

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

ROBERTO CARLOS REYES LECCA

INFECCAO ASSINTOMÁTICA SUBPATENTE POR *Plasmodium falciparum* NO  
MUNICÍPIO DO CAREIRO, ÁREA ENDÊMICA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.  
Área de Concentração – Clínica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador:

Prof. Dr. João Barberino Santos

Co-Orientador:

Prof. Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda

Brasília

2009

*A minha família, minha fortaleza:  
Aos meus amados pais, Luis e Elia, exemplos de vida em todo momento,  
Aos meus queridos sobrinhos, Luis Francisco, Ivanna e Gabriel.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por conduzir os meus passos durante minha vida.

Ao Dr. João Barberino Santos, pela orientação, paciência, dedicação e ensinamentos durante o Mestrado.

Ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, pela co-orientação na realização deste trabalho, assim como pelas facilidades outorgadas durante sua execução.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio concedido da bolsa para a realização do Mestrado.

À Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM) e ao Centro de Recerca de Salut Internacional de Barcelona, pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical (NTM) da Universidade de Brasília, pelo aprofundamento no conhecimento das doenças infecciosas e parasitárias desde a época do Curso de Especialização.

À equipe do trabalho de campo no Careiro durante o ano 2008:

Enfermeiras Sheila Vítor e Myrna Barata, pela distribuição de atividades na convivência diária.

Microscopistas Eliana Costa Lima e Iraílton Cruz dos Santos, pela ajuda na leitura das lâminas de gota espessa.

Agentes de saúde Detila Achão e Rosa Gomes Cavalcante, da localidade Panelão, e Maria Alexandre dos Santos, da localidade Castanho Sítio, pela incansável ajuda no seguimento da corte, especialmente pela coragem mostrada durante os deslocamentos de moto.

Agentes de combate às endemias, Juscelino Torres dos Santos, Arlan Damasceno de Freitas e André Souza dos Santos, pela colaboração na coleta de amostras, especialmente quando adoeci.

À Gerência de Endemias do Município do Careiro, representado pelo Sr. Nildo Cardoso Correia, pelas facilidades oferecidas à realização da pesquisa.

Ao Sr. Jubal Gonzaga Simões, pela revisão das lâminas de gota espessa e as orientações no armazenamento das mesmas. Obrigado pela sincera amizade.

Ao pessoal da Biologia Molecular da Gerência de Malária da FMT-AM, farmacêutica Cynthia Ferreira, biólogo Paulo Lima, técnicas Erecilda Araújo e Teresa Sanchez, e à aluna de iniciação científica Anne Almeida; pela ajuda na extração de DNA e pelo processamento da PCR.

Aos moradores das localidades Panelão e Castanho Sítio, pela participação, paciência e compreensão durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos e colegas peruanos da pós-graduação, Juan Cortez, César Carranza, Manuel Retamozo, Julia Ampuero e Joe Milton, por terem sempre me recebido de braços abertos em Brasília, e pelo apoio durante o Mestrado.

Aos meus amigos Omar Guevara e Tamam Pinheiro, pela moradia disponibilizada em Brasília e Manaus, respectivamente.

Às novas amigadas da Gerência de Malária da FMT-AM: André Siqueira, Gisele Cardoso, Kleyne Medeiros, Layla Rojas e Elcimar Neves.

Ao amigo e colega do mestrado, Dr. Anderzen Othon, pelas mil e uma proezas vividas durante a preparação das aulas da pós-graduação.

*O termo Careiro, que quer dizer "Caminho de Índio", originou-se da forte influência do Paraná do Careiro que, visto pelos pilotos das aeronaves, denominavam o rio como se fosse um grande caminho.*

### *Lenda do Careiro*

*Contam que um dia, Deus desceu à terra,  
E deslumbrado com tudo o que ela encerra  
Pensou em criar um novo Edem eterno...  
Cruzou de norte a sul, de leste a oeste,  
Visitou florestas, o pampa, o sertão agreste  
Atravessou verões, outono, primavera, inverno. . .  
Sentiu do sol o calor causticante,  
Da chuva, o refrigério suave e refrescante  
Do frio, a agulhada, pungente dolorosa...  
Do lírio, viu a brancura etérea, inimitável, pura,  
O cravo perfumado, a margarida cheia de candura  
O girassol, a violeta, a inebriante rosa...  
Quis então o Senhor de toda a Realeza,  
Juntar o que de mais belo encontrou na Natureza  
E situar as delícias em jardim fagueiro...  
Cobriu de bênçãos a terra dadivosa,  
Fê-la resplandecente, ubérrima, maravilhosa,  
Dotou-a de águas puras e a chamou Careiro.*

*(anônimo)*

## RESUMO

Embora a infecção por *P. falciparum* associa-se à forma grave da doença, a infecção assintomática por esta espécie traz vital importância tanto no aspecto imunológico quanto no epidemiológico. No entanto, os critérios utilizados na definição de infecção plasmodial assintomática na literatura têm variado quanto à metodologia empregada, sintomas avaliados e exames diagnósticos utilizados, dificultando o seu entendimento. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar a infecção subpatente assintomática por *P. falciparum* em residentes de área endêmica da Amazônia Brasileira, utilizando uma definição recentemente padronizada pela comunidade científica brasileira.

