Almagro-Garcia J, Manske M, Macinnis B, Campino S, Rockett KA, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Duong S, Nguon C, Chuor CM, Saunders D, Se Y, Lon C, Fukuda MM, Amenga-Etego L, Hodgson AV, Asoala V, Imwong M, Takala-Harrison S, Nosten F, Su XZ, Ringwald P, Arieu F, Dolecek C, Hien TT, Boni MF, Thai CQ, Amambua-Ngwa A, Conway DJ, Djimdé AA, Doumbo OK, Zongo I, Ouedraogo JB, Alcock D, Drury E, Auburn S, Koch O, Sanders M, Hubbard C, Maslen G, Ruano-Rubio V, Jyothi D, Miles A, O'Brien J, Gamble C, Oyola SO, Rayner JC, Newbold CI, Berriman M, Spencer CC, McVean G, Day NP, White NJ, Bethell D, Dondorp AM, Plowe CV, Fairhurst RM, Kwiatkowski DP. Multiple populations of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia. *Nat Genet*. 2013 Jun;45(6):648-55. doi: 10.1038/ng.2624. Epub 2013 Apr 28. PubMed PMID: 23624527; PubMed Central PMCID: PMC3807790.

Miotto O, Amato R, Ashley EA, MacInnis B, Almagro-Garcia J, Amaratunga C, Lim P, Mead D, Oyola SO, Dhorda M, Imwong M, Woodrow C, Manske M, Stalker J, Drury E, Campino S, Amenga-Etego L, Thanh TN, Tran HT, Ringwald P, Bethell D, Nosten F, Phyto AP, Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chuor CM, Nguon C, Suon S, Sreng S, Newton PN, Mayxay M,

Khanthavong M, Hongvanthong B, Htut Y, Han KT, Kyaw MP, Faiz MA, Fanello CI, Onyamboko M, Mokuolu OA, Jacob CG, Takala-Harrison S, Plowe CV, Day NP, Dondorp AM, Spencer CC, McVean G, Fairhurst RM, White NJ, Kwiatkowski DP. Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet.* 2015 Mar;47(3):226-34. doi: 10.1038/ng.3189. Epub 2015 Jan 19. PubMed PMID:25599401; PubMed Central PMCID: PMC4545236.

Mohamed AO, Abdel Hamid MM, Mohamed OS, Elkando NS, Suliman A, Adam MA. Efficacies of DHA-PPQ and AS/SP in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in an area of an unstable seasonal transmission in Sudan. *Malar J.* 2017;16(1):163. doi: 10.1186/s12936-017-1817-9.

Mohon AN, Alam MS, Bayih AG, Folefoc A, Shahinas D, Haque R, Pillai DR. Mutations in *Plasmodium falciparum* K13 propeller gene from Bangladesh (2009-2013). *Malar J.* 2014 Nov 18;13:431. doi: 10.1186/1475-2875-13-431. PubMed PMID: 25404021; PubMed Central PMCID: PMC4240861.

Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Jan;15(1):66-78. Review. PubMed PMID: 11781267; PubMed Central PMCID: PMC118060.

Mugittu K, Adjuik M, Snounou G, Ntoumi F, Taylor W, Mshinda H, et al. Molecular genotyping to distinguish between recrudescents and new infections in treatment trials of *Plasmodium falciparum* malaria conducted in sub-Saharan Africa: adjustment of parasitological outcomes and assessment of genotyping effectiveness. *Trop Med Int Health.* 2006;11:1350–9.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:263-73. PubMed PMID: 3472723.

Murray CK, Gasser RA Jr, Magill AJ, Miller RS. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2008

Jan;21(1):97-110. doi:10.1128/CMR.00035-07. Review. PubMed PMID: 18202438; PubMed Central PMCID:PMC2223842.

Musset L, Le Bras J, Clain J. Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol.* 2007 Aug;24(8):1582-5. Epub 2007 May 7. PubMed PMID: 17488741.

Mwai L, Kiara SM, Abdirahman A, Pole L, Rippert A, Diriye A, Bull P, Marsh K, Borrmann S, Nzila A. In vitro activities of piperazine, lumefantrine, and dihydroartemisinin in Kenyan *Plasmodium falciparum* isolates and polymorphisms in *pfprt* and *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Dec;53(12):5069-73. doi:10.1128/AAC.00638-09. Epub 2009 Sep 21. PubMed PMID: 19770282; PubMed Central PMCID: PMC2786317.

Nag S, Dalgaard MD, Kofoed P-E, Ursing J, Crespo M, Andersen LO, et al. High throughput resistance profiling of *Plasmodium falciparum* infections based on custom dual indexing and Illumina next generation sequencing-technology. *Sci Rep.* 2017;7: 2398. pmid:28546554.

Naidoo I, Roper C. Following the path of most resistance: dhps K540E dispersal in African *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* 2010 Sep;26(9):447-56. doi:10.1016/j.pt.2010.05.001. Epub 2010 Jun 17. Review. PubMed PMID: 20728060.

Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009;2009:278246. doi: 10.1155/2009/278246. Epub 2009 Dec 30. PubMed PMID: 20069111; PubMed Central PMCID: PMC2804041.

Ngassa Mbenda HG, Das A. Molecular evidence of *Plasmodium vivax* mono and mixed malaria parasite infections in Duffy-negative native Cameroonians. *PLoS One.* 2014 Aug 1; 9(8):e103262. doi: 10.1371/journal.pone.0103262. eCollection 2014. PubMed PMID: 25084090; PubMed Central PMCID: PMC4118857.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM; Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008 Dec 11;359(24):2619-20. doi: 10.1056/NEJMc0805011. Epub 2008 Dec 8. PubMed PMID:19064625.

Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM; Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med.* 2008 Dec 11;359(24):2619-20. doi: 10.1056/NEJMc0805011. Epub 2008 Dec 8. PubMed PMID:19064625.

Noranate N, Durand R, Tall A, Marrama L, Spiegel A, Sokhna C, Pradines B, Cojean S, Guillotte M, Bischoff E, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Ariey F, Patarapotikul J, Le Bras J, Trape JF, Rogier C, Mercereau-Puijalon O. Rapid dissemination of *Plasmodium falciparum* drug resistance despite strictly controlled antimalarial use. *PLoS One.* 2007 Jan 3;2(1):e139. PubMed PMID:17206274; PubMed Central PMCID: PMC1764034.

Nsanjabana C, Hastings IM, Marfurt J, Müller I, Baea K, Rare L, et al. Quantifying the Evolution and Impact of Antimalarial Drug Resistance: Drug Use, Spread of Resistance, and Drug Failure over a 12-Year Period in Papua New Guinea. *J Infect Dis.* 2010;201: 435–443. pmid:20047502.

Nuralitha S, Siregar JE, Syafruddin D, Roelands J, Verhoef J, Hoepelman AI, Marzuki S. Within-Host Selection of Drug Resistance in a Mouse Model of Repeated Incomplete Malaria Treatment: Comparison between Atovaquone and Pyrimethamine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Oct 26;60(1):258-63. doi: 10.1128/AAC.00538-15. Print 2016 Jan. PubMed PMID: 26503662; PubMed Central PMCID: PMC4704165.

Nyunt MH, Hlaing T, Oo HW, Tin-Oo LL, Phway HP, Wang B,

Zaw NN, Han SS, Tun T, San KK, Kyaw MP, Han ET. Molecular assessment of artemisinin resistance markers, polymorphisms in the k13 propeller, and a multidrug-resistance gene in the eastern and western border areas of Myanmar. *Clin Infect Dis*. 2015 Apr 15;60(8):1208-15. doi: 10.1093/cid/ciu1160. Epub 2014 Dec 23. PubMed PMID:25537878.

Ocholla H, Preston MD, Mipando M, Jensen AT, Campino S, MacInnis B, Alcock D, 593 Terlouw A, Zongo I, Oudraogo JB, Djimde AA, Assefa S, Doumbo OK, Borrmann S, Nzila 594 A, Marsh K, Fairhurst RM, Nosten F, Anderson TJ, Kwiatkowski DP, Craig A, Clark TG, 595 Montgomery J. 2014. Whole-genome scans provide evidence of adaptive evolution in 596 Malawian *Plasmodium falciparum* isolates. *J Infect Dis* 210:1991-2000. 597. -Torrentino-Madamet M, Fall B, Benoit N, Camara C, Amalvict R, Fall M, Dionne P, Ba Fall 598 K, Nakoulima A, Diatta B, Dieme Y, Menard D, Wade B, Pradines B. 2014. Limited 599 polymorphisms in k13 gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal in 2012- 600 2013. *Malar J* 13:472.

Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, Quesada JA, Kaminsky R, Baum MK, Ager AL. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol*. 1998 Jan;36(1):203-6. PubMed PMID: 9431947; PubMed Central PMCID: PMC124834.

Pearce RJ, Pota H, Evehe MS, Bâ el-H, Mombo-Ngoma G, Malisa AL, Ord R, Inojosa W, Matondo A, Diallo DA, Mbacham W, van den Broek IV, Swarthout TD, Getachew A, Dejene S, Grobusch MP, Njie F, Dunyo S, Kweku M, Owusu-Agyei S, Chandramohan D, Bonnet M, Guthmann JP, Clarke S, Barnes KI, Streat E, Katokele ST, Uusiku P, Agboghroma CO, Elegba OY, Cissé B, A-Elbasit IE, Giha HA, Kachur SP, Lynch C, Rwakimari JB, Chanda P, Hawela M, Sharp B, Naidoo I, Roper C. Multiple origins and regional dispersal of resistant dhps in African *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS Med*. 2009 Apr 14;6(4):e1000055. doi: 10.1371/journal.pmed.1000055. Epub 2009 Apr 14. PubMed PMID: 19365539; PubMed Central

PMCID: PMC2661256.

Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, Volkman SK, Wirth DF, Legrand E, Fidock DA, Neafsey DE, Musset L. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfert*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 15;112(37):11672-7. doi: 10.1073/pnas.1507142112. Epub 2015 Aug 10. PubMed PMID: 26261345; PubMed Central PMCID: PMC4577156.

Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:3018–22.

Pickard AL, Wongsrichanalai C, Purfield A, Kamwendo D, Emery K, Zalewski C, Kawamoto F, Miller RS, Meshnick SR. Resistance to antimalarials in Southeast Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Aug;47(8):2418-23. PubMed PMID: 12878499; PubMed Central PMCID: PMC166057.

Picot S, Olliaro P, de Monbrison F, Bienvenu A-L, Price RN, Ringwald P. A systematic review and meta-analysis of evidence for correlation between molecular markers of parasite resistance and treatment outcome in *falciparum* malaria. *Malar J*. 2009;8:89.