A pesquisa foi realizada em 773 residentes de duas localidades agrícolas do Município do Careiro, Estado do Amazonas, durante época de alta transmissão de malária. Em primeiro lugar, foi realizado um corte transversal para detecção de plasmódio em 642 (83,1%) participantes; 47 (7,4%) tiveram exame de gota espessa (GE) positiva (40 *P. vivax* e 7 *P. falciparum*). O exame de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real detectou *P. falciparum* em 152 (28,5%) de 533 resultados disponíveis; 11 deles também tiveram a PCR positiva para *P. vivax*. Em segundo lugar, constituiu-se uma coorte de 141 pessoas com infecção subpatente (detectada somente pela PCR) e exclusiva por *P. falciparum*, sendo incluídas para o seguimento 92 que cumpriam os seguintes critérios: idade maior a 5 anos, assintomática, sem antecedentes de malária no último mês, sem febre nas últimas 48 horas e sem doença clínica ou gravidez concomitante. O seguimento consistiu em avaliações clínica e laboratorial (GE e PCR) a cada 15 dias. A identificação de parasitos na GE foi indicação de tratamento antimalárico e fim do seguimento.

Quinze indivíduos não tiveram uma avaliação antes do dia 30 e foram excluídos da análise. Nos dias 30, 60 e 90 do seguimento, 28/77 (36,4%), 24/76 (31,6%) e 20/73 (27,4%) pessoas mantiveram-se assintomáticas. Até o dia 90, somente 2 pessoas assintomáticas tiveram nova PCR positiva para *P. falciparum*, sendo a GE sempre negativa para essa espécie. No grupo sintomático, 25 de 38 pessoas tiveram exames negativos no primeiro episódio sintomático até o dia 30.

Embora a acuidade na identificação de pessoas assintomáticas melhorasse com a ampliação do seguimento dos participantes com infecção subpatente por *P. falciparum*, a confirmação desta infecção, avaliada por meio da periodicidade de exames diagnósticos, foi rara. A ocorrência de infecção por *P. vivax* foi mais freqüente, independente do desenvolvimento de sintomatologia malárica. O desenvolvimento de sintomas não foi associado à presença do parasito.

Palavras chaves: malária, infecção assintomática, *Plasmodium falciparum*, portador assintomático, PCR

## ABSTRACT

Even if *P. falciparum* infection associates with severe clinical illness, asymptomatic infection by this specie has vital importance, both in immunologic and epidemiologic aspects. Moreover, criteria used regarding the definition of asymptomatic *Plasmodium* infection have varied in meaning of methodology, evaluated symptoms and diagnostic tests, making its comprehension difficult. The objective of this study was characterizing the sub-patent asymptomatic *P. falciparum* infection in inhabitants of an endemic area from Brazilian Amazon, using a definition recently standardized by the Brazilian scientific community.

The study was made in 773 inhabitants from two agricultural settlements, not riversides, in the Municipality of Careiro of Amazonas State, during high malaria transmission season. Firstly, a cross-sectional investigation for *Plasmodium* detection was carried out in 642 (83,1%) participants; 47 (7,4%) had blood thick smear positive (40 *P. vivax* and 7 *P. falciparum*). The real-time polymerase chain reaction (PCR) detected *P. falciparum* in 152 (28,5%) of 533 available results; 11 of these were also PCR positive for *P. vivax*. Secondly, a cohort of 141 people with sub-patent infection (detected only by PCR) and exclusive for *P. falciparum* was formed; 92 were included to the follow-up, according to these criteria: more than 5 years-old, asymptomatic, without history of malaria in the last month, without fever in the last 48 hours, and without simultaneous another active illness or pregnancy. The follow-up consisted in clinical and laboratorial (blood thick smear and PCR) evaluations in 15 day-intervals. Detection of parasites by the blood thick smear was indication for malaria treatment and end of the follow-up.

Fifteen people had not any evaluation before the day 30 and were excluded from the analysis. In the days 30, 60 and 90 of the follow-up, 28/77 (36,4%), 24/76 (31,6%) and 20/73 (27,4%) people remained asymptomatic. Until the day 90, only 2 asymptomatic individuals had new positive PCR for *P. falciparum*, while microscopy was always negative for this species. In the symptomatic group, 25 of 38 people had both exams negative in the first symptomatic event until the day 30.

Even though the accuracy in recognize asymptomatic people improved with the extension of the follow-up time, the confirmation of the *P. falciparum* sub-patent infection, evaluated by the periodicity of diagnostic exams, was infrequent. Occurrence of *P. vivax* infection was more frequent, independently of the development of malaria symptoms. Emergence of symptoms was not associated with the parasite presence.

Keywords: malaria, asymptomatic infection, *Plasmodium falciparum*, carrier, PCR.

## LISTA DE FIGURAS.

Figura 1– Áreas de risco para malária no Amazonas segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA), 2007. ....	17
Figura 2 – Número anual de exames realizados e positivos para malária e outros indicadores malariométricos no Município do Careiro-AM, Brasil, período de 2003 a 2008. ....	20
Figura 3 – Diagrama de controle de casos mensais de malária no período de 2003-2007 (média e intervalo de confiança) e no ano 2008, Careiro-AM, Brasil. ....	20
Figura 4 – Distribuição percentual da malária por faixa etária no Município do Careiro-AM, Brasil, 2007.....	21
Figura 5 – Distribuição percentual da parasitemia malárica no Município do Careiro-AM, Brasil, período de 2003 a 2008.....	22
Figura 6 – Tela de PCR em tempo real: emissão de fluorescência durante a amplificação. ....	27
Figura 7– Tela de PCR em tempo real com SYBR Green: determinação da temperatura de fusão (T <sub>m</sub> ).....	27
Figura 8 – Localização geográfica do Município do Careiro e das localidades de estudo. Estado do Amazonas (AM), Brasil.....	46
Figura 9 – Detalhe geográfico da localidade Panelão, Município do Careiro-AM, Brasil..	50
Figura 10 – Detalhe geográfico da localidade Castanho Sítio, Município do Careiro-AM, Brasil. ....	51
Figura 11 – Rio Castanho ao lado da sede (a) e estrada vicinal principal do Panelão (b)..	52
Figura 12 – Estrada BR- 319 no Castanho Sítio (a) e uma habitação típica da região (b)...	52
Figura 13 – Representação da lâmina com gota espessa utilizada no projeto.....	62
Figura 14 – Participação dos moradores durante o corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	67
Figura 15 – Resultado do exame da gota espessa durante o corte transversal em duas localidades do Município do Careiro-AM, Brasil, 2008. ....	68
Figura 16 – Resultados da PCR em 595 participantes com exame de GE negativo. ....	69
Figura 17 – Fluxograma da coorte do estudo.....	70
Figura 18 - Distribuição percentual de anemia por faixa etária na população participante do corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	75

Figura 19 – Distribuição percentual da PCR positiva para *P.falciparum* por faixa etária em indivíduos sem parasitos detectáveis na gota espessa. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

79

Figura 20 – Taxa de hemoglobina (Hb) segundo presença de infecção subpatente por *P. falciparum* (PCR P.f.) em área rural do Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....82

Figura 21 – Taxa de hemoglobina (Hb) segundo presença de infecção subpatente por *P. falciparum*, por localidade e sexo, em área rural do Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

82

Figura 22 – Exames diagnósticos de malária no dia 30 de seguimento de uma coorte assintomática com infecção basal subpatente por *P. falciparum*. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....86

Figura 23 – Exames diagnósticos de malária no primeiro episódio sintomático nos primeiros 30 dias de uma coorte sintomática com infecção basal subpatente por *P. falciparum*.

Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....87

Figura 24 – Probabilidade de permanecer livre de sintomas segundo o método de Kaplan-Meier, em 30 dias de seguimento de uma coorte com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....89

Figura 25 – Tempo de permanência livre de sintomas por faixa etária segundo o método de Kaplan-Meier, em 90 dias de seguimento de uma coorte com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008.....92

Figura 26 – Densidade parasitária em gota espessa para *Plasmodium spp.*, segundo o desfecho clínico de uma coorte com parasitemia subpatente de *P. falciparum*, em 90 dias de seguimento. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008.....93

Figura 27 – Coorte de indivíduos maiores de 5 anos de idade, com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*, assintomáticos durante o seguimento: evolução da PCR em tempo real. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008.....95