Pongtavornpinyo W, Hastings IM, Dondorp A, White LJ, Maude RJ, Saralamba S, Day NP, White NJ, Boni MF. Probability of emergence of antimalarial resistance in different stages of the parasite life cycle. *Evol Appl*. 2009 Feb;2(1):52-61. PubMed PMID: 20526409; PubMed Central PMCID: PMC2880443.

Price RN, Dorsey G, Ashley EA, Barnes KI, Baird JK, d'Alessandro U, et al. World Antimalarial Resistance Network I: clinical efficacy of antimalarial drugs. *Malar J*. 2007;6:119.

Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, et al. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet*. 2004;364:438–47.

Pulido-Tamayo S, Sanchez-Rodriguez A, Swings T, Van den Bergh B, Dubey A, Steenackers H, Michiels J, Fostier J, Marchal K. 2015. Frequency-based Haplotype reconstruction from deep sequencing data of bacterial populations. *Nucleic Acid Res* 43:e105.

Rao PN, Uplehar S, Kayal S, Mallick PK, Bandyopadhyay N, Kale S, Singh OP, Mohanty A, Mohanty S, Wassmer SC, Carlton JM. 2016. A method for amplicon deep sequencing of drug resistance genes in *Plasmodium falciparum* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol* 54:1500-1511.

Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):906-9. PubMed PMID: 10706290.

Reeder JC, Rieckmann KH, Genton B, Lorry K, Wines B, Cowman AF. Point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes and in vitro susceptibility to pyrimethamine and cycloguanil of *Plasmodium falciparum* isolates from Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:209–13.

Ridley RG. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. 2002 Feb 7;415(6872):686-93. Review. PubMed PMID: 11832957.

Rosenthal, P.J., and Meshnick, S.R.. (1996). Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites. *Molecular and biochemical parasitology* 83, 131- 139.

Russo G, Faggioni G, Paganotti GM, Djeunang Dongho GB,

Pomponi A, De Santis R, Tebano G, Mbida M, Sanou Sobze M, Vullo V, Rezza G, Lista FR. Molecular evidence of *Plasmodium vivax* infection in Duffy negative symptomatic individuals from Dschang, West Cameroon. *Malar J*. 2017 Feb 14; 16(1):74. doi:10.1186/s12936-017-1722-2. PubMed PMID: 28196496; PubMed Central PMCID:PMC5309988.

Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol*. 2007 Jul;23(7):332-9. Epub 2007 May 10. Review. PubMed PMID: 17493873.

Saunders DL, Vanachayangkul P, Lon C; U.S. Army Military Malaria Research Program; National Center for Parasitology, Entomology, and Malaria Control (CNM);Royal Cambodian Armed Forces. Dihydroartemisinin-piperaquine failure in Cambodia. *N Engl J Med*. 2014 Jul 31;371(5):484-5. doi: 10.1056/NEJMc1403007. PubMed PMID:25075853.

Sibley CH, Macreadie I. Novel approaches to tackling malarial drug resistance using yeast. *IUBMB Life*. 2001 Dec; 52(6):285-9. Review. PubMed PMID: 11895077.

Sidhu AB, Uhlemann AC, Valderramos SG, Valderramos JC, Krishna S, Fidock DA. Decreasing *pfmdr1* copy number in *plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *J Infect Dis*. 2006 Aug 15; 194(4):528-35. Epub 2006 Jul 11. PubMed PMID: 16845638; PubMed Central PMCID: PMC2978021.

Sidhu AB, Valderramos SG, Fidock DA. *pfmdr1* mutations contribute to quinine resistance and enhance mefloquine and artemisinin sensitivity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2005 Aug; 57(4):913-26. PubMed PMID: 16091034.

Siregar JE, Kurisu G, Kobayashi T, Matsuzaki M, Sakamoto K, Mi-ichi F, Watanabe Y, Hirai M, Matsuoka H, Syafruddin D,

Marzuki S, Kita K. Direct evidence for the atovaquone action on the Plasmodium cytochrome bc1 complex. *Parasitol Int.* 2015 Jun; 64(3):295-300. doi: 10.1016/j.parint.2014.09.011. Epub 2014 Sep 28. PubMed PMID: 25264100.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature.* 1986 Jun 12-18; 321(6071):674-9. PubMed PMID: 3713851.

Smithuis FM, van Woensel JB, Nordlander E, Vantha WS, ter Kuile FO. Comparison of two mefloquine regimens for treatment of Plasmodium falciparum malaria on the northeastern Thai-Cambodian border. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Sep; 37(9):1977-81. PubMed PMID: 8239616; PubMed Central PMCID: PMC188103.

Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Apr;58(2):283-92. PubMed PMID: 8479452.

Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, et al. Plasmodium falciparum genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J.* 2009 Jun 20;8:135.

Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, Dacheux M, Khim N, Zhang L, Lam S, Gregory PD, Urnov FD, Mercereau-Puijalon O, Benoit-Vical F, Fairhurst RM, Ménard D, Fidock DA. Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in Plasmodium falciparum clinical isolates. *Science.* 2015 Jan 23;347(6220):428-31. doi: 10.1126/science.1260867. Epub 2014 Dec 11. PubMed PMID: 25502314; PubMed Central PMCID: PMC4349400.

Tahar R, Basco LK. Molecular epidemiology of malaria in

Cameroon. XXVII. Clinical and parasitological response to sulfadoxine/pyrimethamine treatment and *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase alleles in Cameroonian children. *Acta Trop* 2007; 103: 81–9.

Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, Fukuda MM, Hien TT, Mayxay M, Noedl H, Nosten F, Kyaw MP, Nhien NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Arie F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, Newton PN, Khanthavong M, Hongvanthong B, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Khan WA, Phyo AP, Nyunt MM, Nyunt MH, Brown TS, Adams M, Pepin CS, Bailey J, Tan JC, Ferdig MT, Clark TG, Miotto O, MacInnis B, Kwiatkowski DP, White NJ, Ringwald P, Plowe CV. Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *J Infect Dis*. 2015 Mar 1;211(5):670-9. doi: 10.1093/infdis/jiu491. Epub 2014 Sep 1. PubMed PMID: 25180241; PubMed Central PMCID: PMC4334802.

Takala-Harrison S, Jacob CG, Arze C, Cummings MP, Silva JC, Dondorp AM, Fukuda MM, Hien TT, Mayxay M, Noedl H, Nosten F, Kyaw MP, Nhien NT, Imwong M, Bethell D, Se Y, Lon C, Tyner SD, Saunders DL, Arie F, Mercereau-Puijalon O, Menard D, Newton PN, Khanthavong M, Hongvanthong B, Starzengruber P, Fuehrer HP, Swoboda P, Khan WA, Phyo AP, Nyunt MM, Nyunt MH, Brown TS, Adams M, Pepin CS, Bailey J, Tan JC, Ferdig MT, Clark TG, Miotto O, MacInnis B, Kwiatkowski DP, White NJ, Ringwald P, Plowe CV. Independent emergence of artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Southeast Asia. *J Infect Dis*. 2015 Mar 1;211(5):670-9. doi: 10.1093/infdis/jiu491. Epub 2014 Sep 1. PubMed PMID: 25180241; PubMed Central PMCID: PMC4334802.

Talundzic E, Ravishankar S, Kelley J, Patel D, Plucinski M, Schmedes S, Ljolje D, Clemons B, Madison-Antenucci S, Arguin PM, Lucchi NW, Vannberg F, Udhayakumar V. Next-Generation Sequencing and Bioinformatics Protocol for Malaria Drug Resistance Marker Surveillance. *Antimicrob Agents Chemother*.

2018 Mar 27; 62(4). pii: e02474-17. doi: 10.1128/AAC.02474-17. Print 2018 Apr. PubMed PMID: 29439965; PubMed Central PMCID: PMC5913988.

Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, Tagbor H, Williams J, Bojang K, Njie F, Desai M, Kariuki S, Gutman J, Mathanga DP, Mårtensson A, Ngasala B, Conrad MD, Rosenthal PJ, Tshefu AK, Moormann AM, Vulule JM, Doumbo OK, Ter Kuile FO, Meshnick SR, Bailey JA, Juliano JJ. Absence of putative artemisinin resistance mutations among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: a molecular epidemiologic study. *J Infect Dis.* 2015 Mar1;211(5):680-8. doi: 10.1093/infdis/jiu467. Epub 2014 Sep 1. PubMed PMID: 25180240; PubMed Central PMCID: PMC4402372.

Taylor SM, Parobek CM, DeConti DK, Kayentao K, Coulibaly SO, Greenwood BM, et al. Absence of Putative Artemisinin Resistance Mutations Among *Plasmodium falciparum* in Sub-Saharan Africa: A Molecular Epidemiologic Study. *J Infect Dis.* 2015;211: 680–688. pmid:25180240.

Tchuinkam T, Simard F, Lélé-Defo E, Téné-Fossog B, Tateng-Ngouateu A, Antonio-Nkondjio C, et al. Bionomics of Anopheline species and malaria transmission dynamics along an altitudinal transect in Western Cameroon. *BMC Infect Dis.* 2010;10:119. doi: 10.1186/1471-2334-10-119.

Tinto H, Guekoun L, Zongo I, Guiguemdé RT, D'Alessandro U, Ouédraogo JB. Chloroquine-resistance molecular markers (Pfprt T76 and Pfmdr-1 Y86) and amodiaquine resistance in Burkina Faso. *Trop Med Int Health.* 2008 Feb;13(2):238-40. doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01995.x. PubMed PMID: 18304270.

Torrentino-Madamet M, Fall B, Benoit N, Camara C, Amalvict R, Fall M, et al. Limited polymorphisms in k13 gene in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal in 2012-2013. *Malar J.* 2014;13:472.

Triglia T, Cowman AF. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 19;91(15):7149-53. PubMed PMID: 8041761; PubMed Central PMCID: PMC44356.

Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF. 1997. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 94: 13944 –13949.

Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, Murphy KM. 2010. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. J Mol Diagn 12:425-432.

Uhlemann AC, Ramharter M, Lell B, Kremsner PG, Krishna S, 2005. Amplification of *Plasmodium falciparum* multidrug resistance gene 1 in isolates from Gabon. J Infect Dis 192:1830–1835.

Verdrager J. Epidemiology of the emergence and spread of drug-resistant *falciparum* malaria in South-East Asia and Australasia. J Trop Med Hyg. 1986 Dec;89(6):277-89. PubMed PMID: 3543384.

Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. Mol Microbiol. 1997;23:979–86.

Warhurst DC. A molecular marker for chloroquine-resistant *falciparum* malaria. N Engl J Med. 2001 Jan 25;344(4):299-302. PubMed PMID: 11172160.

White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest. 2004 Apr;113(8):1084-92. Review. PubMed PMID: 15085184; PubMed Central PMCID:PMC385418.