Figura 28 – Coorte de indivíduos maiores de 5 anos de idade, com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*, que desenvolveram sintomas no seguimento: evolução da PCR em tempo real. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008.....97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas da população do estudo, segundo os dados do censo, Município de Careiro-AM, Brasil, 2008.....	55
Tabela 2 – Características demográficas relativas à população participante do corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	72
Tabela 3 – Características epidemiológicas e clínicas relativas à população participante do corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	74
Tabela 4 – Características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos participantes do corte transversal segundo o resultado da gota espessa (GE). Município do Careiro-AM, Brasil, 2008	77
Tabela 5 – Características demográficas dos participantes do corte sem parasitemia patente, segundo o resultado da PCR para <i>P. falciparum</i> (P.f.). Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.	80
Tabela 6 – Características epidemiológicas e clínicas dos participantes do corte sem parasitemia patente, segundo o resultado da PCR para <i>P. falciparum</i> (P.f.). Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	81
Tabela 7 – Características epidemiológicas e clínicas de pessoas com infecção basal subpatente por <i>P. falciparum</i> segundo desenvolvimento de sintomas em 30 dias. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	85
Tabela 8 – Frequência dos sintomas no primeiro episódio segundo resultado da gota espessa (GE) dos indivíduos componentes da coorte sintomática no período de até 30 dias. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.....	88
Tabela 9– Tábua de tempo de permanência livre de sintomas e frequência de positividade da gota espessa (GE) nos episódios sintomáticos, de uma coorte de indivíduos com exame positivo de PCR para <i>P. falciparum</i> e sem parasitos detectados na GE, acompanhada por até 90 dias. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

AM	Estado do Amazonas
CQ	Cloroquina
DNA e cols.	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico) e colaboradores.
FMT-AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
FVS	Fundação de Vigilância em Saúde
GE	gota espessa
GEMEC	Gerência de Endemias do Município do Careiro
Hb	Hemoglobina
IBGE	Instituto Brasileiro de Estatística e Informática
IFA	Índice de Falciparum Anual
IPA	Incidência Parasitária Anual
MSP-1	Proteína de superfície do merozoíto 1
MSP-119	Proteína de superfície do merozoíto 119
OBIPA	Oficina sobre a infecção plasmodial assintomática
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
<i>P.f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.v.</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
<i>P.f./P.v.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> e <i>Plasmodium vivax</i>
QBC	Quantitative Buffy Coat
SIVEP	Sistema de Vigilância Epidemiológica
SUSAM	Sistema Único de Saúde do Amazonas

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<u>1. Introdução .....</u>	<u>16</u>
<u>0.1 Considerações iniciais.....</u>	<u>16</u>
<u>0.2 Aspectos epidemiológicos da malária no Estado do Amazonas.....</u>	<u>17</u>
<u>0.2.1 Aspectos epidemiológicos da malária no Município do Careiro (AM).....</u>	<u>19</u>
<u>0.3 Malária, sintomas e sinais.....</u>	<u>22</u>
<u>0.4 Métodos correntes de diagnóstico laboratorial e confiabilidade diagnóstica.....</u>	<u>23</u>
<u>0.4.1 Hemoscopia (microscopia).....</u>	<u>23</u>
<u>0.4.2 QBC® (Quantitative Buffy Coat).....</u>	<u>23</u>
<u>0.4.3 Métodos imunocromatográficos (testes rápidos).....</u>	<u>24</u>
<u>0.4.4 Testes sorológicos.....</u>	<u>25</u>
<u>0.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</u>	<u>25</u>
<u>0.4.6 Confiabilidade diagnóstica .....</u>	<u>29</u>
<u>0.5 Infecção assintomática por plasmódio.....</u>	<u>30</u>
<u>0.5.1 Dificuldades na caracterização do conceito.....</u>	<u>31</u>
<u>0.5.2 Fatores influenciadores do caráter assintomático.....</u>	<u>34</u>
<u>0.5.3 Prevalência .....</u>	<u>37</u>
<u>0.5.4 Importância clínico-epidemiológica.....</u>	<u>38</u>
<u>0.5.5 Importância para as ações de controle.....</u>	<u>38</u>
<u>0.6 Marco contextual da pesquisa.....</u>	<u>39</u>
<u>1 JUSTIFICATIVAS.....</u>	<u>41</u>
<u>2 OBJETIVOS.....</u>	<u>43</u>
<u>2.1 Objetivo Geral.....</u>	<u>43</u>
<u>2.2 Objetivos Específicos.....</u>	<u>43</u>
<u>3 METODOLOGIA.....</u>	<u>44</u>
<u>3.1 Tipo de estudo.....</u>	<u>44</u>
<u>3.2 Área e população do estudo.....</u>	<u>44</u>
<u>3.2.1 Área do estudo.....</u>	<u>44</u>
<u>3.2.2 Atividades de vigilância em malária.....</u>	<u>52</u>
<u>3.2.3 População do estudo.....</u>	<u>53</u>
<u>3.3 Participantes do estudo.....</u>	<u>56</u>
<u>3.4 Critérios de inclusão.....</u>	<u>56</u>
<u>3.5 Critérios de exclusão.....</u>	<u>57</u>
<u>3.6 Procedimentos na seleção dos participantes.....</u>	<u>58</u>
<u>3.7 Procedimentos no seguimento da coorte.....</u>	<u>60</u>
<u>3.8 Procedimentos de laboratório.....</u>	<u>62</u>
<u>3.8.1 Hemoscopia.....</u>	<u>62</u>
<u>3.8.2 PCR.....</u>	<u>63</u>

3.9 Análise dos dados.....	65
3.10 Considerações éticas.....	66
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Participantes do corte transversal.....	67
4.2 Resultados da microscopia no corte transversal.....	67
4.3 Formação da coorte do estudo.....	68
4.4 Primeira etapa da análise do estudo: análise do corte transversal.....	71
4.4.1 Características demográficas .....	71
4.4.2 Características epidemiológicas e clínicas .....	72
4.4.3 Exames laboratoriais específicos para o diagnóstico de malária .....	75
4.5 Segunda etapa da análise do estudo: análise do seguimento dos participantes por um período de até 30 dias.....	83
4.5.1 Características clínico-epidemiológicas segundo o desenvolvimento de sintomas... ..	84
4.5.2 Coorte sem desenvolvimento de sintomatologia.....	86
4.5.3 Coorte com desenvolvimento de sintomatologia.....	87
4.6 Terceira etapa da análise do estudo: análise do seguimento dos participantes por um período de até 90 dias.....	90
4.6.1 Tempo livre de sintomas .....	90
4.6.2 Resultados da GE .....	92
4.6.3 Resultados da PCR em tempo real.....	94
5 DISCUSSÃO.....	98
5.1 Corte transversal.....	98
5.1.1 Características epidemiológicas .....	98
5.1.2 Avaliação da malária segundo os resultados da GE .....	98
5.1.3 Infecção por <i>P. falciparum</i> segundo a PCR em tempo real .....	100
5.2 Seguimento da coorte.....	101
5.2.1 Infecção assintomática segundo a definição padronizada.....	101
5.2.2 Complexidade na avaliação de infecção assintomática.....	105
5.3 Limitações do trabalho.....	107
6 CONCLUSÕES .....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
APÊNDICE .....	112

## 1. INTRODUÇÃO

### 0.1 Considerações iniciais

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Plasmodium*, pertencente ao filo *Apicomplexa*, classe *Aconoidasida*, ordem *Haemosporida* e família *Plasmodiidae*. Quatro espécies infectam os humanos naturalmente: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*. Recentemente, tem sido descrita outra espécie de plasmódio como causador de malária em humanos no Sudeste Asiático: *P. knowlesi* (Cox-Singh e cols., 2008; Cox-Singh & Singh, 2008; White, 2008) O parasito é transmitido ao homem pela picada de fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Outras formas de transmissão, menos freqüentes, são através de transfusão de sangue, de material perfuro cortante e periparto.

A malária ainda é considerada como a mais importante endemia parasitária do mundo. A doença é endêmica em 109 países, sendo os mais afetados os situados na África Sub-Saariana, Sudeste Asiático e América Latina, particularmente na Bacia Amazônica. Estima-se que, em 2006, foram registrados 247 milhões de episódios de malária, 86% no Continente Africano, com altas prevalências de *P. falciparum*. Estima-se também que, no mesmo ano, ocorreram 881.000 mortes por malária, 91% no Continente Africano, e 85% destas, em crianças menores de 5 anos de idade (World Health Organization, 2008).

Fora da África, 80% dos episódios de malária ocorreram na Ásia. Na América Latina, onde predomina *P. vivax*, cinco países registram aproximadamente 80% dos casos na região: Brasil, Colômbia, Equador, Perú e Guatemala (World Health Organization, 2008).

## 0.2 Aspectos epidemiológicos da malária no Estado do Amazonas.

O Amazonas é um dos quatro estados responsáveis pela maioria de casos da Região Amazônica. A transmissão é cíclica e geralmente focal, alcançando picos principalmente após o período chuvoso do ano. Segundo a incidência parasitária anual (IPA), a maioria dos municípios que conformam o estado é de alto risco para malária (Figura 1).

A grande extensão geográfica do estado, as condições ambientais e climáticas favorecem o desenvolvimento dos vetores. Rios, igarapés e lagos são grandes facilitadores da transmissão da doença, junto com as enchentes e vazantes, que determinam a formação de criadouros temporários de vetores. A temperatura média no verão, entre 28° e 29°C, favorece o aumento da densidade vetorial e o desenvolvimento dos plasmódios nos vetores.