White NJ. Determinants of relapse periodicity in *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J.* 2011 Oct 11;10:297. doi: 10.1186/1475-2875-10-297. Review. PubMed PMID: 21989376; PubMed Central PMCID: PMC3228849.

WHO. Eritrea Malaria Country Profile, 2016. Geneva. World Health Organization, 2016. Available from: http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_eri_en.pdf?ua=1

WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: World Health Organization, 2009.

WHO. Microscopy examination of thick and thin blood smears for identification of malaria parasite. Malaria microscopy quality assurance manual-Ver. 2 January 2016. Geneva: World Health Organization.

WHO. World Malaria Report, 2017. Geneva: World Health Organization, 2017. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259492/9789241565523-eng.pdf>

Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in vitro and ex vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:1043–9.

Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, et al. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype–genotype association study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17:174–83.

Witkowski B, Nicolau ML, Soh PN, Iriart X, Menard S, Alvarez M, Marchou B, Magnaval JF, Benoit-Vical F, Berry A, 2010. *Plasmodium falciparum* isolates with increased *pfmdr1* copy number circulate in west Africa. *Antimicrob Agents Chemother*

54:3049–3051.

Wooden J, Kyes S, Sibley CH. PCR and strain identification in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 1993 Aug;9(8):303-5. PubMed PMID: 15463789.

Woodrow CJ, Dahlström S, Cooksey R, Flegg JA, Le Nagard H, Mentré F, Murillo C, Ménard D, Nosten F, Sriprawat K, Musset L, Quashie NB, Lim P, Fairhurst RM, Nsohya SL, Sinou V, Noedl H, Pradines B, Johnson JD, Guerin PJ, Sibley CH, LeBras J. High-throughput analysis of antimalarial susceptibility data by the WorldWide Antimalarial Resistance Network (WWARN) in vitro analysis and reporting tool. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jul;57(7):3121-30. doi:10.1128/AAC.02350-12. Epub 2013 Apr 22. PubMed PMID: 23612201; PubMed Central PMCID: PMC3697366.

Worrall E, Basu S, Hanson K. Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Trop Med Int Health*. 2005 Oct;10(10):1047-59. Review. PubMed PMID:16185240.

Wurtz, N., Fall, B., Pascual, A., Fall, M., Baret, E., Camara, C., et al., 2014. Role of *Pfmdr1* in vitro *Plasmodium falciparum* susceptibility to chloroquine, quinine, monodesethylamodiaquine, mefloquine, lumefantrine, and dihydroartemisinin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:7032–7040. doi: 10.1128/AAC.03494-14.

Young Md, Contacos Pg, Stitche Je, Millar Jw. Drug Resistance In *Plasmodium Falciparum* From Thailand. *Am J Trop Med Hyg*. 1963 May;12:305-14. Pubmed Pmid:14044740.

Zaw MT, Emran NA, Lin Z. Updates on k13 mutant alleles for artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2018 Apr;51(2):159-165. doi: 10.1016/j.jmii.2017.06.009. Epub 2017 Jun 29. Review. PubMed PMID: 28711439.

7 Appendice Tecnica

Targeted Amplicon Deep Sequencing of *Plasmodium falciparum* (Pf) molecular markers of resistance

Preparing full length genes *Pf kelch 13 (k13)*, *Pf chloroquine resistant transporter (crt)*, *Pf multidrug resistant protein 1 (mdr1)*, *Pf bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (dhfr)*, *Pf dihydropteroate synthase (dhps)* and mitochondrial genome amplicons for sequencing on the Illumina MiSeq system

Introduction/General Overview	2
Materials and Equipment	3-4
NGS Library Preparation Workflow	5
PET PCR Sample QC	6-8
Gene PCR Enrichment	9-13
Electrophoresis	14
SeqPrep Normalization and Purification	15-16
Tagment Genomic DNA	17-18
Library Amplification and Index PCR	19-20
Library Clean up	21-22
Next Steps	23
Library Pooling, Quantification, and Normalization	24-26
Library Denaturing and MiSeq Sample Loading	27-29
Supporting Information	30-34

IMPORTANT NOTICE

This document provides information for an application for Illumina technology that has been demonstrated internally and may be of interest to customers. This information is provided as-is and is not an Illumina product and is not accompanied by any rights or warranties. Customers using or adapting this information should obtain any licenses required and materials from authorized vendors. Illumina products mentioned herein are for research use only unless marked otherwise. While customer feedback is welcomed, this application is not supported by Illumina Technical Support and Field Application Scientists.

November 2nd, 2017 version 3.3 modified by Ekin Talundžić (etalundzic@cdc.gov)

This protocol format was adapted from the 16S Metagenomics Sequencing Library Preparation [protocol](#) from Illumina.

PET-PCR Sample QC

This step uses a real time PCR assay to assess the quality and quantity of starting DNA material. The readout includes an estimation of *all* DNA in the sample, host and parasite.

NOTE: This assay is used to identify which samples should be included and/or excluded for downstream procedures. Any sample with a CT value greater than 34, should be excluded. We recommend grouping all samples with a CT > 34 and performing separate amplicon PCRs and electrophoresis for these samples. If the electrophoresis yields positive results (e.g. positive and clear bands on gel) you may proceed with downstream procedures. Samples with a CT > 34 have either very low and/or no parasite DNA.

Consumables

Table 4. PET-PCR Consumables

Item	Quantity	Storage
Primers – FAM labeled genus primers and HEX labeled <i>falciparum</i> primers (see below)	0.25-0.5 µl per sample	2° to 8°C
TaqMan 2X Environmental buffer	10 µl per sample	2° to 8°C
Nuclease-free water	6.25 µl per sample	Room temperature
Strip tubes 8X	Up to 8 samples per strip	Room temperature
Strip Optical caps 8X	Up to 8 samples per strip	Room temperature

Preparation

- All stock primers should be prepared at a 10µM concentration.
- DNA samples should be stored at 4°C until testing or -20°C for long term storage.
- Store all primer stocks at -20°C for up to 1 year.
- Unopened tubes of ABI TaqMan Environmental Buffer should be stored at -20°C for a maximum of six months. Once thawed, store at 4°C for up to six months. The reagent must be used within the expiration date provided by the manufacturer.
- All samples should be tested in duplicates or triplicates in some special cases (e.g. very low density situations).
- Typically, the genus/*P. falciparum* multiplex assay should be run first on all samples. All genus-positive sample are subsequently tested for *P. ovale*, *P. malaria* and *P. vivax*, in order to determine the species.

Procedure

Initial Set up

- The PET-PCR reaction mix is prepared by mixing the TaqMan environmental buffer, primers, and water as shown below.
- Determine the number of reactions you need to run by multiplying the total number of samples you have to test (including your positive and negative controls) by two because every sample will be tested in duplicates.
 - o For example, if you are testing 10 samples, you will multiple this by two to give you 20. Add two extra reactions to account for loss of solution during pipetting. This gives you a total number of 22 reactions. Multiply this number with the volumes below for each component to give you the total master-mix volume required for your experiment.
- In a 1.5ml tube, prepare your master-mix by multiplying the volumes shown below with the total number of reactions you need to run (e.g. 22 as described above).

Primers and PCR Conditions

The table below shows the primers and PCR conditions for a multiplex reaction- Genus and *P. falciparum*:

Table 5. Multiplexing genus and *P. falciparum* species specific primers

	20.0 µl rxn	X samples +1	Final [conc]
H ₂ O	6.25 µl		
2XABI TaqMan buffer	10.0 µl		1X
Genus F primer (100nM)	0.5 µl		250 nM
FAM genus R primer (100nM)	0.5 µl		250 nM
<i>P. falciparum</i> F primer (100nM)	0.5 µl		250 nM
HEX- <i>P. falciparum</i> R primer (100nM)	0.25 µl		125 nM
Total	18.0 µl		
Add last:			
DNA	2.0 µl		
TOTAL	20.0 µl		

Thermal cycling conditions	
95°C	15:00 min
95°C	0:20 min
63°C	0:40 min
72°C	0:30 min

45X

Primers:

Genus 18S For (5' to 3'): 5'-GCC CTA ACA TGG CTA TGA CG-3'

Genus 18S Rev (5' to 3'): 5'-agg cgc ata ggc cct cct TAG ATG TGC TAG CT-3' (FAM-labeled: based on the 18S rRNA gene)

P. falciparum For (5' to 3'): 5'-ACC CCT CGC CTG GTG TTT TT-3'

P. falciparum Rev (5' to 3'): 5'-agg cgg ata cgc cct cgt CGG GCC CCA AAA ATA GGA A-3' (HEX-labeled: based on the r364 target)

Adding the DNA Samples

- Mix the prepared master-mix well by vortexing briefly.
- Centrifuge the tubes for 5 seconds to remove any solution trapped in the cap.
- Arrange the optically clear PCR tubes on a PCR-tube rack following the PCR sample sheet. Add 18 µl of the PET-PCR master mix prepared above to each PCR well. Loosely put on the lids of the wells filled with master mix solution.
- Return all reagents to the freezer and refrigerator before proceeding to the next step.
- Take the assembled plate containing the tubes with PCR master mix solution to the PCR template area.
- Add 2 µl of the unknown DNA samples to the wells with the master-mix according to the sample sheet. Cap the well tightly after adding the sample. The total volume of PCR reaction is 20.0 µl after addition of the template.
- Add positive control DNA to each positive control well with master-mix. Cap the wells after each positive control is added.
- Add 2.0 µl of DNase-free H₂O to the wells designated as the no-template control (NTC) and close that well tightly.
- Make sure each sample has been added to the correct well and that all wells are tightly capped.
- Briefly centrifuge your strip tubes to remove any solution trapped on the walls of the wells.
- Make sure there are no bubbles in the well.

NOTE: The amount of template DNA to be used can be as low as 2 µl, but it is not uncommon to use 5 µl. This can be adjusted appropriately depending on the sample parasitemia. The change should be discussed before it is implemented.

PCR-Cycling Parameters

- 1 Start the real-time PCR thermocycler according to the manufacturer's guidelines.
- 2 Program the software to detect fluorescence through FAM, HEX and ROX filters all wells. ROX is to be detected as a reference dye.
- 3 Program the software to run the cycling conditions shown on page 7.
- 4 Fluorescence data should be collected at the amplification plateau.

Interpreting Results

- 1 Interpret the results using standard settings in the software.
- 2 If the calculated thresholds are located within the background noise, they should be manually set to a level slightly higher than the background. Such alterations should be done with only one dye displayed at the time.
- 3 Positive specimens are those that yield a fluorescence signal above the threshold value in the wells where samples or controls were loaded
 - a. **Positive PCR:** A positive sample produces a fluorescence signal above the threshold/noise level. Positive samples are designated a Ct value below 40.0.
 - b. **Negative PCR:** No fluorescence signal above the threshold/noise level. Negative samples have no Ct or have a Ct value above 40.0.