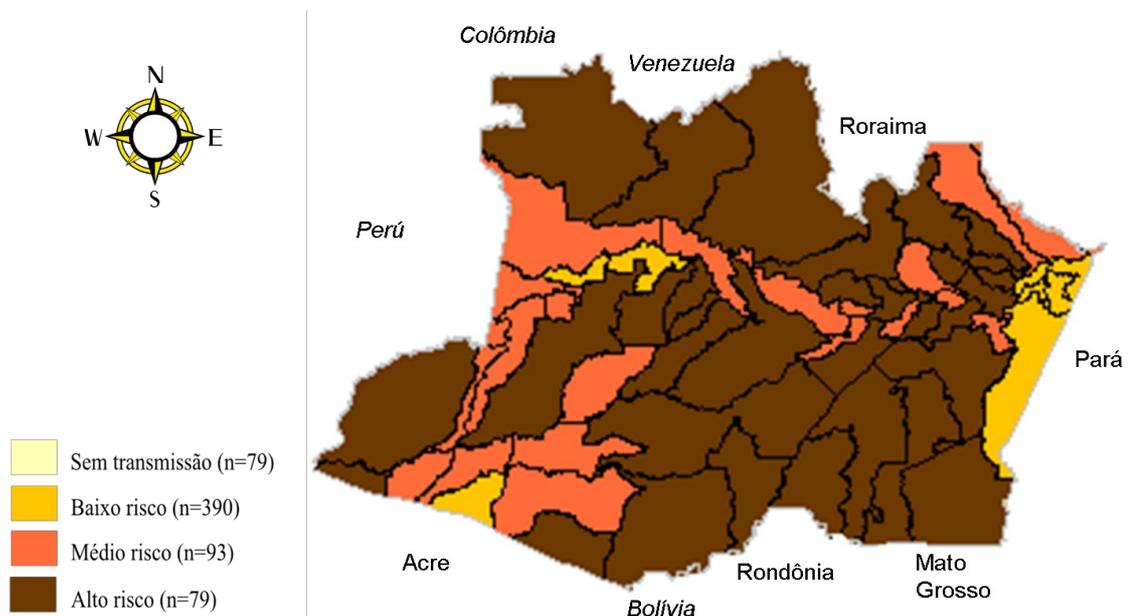


Figura 1– Áreas de risco para malária no Amazonas segundo a Incidência Parasitária Anual (IPA), 2007.

Fonte: adaptado de SIVEP/Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.

Por outro lado, fatores socioeconômicos, como a difícil acessibilidade aos serviços de saúde, a pobreza, o tipo de casa sem paredes das áreas rurais, e as dificuldades logísticas na execução das medidas de combate, dificultam o controle da endemia.

Segundo dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica da Malária do Brasil, SIVEP/Malária, nos últimos anos, o atendimento aos pacientes vem melhorando, refletindo-se no tempo de início do tratamento: em 2003, 43% das pessoas iniciavam o tratamento até em 48 horas após o início dos sintomas, e em 2008, foram 53% (Brasil. Ministério da Saúde, 2008).

A história epidemiológica da malária no estado mostra épocas de elevada incidência de casos coincidindo com ocupação desordenada da região. Destaca-se a epidemia de 2003, que duplicou o número de casos em um ano (141.005), e em 2005, triplicou-o (226.413). Em 2003, Manaus, a capital do Estado do Amazonas, registrou 48% dos casos do estado, sendo atribuídos à intensa migração humana de áreas altamente endêmicas para a capital, atraída pelas oportunidades econômicas.

De acordo com os dados do SIVEP/Malária, no período 2003 - 2007, a média de proporção de lâminas positivas no Amazonas foi 20,6%, mas em 2008, sofreu uma queda considerável, 12,2%, acompanhando a tendência nacional. Mesmo sendo um pólo turístico, os casos autóctones representaram mais de 99%. A média da proporção de lâminas positivas de verificação de cura foi 20,6% e, da IPA, 56,5/1000 habitantes. Crianças até os 10 anos de idade conformaram em média 25% dos casos, diminuindo o percentual progressivamente com a idade (Brasil. Ministério da Saúde, 2008).

Desde o final da década de 1980, os casos de malária *falciparum* mostraram tendência descendente enquanto que os casos de malária *vivax*, ascendente. Isto provavelmente deveu-se ao tratamento mais efetivo contra a malária *falciparum*, com a introdução da mefloquina e de outras drogas eficazes, como os derivados da artemisinina, além das medidas de controle vetorial da doença. Atualmente, a malária no Amazonas é causada basicamente por duas espécies: *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo o tratamento padronizado com cloroquina e primaquina para a primeira e a associação de lumefantrina e artemether para a segunda.