NOTE: The negative controls must be negative (no Ct or above 40.0). The positive controls must be positive (designated by Ct value below 40.0). The test should be repeated if the NTC has a positive Ct value, or if the positive control yields no positive results.

For more information, please see:

Lucchi, N.W., et al., Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR. PLoS One, 2013. 8(2): p. e56627.

Gene PCR Enrichment

This step uses PCR to amplify template from a DNA sample using region of interest-specific primers.

User-defined forward and reverse primers are used to amplify templates from genomic DNA. A subsequent limited-cycle amplification step is performed to add multiplexing indices and Illumina sequencing adapters. Libraries are normalized and pooled, and sequenced on the MiSeq system using v2 reagents.

Procedure

Initial Set up

- Ensure that the No-DNA and DNA-only UV stations have all the appropriate pipettes and tip sizes.
- Clean up all pipettes and lab bench area using using 10% bleach followed by 70% ethanol.
- Turn on the No-DNA (PCR master mix) and DNA-only UV station for 30 minutes.
- If you have not already done so, create a 100 μ M working stock solution of your primers, using $C_1V_1 = C_2V_2$ to calculate the appropriate volume needed to make a working stock solution.
- Label all freshly made and newly opened items with the date and your name initials.
- Get the appropriate number of PCR plates and/or PCR tubes and place them in the no-DNA UV station.
- Label the PCR tubes (use a printout template for PCR plates) with sample IDs.
- Get the appropriate number Eppendorf PCR Cooler plates from the freezer, wipe down with 70% ethanol and place them in the UV hoods (one or more sets each in the no-DNA and DNA-only UV stations). Turn on the UV stations for another 30 min.
- Be sure to reserve the appropriate number of thermocyclers and have the appropriate cycling conditions set up (Table 6).

Step by step procedure

- Let Primers, dNTPs, and GC Buffer defrost at room temperature (10-15 min). Once defrosted, mix gently (vortexed) and centrifuge briefly prior to use. **DO NOT thaw and/or vortex or mix the HF Taq.**
 - All PCR reactions **must be assembled on the** Eppendorf PCR Cooler plates
 - **Always add the Taq last when making your master mix and DO NOT vortex and/or pipette after adding Taq.**
 - If you forget to return any of the reagents, especially the Taq, to its appropriate storage conditions (i.e., leave it out at room temperature), record the date and time of when it happened, and discard.
- 1 Set up the following reaction of water, GC Buffer, dNTPs, primers, HF Taq Phusion, and DNA in the order given in Tables 6 - 6.6:
- Calculate appropriate volumes for mastermix based on number of samples to be included in reaction; multiply each reagent volume times the total number of samples + 1 (for user pipetting errors)
 - Final volume of master mix is given in Tables 6.1 - 6.6

NOTE: If the number of samples is <5, make a mastermix for at least 6 samples to avoid pipetting volume errors.

- 2 Seal plates and/or PCR tubes.
- 3 Once tubes and/or plates are sealed, keep them in the Eppendorf PCR Cooler plates. Pre-heat the thermal cycler to 98°C prior to placing PCR plates and/or PCR tubes into the thermal cycler. Pre-heating to 98°C should take 0:30 of the 3:00 min.

Primers and PCR Conditions

The tables below show primers and PCR conditions for *Pfprt* (6.1), *Pfk13* (6.2), *Mitochondrial genome* (6.3), *Pf-cytb* (6.3a), *Pfdhps* (6.4), *Pfdhfr* (6.5), *Pfmdr1* (6.6).

Table 6.1 *Pfprt*

<i>Pfprt</i> (319bp)	50.0 µl rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
5X GC Buffer	10.0 µl		1 X
dNTPs (10mM)	1 µl		0.2 mM
F primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
R primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
H ₂ O	32 µl		
Add last:			
HF Phusion Taq	0.5 µl		1 unit
Total	46.0 µl		
Add:			
Template DNA	4.0 µl/well	—	50-250 ng
TOTAL	50.0 µl		

Thermal cycling conditions	
98°C	3:00 min
98°C	0:30 min
62°C	0:30 min
65°C	5:00 min
65°C	10:00min
4°C	∞

30X

Primers: **Pfprt_F1 Sequence (5' to 3')**: TTACATATAACAAAATGAAATTCGG; **Pfprt_R1 Sequence (5' to 3')**: TATTCTGTAATAATTGAATCGACC

Table 6.2 *Pfk13*

<i>Pfk13</i> (2151bp)	50.0 µl rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
5X GC Buffer	10.0 µl		1 X
dNTPs (10mM)	1 µl		0.2 mM
F primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
R primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
H ₂ O	32 µl		
Add last:			
HF Phusion Taq	0.5 µl		1 unit
Total	46.0 µl		
Add:			
Template DNA	4.0 µl/well	—	50-250 ng
TOTAL	50.0 µl		

Thermal cycling conditions	
98°C	3:00 min
98°C	0:30 min
58°C	0:30 min
65°C	5:00 min
65°C	10:00min
4°C	∞

30X

Primers: **Pfk13_F1_ETn2 Sequence (5' to 3')**: CTATGACGTATGATAGGGAATCTGG; **Pfk13_R1_ETn2 Sequence (5' to 3')**: CTCGGAACTAATAAGATGGCCC

Table 6.3 Mitochondrial genome

Mitch (5967 bp)	50.0 µl rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
5X GC Buffer	10.0 µl		1 x
dNTPs (10mM)	1 µl		0.2 mM
F primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
R primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
H ₂ O	37 µl		
Add last:			
HF Phusion Tag	0.5 µl		1 unit
Total	46.0 µl		
Add:			
Template DNA	4.0 µl/well	—	50-250 ng
TOTAL	50.0 µl		

Thermal cycling conditions	
98°C	3:00 min
98°C	0:30 min
50°C	0:30 min
65°C	6:00 min
65°C	10:00 min
4°C	∞

30X

Primers: Mitochondrion_F1 Sequence (5' to 3'): AAGCTTTTGGTATCTCGTAAT; Mitochondrion_R1 Sequence (5' to 3'): TATTATAATATAACTCTACAAAGTTCAAC

NOTE: If experiencing issues with amplifying the full-length mitochondrial genome, consider amplifying only the *cyt b* gene instead for characterizing molecular markers associated with Malarone (atovaquone/proguanil) resistance. See Table 6.3a below.

Table 6.3a Cytochrome b

Pf:cytb 1 (937bp)	50.0 µl rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
5X GC Buffer	10.0 µl		1 x
dNTPs (10mM)	1 µl		0.2 mM
F primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
R primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
H ₂ O	32 µl		
Add last:			
HF Phusion Tag	0.5 µl		1 unit
Total	46.0 µl		
Add:			
Template DNA	4.0 µl/well	—	50-250 ng
TOTAL	50.0 µl		

Thermal cycling conditions	
98°C	3:00 min
98°C	0:10 min
60°C	0:30 min
65°C	3:00 min
65°C	10:00 min
4°C	∞

30X

Primers: Cytb_F1_Sequence (5' to 3'): CTATTAATTTAGTTAAAGCACAG; Cytb_R1_Sequence (5' to 3'): ACAGAATAATCTCTAGCACCA

Table 6.4 *mdr1*

<i>Pfmdr1</i> (4155bp)	50.0 μ l rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
SX GC Buffer	10.0 μ l		1 X
dNTPs (10mM)	1 μ l		0.2 mM
F primer (10 μ M)	1.25 μ l		0.25 μ M
R primer (10 μ M)	1.25 μ l		0.25 μ M
H ₂ O	32 μ l		
Add last:			
HF Phusion Taq	0.5 μ l		1 unit
Total	46.0 μl		
Add:			
Template DNA	4.0 μ l/well	—	50-250 ng
TOTAL	50.0 μl		

Primers: *Pfmdr1_F1_Sequence* (5' to 3'): TGCTAACCTCACTATCAAAG; *Pfmdr1_Rt_Sequence* (5' to 3'): CATCTTGCTGCTGATAATAATTC

Thermal cycling conditions	
95°C	3:00 min
98°C	0:30 min
60°C	0:30 min
65°C	5:00 min
65°C	10:00min
4°C	∞

30X

Table 6.5 *dhfr*

<i>Pfdhfr</i> (2062bp)	50.0 μ l rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
SX GC Buffer	10.0 μ l		1 X
dNTPs (10mM)	1 μ l		0.2 mM
F primer (10 μ M)	1.25 μ l		0.25 μ M
R primer (10 μ M)	1.25 μ l		0.25 μ M
H ₂ O	32 μ l		
Add last:			
HF Phusion Taq	0.5 μ l		1 unit
Total	46.0 μl		
Add:			
Template DNA	4.0 μ l/well		50-250 ng
TOTAL	50.0 μl		

Primers: *Pfdhfr_F1 Sequence* (5' to 3'): TTTTACTAGCCATTTTGTATTCC; *Pfdhfr_Rt Sequence* (5' to 3'): TTAACCGTTCAGGTAATTTGTCA

*Primers adapted from: SC, Carlton JM. 2016. A Method for Amplicon Deep Sequencing of Drug Resistance Genes in Plasmodium falciparum Clinical Isolates from India. J Clin Microbiol 54:1500-1511.

Thermal cycling conditions	
95°C	3:00 min
98°C	0:30 min
58°C	0:30 min
65°C	5:00 min
65°C	10:00min
4°C	∞

30X

Table 6.6 dhps

Pfdhps (2817bp)	50.0 µl rxn	X samples +1	Final [conc]
Master Mix:			
5X GC Buffer	10.0 µl		1 x
dNTPs (10mM)	1 µl		0.2 mM
F primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
R primer (10µM)	1.25 µl		0.25 µM
H ₂ O	33 µl		
Addase:			
HF Phusion Taq	0.5 µl		1 unit
Total	46.0 µl		
Add:			
Template DNA	4.0 µl/well		50-250 ng
TOTAL	50.0 µl		

Thermal cycling conditions	
98°C	3:00 min
98°C	0:30 min
58°C	0:30 min
65°C	5:00 min
65°C	10:00min
4°C	∞

30X

Primers: Pfdhps_F Sequence (5' to 3'): AATATTTGCCCAACTTTTTA; Pfdhps_R Sequence (5' to 3'): TTTATTTCGTAATAGTCCACTTTTGAT

* Primers adapted from: SC, Carlton JM. 2016. A Method for Amplicon Deep Sequencing of Drug Resistance Genes in Plasmodium falciparum Clinical Isolates from India. J Clin Microbiol 54:1500-1511.