A malária grave no Estado de Amazonas é infreqüente, em parte pela baixa incidência de *P. falciparum* e pela situação de semi-imunidade inerente aos nativos, mas, também, pela relativa facilidade de acesso aos serviços de saúde atualmente.

Isto se reflete no percentual de internações por malária, que, de acordo com o Ministério de Saúde, nos anos de 2007 e 2008 manteve-se em 0,5%, e na parasitemia ao diagnóstico, a qual em 70% dos casos tem sido menor a 500 parasitos/mm<sup>3</sup> (Brasil. Ministério da Saúde, 2008).

### **0.2.1 Aspectos epidemiológicos da malária no Município do Careiro (AM).**

Informações do SIVEP/Malária indicam que, no último quinquênio, o Município do Careiro apresentou uma curva bifásica de casos de malária. A partir do ano 2003 o número de casos aumentou dramaticamente, de 4.148 a 14.773 em 2005 (ano da maior epidemia de malária em Manaus), ou seja, um incremento de mais de 3 vezes. As ações de vigilância foram intensificadas e houve um importante impacto na transmissão da malária. No período de 2005 a 2007, manteve-se o número de exames realizados (40,6 mil como média anual), mas houve uma diminuição do número de exames positivos ao final do período. Em 2008, o número de exames realizados decresceu para 30% e a positividade para 45%, em relação a 2007 (Figura 2). A proporção de lâminas positivas por 100 lâminas examinadas caiu de 30,8 em 2003 para 15,8 em 2008 (Brasil. Ministério da Saúde, 2008).

A IPA também diminuiu no final do período, porém esteve sempre acima de 50/1.000 habitantes, mostrando que a área continuou sendo de alto risco de transmissão para a malária segundo critérios do Ministério da Saúde. A espécie predominante foi *P. vivax* em todo o município. A proporção de casos positivos para *P. falciparum* diminuiu de 31,0 em 2003 para 18,2 em 2007, mantendo-se em 18,8 em 2008. A participação percentual das infecções mistas esteve em torno de 1%. Não se registraram casos por *P. malariae* (Figura 2).

No referido período de 2003 – 2007, houve uma tendência à sazonalidade para a incidência da doença. A maioria dos casos anuais foi notificada durante o período de maio a setembro (Figura 3). Isto coincide com o final da estação chuvosa, que compreende o intervalo de tempo de novembro a abril, com ponto máximo da cheia fluvial em junho (Instituto Nacional de Meteorologia).