SAFE STOPPING POINT If you do not immediately proceed to Electrophoresis, seal plate with adhesive seal and store it at 2° to 8°C for up to a week.

Electrophoresis

This step is necessary to ensure successful amplification of amplicons. It is recommended to run at least 25% of the total samples, at no-template and negative controls on the gel to confirm amplification was successful and no contamination occurred. Please note PCR amplification can be affected by numerous factors, including but not limited to, DNA quality and quantity.

Consumables

Table 7. Electrophoresis Consumables

Item	Quantity	Storage
Agarose	1g (for a 1% gel)	Room temperature
1x solution of 10X TBE Buffer and deionized water	100mL (for a 1% gel)	Room temperature
Nucleic Acid Gel Stain	5 µl per 100mL of buffer	Room temperature
Orange Dye	2 µl per 8 µl PCR product	Room temperature

Preparation

- Create a 1X solution of 10X TBE Buffer and deionized water before you start.

Procedure

- 1 Choose an Erlenmeyer flask that is 2-4 times the volume of the solution and place a stirring rod into the flask.
- 2 Weigh the agar to the desired concentration.
 - For a 1% agarose gel, 1.0 gram of agarose + 100mL of buffer will fill a medium gel chamber
 - For a 1.5% agarose gel, 1.5 gram of agarose + 100mL of buffer will fill a medium gel chamber
- 3 Add the appropriate amount of buffer for the desired concentration.
- 4 Dissolve the agar in the microwave by heating the solution on high power until it comes to a boil. Watch the solution closely; **DO NOT** allow solution to boil over.
- 5 Remove the flask with pot holders and gently swirl to re-suspend any settled agar.
- 6 Repeat steps 4-5 until all the agar is dissolved (no transparent agarose clumps should be present).
- 7 Allow the solution to cool on a stirring plate until you can comfortably hold the flask with your hands.
- 8 Using a 10 µl pipette, add nucleic acid gel stain to the solution. For every 100mL of buffer, add 5 µl of gel stain. Swirl solution to mix, making sure as little bubbles as possible are created.
- 9 Pour the cooled solution into the gel form- ensure no bubbles are present. Place the comb into the gel and allow the gel to sit undisturbed for at least 15 minutes or until the gel has become firm (the color will change from clear to slightly milky in color).
- 10 When gel has solidified, ensure the wells are aligned with the black (negative) nodes on the electrophoresis chamber and fill with buffer until it covers about a centimeter above the gel. Remove the comb.
- 11 Combine a mixture of 2 µl of orange dye and 8 µl of each sample and load 8µL of that mixture into each well.
- 12 Be sure to include reference ladders (no orange dye necessary).
- 13 Place the lid on the chamber box and connect the black node to the negative terminal and the red node to the positive terminal. Turn on the power supply and adjust the voltage to 100-130 volts.
- 14 Run gel for about 45 minutes -until the samples nearly reach the end of the gel. **DO NOT** allow samples to run off the gel.
- 15 Turn off the power supply, disconnect the electrodes, and remove the lid.
- 16 Remove the gel from the chamber and take to the gel reading station for analysis.
- 17 Once amplification is confirmed, proceed to SequaPrep Normalization (page 15-16).

SequelPrep Normalization

This step utilizes ChargeSwitch Technology to purify and normalize amplicon PCR product. PCR product is added to the plate and mixed with Binding Buffer, which then sits at room temperature for 1 hour. The DNA is then washed and eluted, resulting in a purified and normalized DNA product.

This protocol format was adapted from the SequelPrep™ Normalization Plate (96) Kit [protocol](#) from ThermoFisher Scientific.

Consumables

Table 8. PCR Purification 1 SequelPrep Consumables

Item	Quantity	Storage
SequelPrep™ Normalization Plate (96)	1 plate	15° to 30°C (Room temperature)
SequelPrep™ Normalization Binding Buffer	1 µl per 1 µl of sample	15° to 30°C (Room temperature)
SequelPrep™ Normalization Wash Buffer	50 µl per sample	15° to 30°C (Room temperature)
SequelPrep™ Normalization Elution Buffer (10mM Tris-HCL, pH 8.5)	20 µl per sample	15° to 30°C (Room temperature)
(Optional) Foil Tape	2 sheets	15° to 30°C (Room temperature)

Preparation

- You will need at least 250 ng amplicon per well to use with the SequelPrep™ Normalization Plate to achieve robust normalization. An average efficiency PCR (20ul reaction volume) produces in the range of 25-100ng/ul, allowing you to purify using 5-10ul using the SequelPrep system.

- Elution options:

- The **standard elution** method (described below) is designed to elute purified DNA from each well using 20 µl elution volume to obtain each amplicon at a concentration of 1-2 ng/µl.
- The **optional sequential elution** method is designed to sequentially elute multiple rows or columns using the same 20 µl of elution buffer to obtain higher amplicon concentrations. The amplicon concentrations will be additive as sequential wells are eluted. For example, dispense 20 µl of elution buffer into the first column (A1-H1), mix well, and incubate for 5 minutes at room temperature. Then, simply move this column of elution buffer to the next column (A2-H2), and again incubate for 5 minutes. Continue this step to obtain your specific elution needs for the downstream application of choice.

NOTE: Proceed very cautiously during this procedure and take your time- do not introduce bubbles when pipetting.

Procedure

Binding Step

1. Transfer the desired volume of PCR product (5-25 µl PCR reaction mix, at least 250 ng amplicon/well) from the PCR plate into the wells of the SequelPrep™ Normalization plate.
2. Add an equivalent volume of SequelPrep™ Normalization Binding Buffer.
For example: To purify 10 µl of PCR product, add 10 µl SequelPrep™ Normalization Binding Buffer.
3. Mix completely by pipetting up and down 10 times, or seal the plate with Foil Tape, vortex to mix, and briefly centrifuge the plate.

- 4 Incubate the plate for 1 hour at room temperature to allow binding of DNA to the plate surface. Mixing is not necessary at this stage.
NOTE: Incubations longer than 60 minutes do not improve results. However, depending on your work flow you may perform overnight incubation at room temperature for the binding step.
- 5 Optional: If >25 ng DNA/well yield is desired, transfer the amplicon/Binding Buffer mixture from Step 4 to another, fresh well/plate to sequentially bind more DNA. Perform DNA binding at room temperature for 1 hour.
NOTE: After binding is complete, you can remove the amplicon/Binding Buffer mixture from the well and store at -20°C for up to 30 days to perform additional purifications at a later time.

Washing Step

- 6 Aspirate the liquid from wells. Be sure not to scrape the well sides during aspiration.
- 7 Add 50 μ l SequelPrep™ Normalization Wash Buffer to the wells. Mix by pipetting up and down twice to improve removal of contaminants.
NOTE: If you wish to store the amplicon/Binding Buffer mixture for additional purifications at a later time, aspirate the liquid from wells into another plate and store at -20°C for up to 30 days.
- 8 Completely aspirate the buffer from wells and discard. To ensure complete removal of wash buffer and maximize elution efficiency, you may need to invert and tap the plate on paper towels depending on the pipetting technique or instrument used. A small amount of residual Wash Buffer (1–3 μ l) is typical and does not affect the subsequent elution or downstream applications.

Elution Step

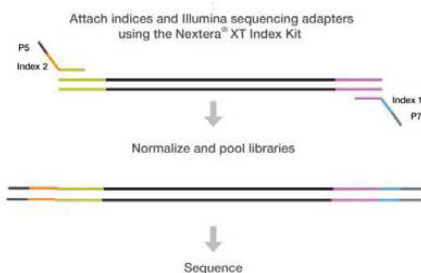
- 9 Add 20 μ l SequelPrep™ Normalization Elution Buffer to each well of the plate.
NOTE: Do not use water for elution. If you need to elute in any other buffer, be sure to use a buffer of pH 8.5–9.0. If the pH of the buffer is <8.5, the DNA will not elute efficiently.
- 10 Mix by pipetting up and down 5 times (or seal the plate with Foil Tape, vortex to mix, and briefly centrifuge the plate). Ensure that the buffer contacts the entire plate coating (up to 20 μ l level).
- 11 Incubate at room temperature for 5 minutes.
- 12 Transfer the normalized and purified DNA to a new 96-well skirted plate. You can store the eluted DNA at 4°C (short-term storage) or -20°C (long-term storage) until further use.
- 13 Pool each drug resistance gene (normalized PCR amplicon) as follows:
- 50 μ l of each amplicon (i.e. *mitochondria/cyt-b*, *kt3*, *mdr1*, *dhfr*, *dhps*, and *act*) for each respective sample

Expected DNA concentration is 1–2 ng/ μ l when using 20 μ l elution volume.

SAFE STOPPING POINT If you do not immediately proceed to *Tagment Genomic DNA*, seal plate with Microseal “B” adhesive seal and store it at -15° to -25°C for up to a week.

Tagment Genomic DNA

This step uses the Nextera transposome to tagment gDNA, which fragments and then tags the DNA with adaptor sequences in a single step.



Consumables

Table 9. Tagment Genomic DNA Consumables

Item	Quantity	Storage
ATM (Amplicon Tagment Mbx)	5 µl per sample	-15° to -25°C
TD (Tagment DNA Buffer)	10 µl per sample	-15° to -25°C
NT (Neutralize Tagment Buffer)	5 µl per sample	15°C to 30°C
TruSeq Index Plate Fixture (FC-130-1005)	1 (if available)	Room temperature
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	Room temperature
Mikroseal "A" film	1	Room temperature

Preparation

- If not completed already, **carefully** pool 5µL of each gene's corresponding sample into the same well of a half skirt plate before continuing
- Be sure all samples are mixed thoroughly by pipetting gently 10 times.
- Thaw on ice, ATM and TD, invert thawed tubes 3-5 times and then centrifuge briefly.
- Check NT for precipitates. If present, vortex until all particulates are re-suspended.
- Set up thermal cycler and choose preheat lid option:

Thermocycler Program

55 °C for 5 min

10 °C for ∞

Procedure

- 1 Add the following items in the order listed to each well of a new Hard-Shell skirted PCR plate. Pipette to mix.

Item	Volume (μ l)
TD	10
Normalized pooled gene amplicons	5

- 2 Add 5 μ l ATM to each well. Pipette to mix.
 3 Centrifuge at 280 \times g at 20°C for 1 minute.
 4 Place on the preprogrammed thermal cycler and run the tagmentation program

Thermocycler Program:

55 °C for 5 min

10 °C for 00

NOTE: Be sure to remove the plate as soon as the reaction has completed- NT must be added to the well *immediately* after the reaction has completed in order to stop the reaction.

- 5 Add 5 μ l NT to each well. Pipette to mix.
 6 Centrifuge at 280 \times g at 20°C for 1 minute.
 7 Incubate at room temperature for 5 minutes.
 8 [optional] To assess tagmentation, run 1 μ l on Agilent Bioanalyzer and/or Tapestation using high sensitivity DNA chip.
 9 Proceed to Library Amplification and Index PCR

Library Amplification and Index PCR

This step amplifies the tagmented DNA using a limited-cycle PCR program. The PCR step adds Index 1 (I1) adapters and Index 2 (I2) adapters and sequences required for cluster formation. Use the full amount of recommended input DNA. To ensure libraries produce high-quality sequencing results, use the specified number of PCR cycles

Consumables

Table 10. Library Amplification and Index PCR Consumables

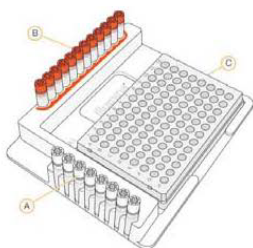
Item	Quantity	Storage
NPM (Nextera PCR Master Mix)	15 µl per sample	-15° to -25°C
Nextera XT Index 1 Primers (N700) from the Nextera XT Index kit (FC-131-1001 or FC-131-1002)	5 µl per sample	-15° to -25°C
Nextera XT Index 2 Primers (S500) from the Nextera XT Index kit (FC-131-1001 or FC-131-1002)	5 µl per sample	-15° to -25°C
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	Room temperature
Microseal [®] A [®] film	1	Room temperature

Procedure

- Using the entire 25µl from the Tagment Genomic DNA step (see page 17-18), prepare the following:
- Arrange the Index 1 and 2 primers in a rack (i.e. the TruSeq Index Plate Fixture) using the following arrangements as needed:
 - Arrange Index 2 primer tubes (white caps, clear solution) vertically, aligned with rows A through H.
 - Arrange Index 1 primer tubes (orange caps, yellow solution) horizontally, aligned with columns 1 through 12. For more information on index selection, see [Dual Indexing Principle](#), on page 23.

^A If no TruSeq Index Plate Fixture is available, arrange the Index adaptors in the same way, and individually pipette each adaptor into its corresponding well

Figure 2 TruSeq Index Plate Fixture



A Index 2 primers (white caps)
B Index 1 primers (orange caps)
C 96-well plate

- 3 Place the 96-well PCR plate with the 25 μ l of resuspended PCR product DNA in the TruSeq Index Plate Fixture.
 - a Add 5 μ l of each Index into its corresponding well.
- 4 Add 15 μ l NPM to each well containing index adaptors. Pipette to mix.
- 5 Centrifuge at 280 \times g at 20°C for 1 minute.
- 6 Cover the plate with Microseal 'A'.
- 7 Perform PCR on a thermal cycler using the following program:
 - 72°C for 3 minutes
 - 95°C for 30 seconds
 - 12 cycles of:
 - 95°C for 10 seconds
 - 55°C for 30 seconds
 - 72°C for 30 seconds
 - 72°C for 5 minutes
 - Hold at 10°C
- 8 If you choose to continue, proceed to PCR Clean-up 2.

SAFE STOPPING POINT If you do not immediately proceed to *Library Clean-Up* on page 21, seal plate with an adhesive seal and store it at 2° to 8°C for up to a week.

Library Clean-Up

This step uses AMPure XP beads to clean up the final library before quantification.

Consumables

Table 11. PCR Purification #2 Consumables

Item	Quantity	Storage
RSB (Resuspension Buffer)	52.5 μ l per sample	-15° to -25°C (after initial thaw, can keep at 2° to 8°C)
AMPure XP beads	90 μ l per 50 μ l of sample	2° to 8°C
Freshly Prepared 80% Ethanol (EtOH)	400 μ l per sample	Room temperature
96-well 0.2 ml PCR plate	1 plate	
[Optional] Microseal 'B' film		
96-well MIDI plate	1 plate	

Preparation

- Determine whether or not a plate transfer is necessary. If the PCR reaction volume multiplied by 2.8 exceeds the volume of the PCR plate, a transfer to a 300 μ l round bottom plate or a 1.2 ml deep-well plate is required.
- Thaw RSB at room temperature.
- Bring the AMPure XP beads to room temperature- wait at least 30 minutes.
- Once at room temperature, shake the Agencourt AMPure XP bottle to re-suspend any magnetic particles that may have settled. Ensure magnetic beads are well (evenly) distributed before adding them to samples.

NOTE: Proceed very cautiously during this procedure and take your time.

NOTE: 70% ethanol is hygroscopic. That is, when opened the ethanol will both evaporate and absorb water over time. Re-use eventually will be at a lower concentration. There is also miscibility involved with ethanol and water. For example, measuring out 70 mL of ethanol and topping off to 100 mL with water will generate ~65% ethanol. Measuring 80 mL ethanol and 20 mL water separately, then combining them will generate ~95 mL of 80% ethanol. Make sure to use molecular biology grade water (DNAse, RNAse and Protease free).

Procedure

- 1 Centrifuge the Library Amplification plate at 1,000 \times g at 20°C for 1 minute to collect condensation, carefully remove seal.
- 2 Using a multichannel pipette, transfer the entire 50 μ l of PCR product from the Library Amplification plate to the MIDI plate. Change tips between samples.

NOTE: Transfer the sample to a 96-well MIDI plate if planning to use a shaker for mixing. If mixing by pipette, the sample can remain in the 96-well PCR plate.

- 3 Gently shake the AMPure XP beads for 30 seconds to make sure that the beads are evenly dispersed. Add an appropriate volume of beads to a trough depending on the number of samples being processed and desired fragment selection.

Smaller amplicons in Nextera XT library preps typically yield smaller insert size ranges.

To maximize recovery of smaller fragments from the bead cleanup step, use the following conditions:

Input Size (bp)	AMPure XP Recommendation	AMPure XP Volume (µl)
< 300	1.8x AMPure XP	90
300-500	1.8x AMPure XP	90
> 500	0.6x AMPure XP	30
gDNA or other genomic input	0.6x AMPure XP	30

- 4 Using a multichannel pipette, add 90 µl of AMPure XP beads to each well of the Amplicon PCR plate. Change tips between columns.
- 5 Gently pipette entire volume up and down 10 times if using a 96-well PCR plate, or seal plate and shake at 1800 for 2 minutes if using a MIDI plate. Change tips after each column. The mixture should appear homogeneous.
- 6 Incubate the mixed samples at room temperature without shaking for 5 minutes.
- 7 Place the Library amplification plate on a magnetic stand for 2 minutes. WAIT for the solution to clear before proceeding.
- 8 With the Amplicon PCR plate on the magnetic stand, use a multichannel pipette to carefully remove and discard all the supernatant. Change tips between samples.
DO NOT disturb the ring of separated magnetic beads.
- 9 With the Library amplification plate on the magnetic stand, wash the beads with freshly prepared 80% ethanol as follows:
 - a Using a multichannel pipette, add 200 µl of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds at room temperature.
 - c Carefully remove and discard the ethanol.
Note: The beads are not drawn out easily when in alcohol, so it is not necessary to leave any supernatant behind.
- 10 With the Library amplification plate on the magnetic stand, perform a second ethanol wash as follows:
 - a Using a multichannel pipette, add 180 µl of freshly prepared 80% ethanol to each sample well.
 - b Incubate the plate on the magnetic stand for 30 seconds.
 - c Carefully remove and discard all the ethanol.
 - d Use a P20 multichannel pipette with fine pipette tips to remove excess ethanol.
- 11 With the Library amplification plate still on the magnetic stand, allow the beads to air-dry for 15 minutes.
 NOTE: make sure not to over dry the beads. Bead pellets will appear cracked if over dried.
- 12 Remove the Amplicon PCR plate from the magnetic stand. Using a multichannel pipette, add 52.5 µl RSB to each well of the Amplicon PCR plate.
- 13 Gently pipette mix up and down 10 times, or seal plate and shake at 1800 for 2 minutes if using a MIDI plate. Change tips after each column.
- 14 Incubate at room temperature for 2 minutes.
- 15 Place the plate back on the magnetic stand for 2 minutes or until the supernatant has cleared.
- 16 Using a multichannel pipette, carefully transfer 50 µl of the supernatant from the Library amplification plate to a new 96-well PCR plate. Change tips between samples to avoid cross-contamination.

SAFE STOPPING POINT

If you do not plan to proceed to **Library Clustering** on page 24, seal the plate with Microseal "B" adhesive seal. Store the plate at 15° to -25°C for up to a week.

Library Clustering

It is important to consider library size when preparing samples for cluster generation. Because the clustering process preferentially amplifies shorter libraries in a mixture of fragments, large libraries tend to cluster less efficiently than small libraries. The DNA concentration used for clustering can be adjusted to increase the cluster density of larger libraries. Consider table 1 below:

Library Denaturing and MiSeq Sample Loading

Table 1: Guidelines for Optimal Cluster Density*

Average Library Size	Conversion Factor	DNA Concentration for Cluster Generation
250 bp	1 ng/ μ L = 6 nM	6-12 pM
300 bp	1 ng/ μ L = 3 nM	6-12 pM
1,000-1,500 bp	1 ng/ μ L = 1.5 nM	12-20 pM

*The values presented here are approximations, and exact values determined for each experiment may differ from these guidelines. The guidelines presented are applicable to Nextera DNA libraries and Nextera XT libraries that have not been normalized.

Library Pooling, Quantification, and Normalization

This step requires three parts:

- Part I** Pool libraries
- Part II** Quantification of fragment size and concentration to determine library concentration in nM
- Part III** Diluting your final library in Resuspension Buffer (RSB) or fresh 10 mM Tris pH 8.5 to a 4 nM solution.

Part I: Pooling

Aliquot 5 μ l of diluted DNA from each library into a 1.5 microcentrifuge tube and mix aliquots for pooling libraries with unique indices. Depending on coverage needs, up to 384 libraries can be pooled for one MiSeq run.

Part II: Quantification

Illumina recommends quantifying your libraries using a fluorometric quantification method that uses dsDNA binding dyes.

- In order to determine the fragment size, this laboratory adopted the Agilent D5000 ScreenTape System Quick Guide protocol from Agilent Technologies.
- In order to determine the library concentration, this laboratory adopted the Qubit® dsDNA HS Assay Kits protocol from Life Technologies.

DNA Concentration in nM

After determining the fragment size and concentration of your pooled product, you will calculate the DNA concentration in nM, based on the size of DNA amplicons as determined by an Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer trace and concentration by Qubit:

$$(\text{concentration in ng}/\mu\text{l}) * (10^{-6}) / (660\text{g/mol}) * (\text{average library size}) = \text{concentration in nM}$$

For example:

$$(15 \text{ ng}/\mu\text{l}) * (10^{-6}) / (660\text{g/mol}) * (500\text{bp}) = 45 \text{ nM}$$

Part II (continued): Procedure for determining fragment size

Agilent Technologies Agilent D5000 ScreenTape System

This SOP format was adapted from the Agilent D5000 ScreenTape System Quick Guide protocol from Agilent Technologies.

Consumables

Table 12. TapeStation Consumables

Item	Quantity	Storage
Sample Buffer	10 μ l per sample	2° to 8°C
D5000 Ladder	1 μ l	2° to 8°C
ScreenTape	Holds 16 samples per tape	2° to 8°C

Prepare TapeStation System D5000

- Launch the 2200 TapeStation Controller Software.
- Load single D5000 ScreenTape device and loading tips into the 2200 TapeStation instrument.

Sample Preparation D5000 ScreenTape Assay

- 1 Allow reagents to equilibrate at room temperature for 30 minutes.
- 2 Vortex mix before use.
- 3 Prepare ladder by mixing 10 μ l D5000 Sample Buffer (green lid) with 1 μ l D5000 Ladder (yellow lid) in a tube strip.
- 4 Prepare sample by mixing 10 μ l D5000 Sample Buffer (green lid) with 1 μ l DNA sample in different tube strips.
- 5 Spin down, then vortex using IKA vortexer and adaptor at 2000 rpm for 1 minute.
- 6 Spin down to position the sample at the bottom of the tube.

Sample Analysis

- 1 Load samples into the 2200 TapeStation instrument.
- 2 Select the required samples on the 2200 TapeStation Controller Software.
- 3 Click Start and specify a filename with which to save your results.

SAFE STOPPING POINT

If you do not plan to proceed to Part II Qubit Fluorometer 3.0 dsDNA HS Assay on page 26, leave your sample in 4°C.

Part II (continued): Procedure for determining library concentration

Qubit Fluorometer 3.0 dsDNA HS Assay

This SOP format was adapted from the Qubit® dsDNA HS Assay Kits protocol from Life Technologies.

Consumables

Table 13. Qubit 3.0 Fluorometer Consumables

Item	Quantity	Storage
Qubit dsDNA HS Buffer	199 μ l per sample for working solution	Room temperature
Qubit dsDNA HS Reagent	1 μ l per 199 μ l of HS Buffer	Room temperature
Standard #1	10 μ l per use	2° to 8°C
Standard #2	10 μ l per use	2° to 8°C
Qubit™ Assay Tubes	1 per sample and 1 for each ladder	Room temperature

Before you begin

- The final volume in each tube must be 200 μ l.
- Each standard tube requires 190 μ l of Qubit working solution + 10 μ l of the standard
- Each sample tube requires anywhere from 180–199 μ l + the corresponding volume to complete the necessary 200 μ l
 - This laboratory uses 195 μ l working solution + 5 μ l of sample
- Careful pipetting is critical to ensure that the exact volume is added to the working solution—work SLOWLY
- Be sure to use a clean plastic tube each time you prepare Qubit working solution. Do not mix the working solution in a glass container

Procedure

Standard and Sample Preparation

- Prepare the tubes:
 - Set up two (2) 0.5-mL tubes for standards, and the required number of tubes for samples.

Note Use only the thin-wall, clear, 0.5-mL PCR tubes (described in Table 2 User-Supplied Consumables)
 - Label the tube lids—do not label the side of the tube as this could interfere with the sample read
- Prepare the Qubit working solution:
 - Prepare sufficient Qubit working solution to accommodate all standards and samples by diluting the Qubit dsDNA HS Reagent 1:200 in Qubit dsDNA HS Buffer.
 - 1 μ l Qubit dsDNA HS Reagent + 199 μ l Qubit dsDNA HS Buffer
 - For example, for 8 samples, prepare enough working solution for the samples and 2 standards: ~200 μ l per tube in 10 tubes yields 2 mL of working solution (10 μ l of Qubit reagent plus 1990 μ l of Qubit buffer).
- Prepare the standards:
 - Add 190 μ l of Qubit working solution to each of the tubes used for standards.
 - Add 10 μ l of each Qubit standard to the appropriate tube, then mix by vortexing 2–3 seconds. Be careful not to create bubbles.
- Prepare the samples:
 - Add Qubit working solution to individual assay tubes so that the final volume in each tube after adding the sample is 200 μ l.

Note Your sample can be anywhere from 1–20 μ l. Add a corresponding volume of Qubit working solution to each assay tube: anywhere from 180–199 μ l.

Working Solution Volume	199 μ l	195 μ l	190 μ l	185 μ l	180 μ l
Sample Volume	1 μ l	5 μ l	10 μ l	15 μ l	20 μ l

- b Add each sample to the assay tubes containing the correct volume of Qubit working solution, then mix by vortexing 2–3 seconds. The final volume in each tube should be 200 μ l.
- 5 Allow all tubes to incubate at room temperature for 2 minutes.

Standard and Sample Reading

- On the home screen of the Qubit 3.0 Fluorometer, select “dsDNA”, then “High Sensitivity”, and then “Read Standards.”
Note If you have already performed a calibration for the selected assay, the instrument prompts you to choose between reading new standards and running samples using the previous calibration. If you wish to use the previous calibration, disregard step 3 in the Standard and Sample Preparation step, and skip to step 4 below. Otherwise, continue with step 2 below.
- Insert the tube containing Standard #1 into the sample chamber, close the lid, and then press **Read standard**. When the reading is complete (~3 seconds), remove Standard #1.
- Insert the tube containing Standard #2 into the sample chamber, close the lid, and then press **Read standard**. When the reading is complete, remove Standard #2.
- Press **Run samples**.
- On the assay screen, select the sample volume and units using the + or – buttons on the wheel to select the sample volume added to the assay tube (from 1–20 μ l).
- From the dropdown menu, select the units for the output sample concentration (ng/ μ l).
- Insert a sample tube into the sample chamber, close the lid, and press **Read tube**. When the reading is complete (~3 seconds), remove the sample tube and repeat until all samples have been read.

Part III: Normalization

Dilute concentrated final library using Resuspension Buffer (RSB) or fresh 10 mM Tris pH 8.5 to 4 nM.

Example:

Given a calculated concentration of 45nM, use $C_1V_1=C_2V_2$ to calculate how much RSB and sample to mix to create a 4nM concentration:

$$45\text{nM}(V_1) = 4\text{nM}(20\ \mu\text{l})$$

$V_1 = 1.78\ \mu\text{l}$ of sample + 18.22 μl of RSB produces 20 μl of a 4nM concentration

SAFE STOPPING POINT

If you do not plan to proceed to *Library Denaturing and MISEq Sample Loading* on page 27, leave your sample in 4°C.

Library Denaturing and MiSeq Sample Loading

In preparation for cluster generation and sequencing, pooled libraries are denatured with NaOH, diluted with hybridization buffer, and then heat denatured before MiSeq sequencing. Each run must include a minimum of 5% PhiX to serve as an internal control for these low-diversity libraries. Illumina recommends using MiSeq v2 reagent kits for improved run metrics.

Consumables

Table 14. Library Denaturing and MiSeq Sample Loading Consumables

Item	Quantity	Storage
RSB (Resuspension Buffer)	6 μ l	-15° to -25°C
HT1 (Hybridization Buffer)	1540 μ l	-15° to -25°C
0.2 N NaOH (less than a week old)	10 μ l	Room temperature
200mM Tris-HCl pH7.0	5 μ l	Room temperature
PhiX Control Kit v3 (FC-110-3001)	2 μ l	-15° to -25°C
MiSeq v2 reagent cartridge	1 cartridge	-15° to -25°C
1.7 ml microcentrifuge tubes (screw cap recommended)	3 tubes	
2.5 L ice bucket		

Preparation

- Begin thawing the reagent cartridge and HT1 before denaturing and diluting libraries by placing them in a room temperature water bath for about an hour
 - Once thawed, store the cartridge and HT1 in the ice bucket until ready for sample loading.
- Obtain an ice bucket for your thawed cartridge, freshly made reagents, and sample.
- Check pH of the stock 1.0N NaOH and the resulting 0.2N NaOH dilution using pH reader.

Note CO₂ in the room will acidify NaOH over time. It is absolutely critical that the NaOH has a minimum pH >12.5.
- Prepare a **fresh** dilution of 0.2 N NaOH [this is a critical step; NaOH must be prepared fresh every time]
 - Using a 1000 μ l pipette, measure out 800 μ l of laboratory-grade water.
 - In a separate microcentrifuge tube, measure 200 μ l of stock 1.0N NaOH.
 - Combine the two volumes and then invert several times to mix

Note This results in a 1ml of 0.2N NaOH solution; the resulting solution cannot be stored and must be used within 6 hours

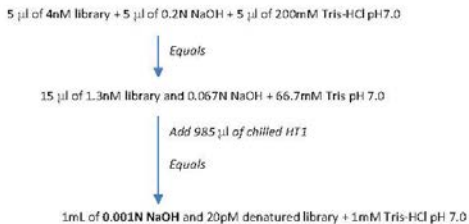
Note The final concentration of NaOH cannot exceed 0.001 (mM). Higher NaOH concentrations will inhibit library hybridization to the flow cell and result in very low cluster density.
- If you have not already done so, prepare a 200mM stock of Tris-HCl pH7.0 by combining 800 μ l of Laboratory-grade water and 200 μ l of Tris-HCl 1M.

Denature DNA

- Combine the following volumes of pooled final DNA library and freshly diluted 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube:
 - 4 nM pooled library (5 μ l)
 - 0.2 N NaOH (5 μ l)
- Set aside the remaining dilution of 0.2 N NaOH to prepare a PhiX control within the next 12 hours.
- Vortex briefly to mix the sample solution, and then centrifuge the sample solution at 280 \times g (or about 1500rpm) at 20°C for 1 minute.

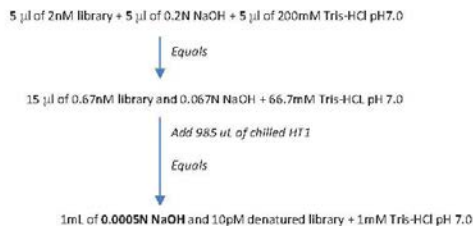
- 4 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the DNA into single strands.
- 5 To the 10 μ l of denatured library, add 5 μ l of 200mM Tris-HCl pH7.0 to neutralize the NaOH.
- 6 Add the following volume of pre-chilled HT1 to the tube containing denatured DNA:
 - Denatured DNA + Tris-HCl (15 μ l)
 - Pre-chilled HT1 (985 μ l)
 Adding the HT1 results in a 20 μ M denatured library in 1 mM NaOH.
- 7 Place the denatured DNA on Ice until you are ready to proceed to final dilution.

Quick Review/Guide for denaturing 4nM library:



NOTE: If you have to start with a lower concentration library, follow the below protocol for denaturing a 2nM library.

Quick Review/Guide for denaturing 2nM library:



Dilution chart for 10pM library:

Final Concentration	6pM	8pM	10pM
10pM denatured library	360 μ l	480 μ l	600 μ l
Pre-chilled HT1	240 μ l	120 μ l	0 μ l

Dilute Denatured DNA

- 1 Dilute the denatured DNA to the desired concentration using the following example:

NOTE

Illumina recommends targeting 1000–1200 K/mm² raw cluster densities using MiSeq v2 reagents.

Final Concentration	2pM	4pM	6pM	8pM	10pM	12pM	15pM	20 pM
20pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Pre-chilled HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- 2 Invert several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution.
- 3 Place the denatured and diluted DNA on ice.

Denature and Dilution of PhiX Control

Use the following instructions to denature and dilute the 10 nM PhiX library to the same loading concentration as the Amplicon library. The final library mixture must contain at least 5% PhiX.

- 1 Combine the following volumes to dilute the PhiX library to 4 nM:
 - 10 nM PhiX library (2 µl)
 - RSB (3 µl)
- 2 Combine the following volumes of 4 nM PhiX and 0.2 N NaOH in a microcentrifuge tube:
 - 4 nM PhiX library (5 µl)
 - 0.2 N NaOH (5 µl)
- 3 Vortex briefly to mix the 2 nM PhiX library solution.
- 4 Incubate for 5 minutes at room temperature to denature the PhiX library into single strands.
- 5 To the 10 µl of denatured library, add 5 µl of 200mM Tris-HCl pH7.0 to neutralize the NaOH.
- 6 Add the following volumes of pre-chilled HT1 to the tube containing denatured PhiX library to result in a 20 pM PhiX library:
 - Denatured PhiX library (15 µl)
 - Pre-chilled HT1 (985 µl)
- 7 Dilute the denatured 20 pM PhiX library to the same loading concentration as the Amplicon library as follows.

Final Concentration	2pM	4pM	6pM	8pM	10pM	12pM	15pM	20 pM
20pM denatured library	60 µl	120 µl	180 µl	240 µl	300 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Pre-chilled HT1	540 µl	480 µl	420 µl	360 µl	300 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- 8 Invert several times to mix and then pulse centrifuge the DNA solution.
- 9 Place the denatured and diluted PhiX on ice.

Combine Amplicon Library and PhiX Control

NOTE The recommended PhiX control spike-in of a 5% for low diversity libraries is possible with RTA v1.17.28 or later, which is bundled with MCS v2.2. For optimal performance, update to v3 software (MCS 2.3). If you are using an older version of the MiSeq software or sequencing these libraries on the GA or HiSeq, Illumina recommends using a 25% PhiX control spike-in.

- 1 Combine the following volumes of denatured PhiX control library and your denatured amplicon library in a microcentrifuge tube, which results in a 5% spike-in of PhiX:
 - Denatured and diluted PhiX control (30 µl)
 - Denatured and diluted amplicon library (570 µl)
- 2 Set the combined sample library and PhiX control aside on ice until you are ready to load the mixture into the MiSeq v2 reagent cartridge.
- 3 Invert the tube 1–2 times to mix and load all 600µl into the designated well in the cartridge.

Supporting Information

The protocols described in this guide assume that you are familiar with the contents of this section and have obtained all of the requisite equipment and consumables.

Acronyms

Table 15 Definitions and Acronyms

Acronym	Definition
PCR	Polymerase Chain Reaction—a technique used to amplify 1 to a few copies of a piece of DNA across several orders of magnitude, generating thousands to millions of copies of a single DNA strand
Primer	A strand of short nucleic acid sequences that serves as a starting point for DNA synthesis during PCR
Amplicon	A piece of amplified DNA that is the product of a PCR reaction

Dual Indexing Principle

The dual indexing strategy uses two 8 base indices, Index 1 (I₁) adjacent to the P₇ sequence, and Index 2 (I₂) adjacent to the P₅ sequence. Dual indexing is enabled by adding a unique Index 1 (I₁) and Index 2 (I₂) to each sample. The 96 sample Nextera XT Index Kit (FC-131-1002) uses 12 different Index 1 (I₁) adapters (N701–N712) and 8 different Index 2 (I₂) adapters (S501–S508). The 24 sample Nextera XT Index Kit (FC-131-1001) uses 6 different Index 1 (I₁) adapters (N701–N706) and 4 different Index 2 (I₂) adapters (S501–S504). In the index adapter name, the N or S refers to Nextera XT sample preparation, 7 or 5 refers to Index 1 (I₁) or Index 2 (I₂), respectively. The 01–12 refers to the index number. A list of index sequences is provided for generating sample sheets to demultiplex the samples:

Index 1 (I ₁)	Sequence	Index 2 (I ₂)	Sequence
N701	TAAGCGA	S501	TAGATCC
N702	CGTACTAG	S502	CTCTCTAT
N703	AGGCAGAA	S503	TATCCTCT
N704	TCCTGACC	S504	AGACTAGA
N705	CGACTCCT	S505	CTAAGGAG
N706	TAGGCATG	S506	ACTGCATA
N707	CTCTCTAC	S507	AAGACTA
N708	CAGAGAGG	S508	CTAAGCCT
N719	GCTACGCT		
N710	CGAGGCTG		
N711	AAGAGGCA		
N712	CTAGAGGA		

Low Plexity Pooling Guidelines

Illumina uses a green laser or LED to sequence G/T and a red laser or LED to sequence A/C. At each cycle, at least one of two nucleotides for each color channel are read to ensure proper registration. It is important to maintain color balance for each base of the Index read being sequenced, otherwise Index read sequencing could fail due to registration failure. If you choose the dual-indexed sequencing workflow, always use at least two unique and compatible barcodes for each Index (Index 1 and Index 2). The following tables illustrate possible pooling strategies:

Table 16 Libraries Pooled: 6 or fewer; Sequencing Workflow: Single Index

Plex	Index 1 (I1) Selection	Index 2 (I2) Selection
1-plex (no pooling)	Any Index 1 adapter	Any Index 2 adapter
2-plex	<ul style="list-style-type: none"> [option 1] N702 and N701 [option 2] N702 and N704 	
3-plex	<ul style="list-style-type: none"> [option 1] N701, N702, and N704 [option 2] N703, N705, and N706 	
4- or 5-plex	<ul style="list-style-type: none"> [option 1] N701, N702, N704, and any other Index 1 adapter [option 2] N703, N705, N706, and any other Index 1 adapter 	
6-plex	N701, N702, N703, N704, N705, and N706	

Table 17 Sequencing Workflow: Single or Dual Index

Plex	Index 1 (I1) Selection	Index 2 (I2) Selection
7–12 plex, Dual Index	<ul style="list-style-type: none"> [option 1] N701, N702, N704, and any other Index 1 adapter (as needed) [option 2] N703, N705, N706, and any other Index 1 adapter (as needed) 	<ul style="list-style-type: none"> [option 1] S501 and S502 [option 2] S503 and S504 [option 3] S505 and S506
7–12 plex, Single Index (96 sample Nextera Index adapter kit)	<ul style="list-style-type: none"> N701–N706 and any other Index 1 adapter (as needed) 	<ul style="list-style-type: none"> Any Index 2 (I2) adapter
Greater than 12-plex	N701, N702, N703, N704, N705, N706, and any other Index 1 adapter	<ul style="list-style-type: none"> [option 1] S501, S502, and any other Index 2 adapter (as needed) [option 2] S503, S504, and any other Index 2 adapter (as needed) [option 3] S505, S506, and any other Index 2 adapter (as needed)

These strategies represent only some of the acceptable combinations. Alternatively, check the real sequences of each index in the tables to make sure that each base position has a signal in both color channels for the Index read:

Good				Bad			
Index 1		Index 2		Index 1		Index 2	
705	GGACTCCT	503	TATCCTCT	705	GGACTCCT	502	CTCTCTAT
706	TAGGCATG	503	TATCCTCT	706	TAGGCATG	502	CTCTCTAT
701	TAAAGCGA	504	AGACTAGA	701	TAAAGCGA	503	TATCCTCT
702	CCTACTAG	504	AGACTAGA	702	CCTACTAG	503	TATCCTCT
	VVVVVVVV		VVVVVVVV		VVVVVVVV		VVVVXXXX

V=signal in both color

X=signal missing in one color channel

8 RINGRAZIAMENTI

Non posso esimermi dal ringraziare tutti coloro che hanno condiviso con me questi tre anni di dottorato.

Un particolare e sincero ringraziamento va innanzitutto al Dott. Carlo Severini, relatore, sostenitore, e valido riferimento scientifico ed umano per l'elaborazione e realizzazione di questa tesi di dottorato.

Il Prof. Stefano D'Amelio, coordinatore scientifico del corso di dottorato in Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica, ha sempre sostenuto le mie attività di ricerca con instancabile disponibilità. Grazie al suo supporto ho potuto arricchire il mio percorso formativo con straordinarie esperienze all'estero in prestigiosi istituti di ricerca.

Un affettuoso ringraziamento va poi alla Dott.ssa Michela Menegon, e alla Dott.ssa Edvige Perrotti, per la disponibilità accordatami, per il prezioso aiuto scientifico e per gli impagabili suggerimenti.

Ed ancora, desidero ringraziare la Dott.ssa Naomi Lucchi, il Dott. Udhayakumar Venkatachalam, il Dott. Eldin Talundzic, per avermi dato l'opportunità di trascorrere diversi mesi presso i laboratori del "Centres for Disease Control and Prevention" di Atlanta, USA. Un ringraziamento speciale va anche a tutto il team del laboratorio di malaria DPDM del CDC. Grazie a tutti voi per

la vostra accoglienza, amicizia e per i divertenti momenti trascorsi insieme.

I wish also to thank Dr. Naomi Lucchi, Dr. Udhayakumar Venkatachalam, Dr. Eldin Talundzic, for giving me the opportunity to spend several months at Centres for Disease Control and Prevention” of Atlanta, USA. A special thank goes also to all the members of the CDC-DPDM lab. Thank you all guys for your welcome, friendship and for the funny moments spent together.

Un sincero ringraziamento lo rivolgo anche al Prof. Umberto D’Alessandro, e a tutto il suo team per avermi ospitata per un mese presso i laboratori del Medical Research Council (MRC) Unit the Gambia, regalandomi la mia prima, quanto indelebile, esperienza in Africa.

Ultimi, ma non per importanza, i membri della mia straordinaria e numerosa famiglia: non avrei mai potuto concludere questo lavoro se non avessi avuto il vostro sostegno, il vostro affetto e la vostra pazienza, che mi ha incentivata anche nei momenti più duri.