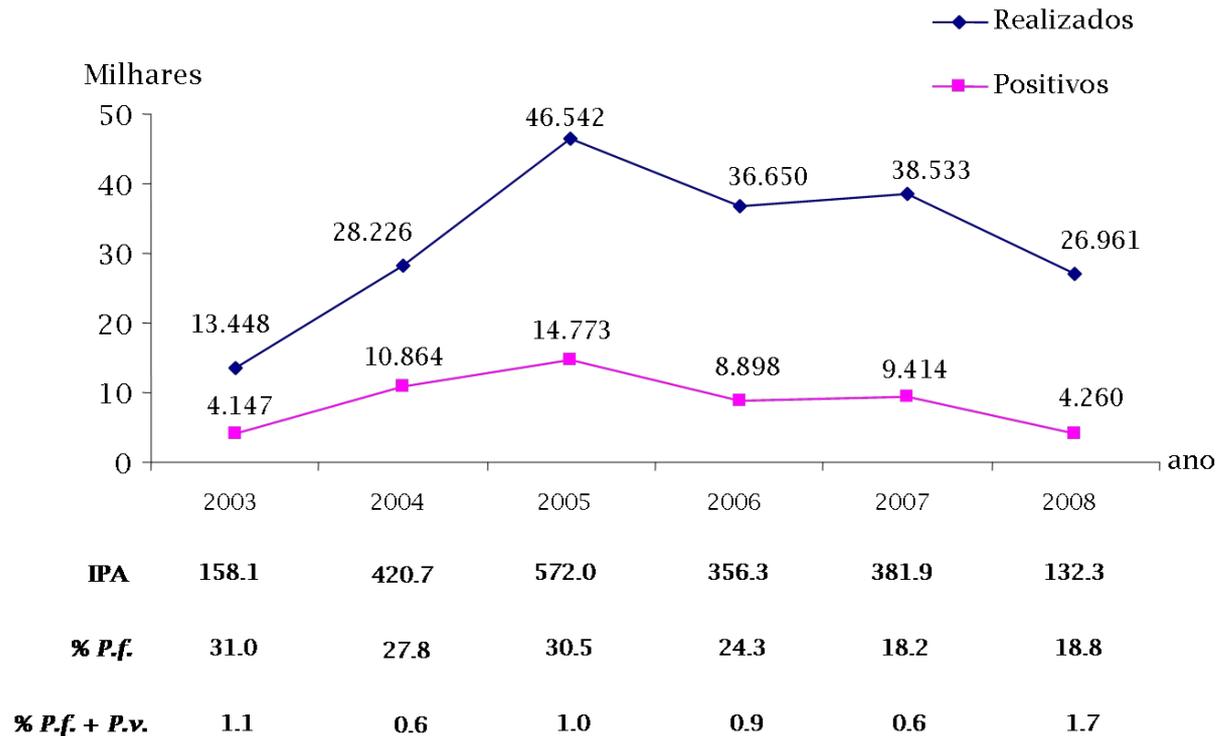


Figura 2 – Número anual de exames realizados e positivos para malária e outros indicadores malariométricos no Município do Careiro-AM, Brasil, período de 2003 a 2008.

IPA, Incidência Parasitária Anual; %*P.f.*, proporção de infecções por *P. falciparum*, %*P.f.* + *P.v.*, proporção de infecções mistas.

Fonte: SIVEP/Malária. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.

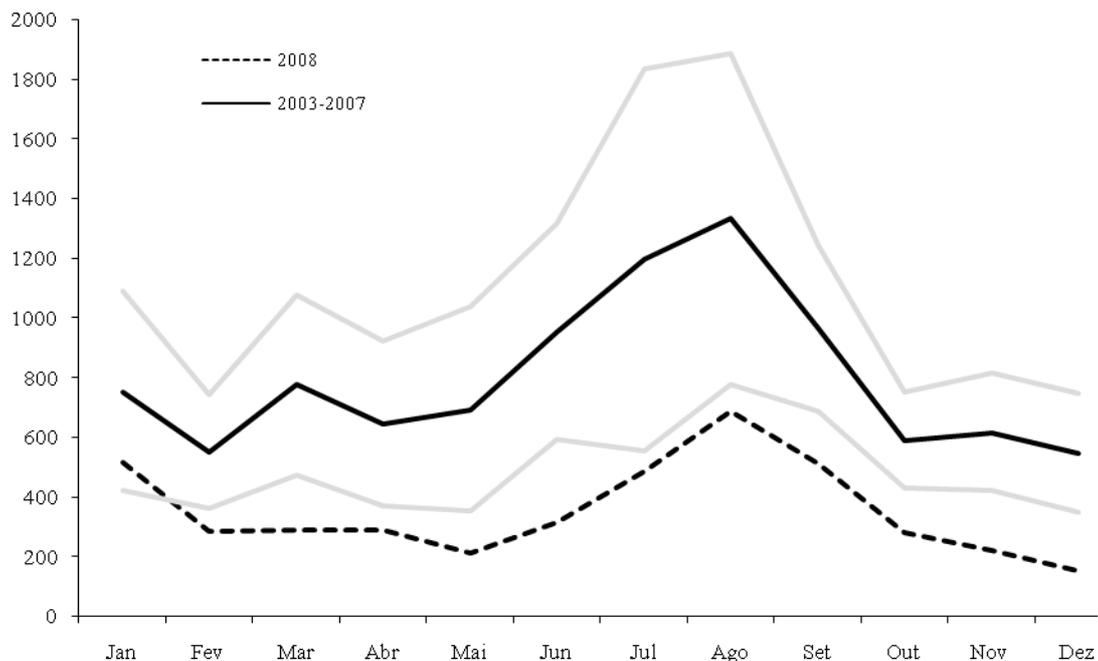


Figura 3 – Diagrama de controle de casos mensais de malária no período de 2003-2007 (média e intervalo de confiança) e no ano 2008, Careiro-AM, Brasil.

Fonte: SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.

Segundo o SIVEP/Malária, a distribuição de exames positivos por faixa etária em 2007 mostrou, em termos gerais, que a maioria dos pacientes tinha entre 5 e 14 anos (27,8%) ou entre 15 e 29 anos (26,0%). As crianças menores de 5 anos foram o terceiro grupo em frequência (13,7%), e a partir dos 30 anos, a frequência foi progressivamente menor. Nota-se que a malária no Município do Careiro atinge principalmente a população escolar e a classe jovem trabalhadora que, em conjunto, representam o potencial de desenvolvimento econômico do município a curto e médio prazo (Figura 4).

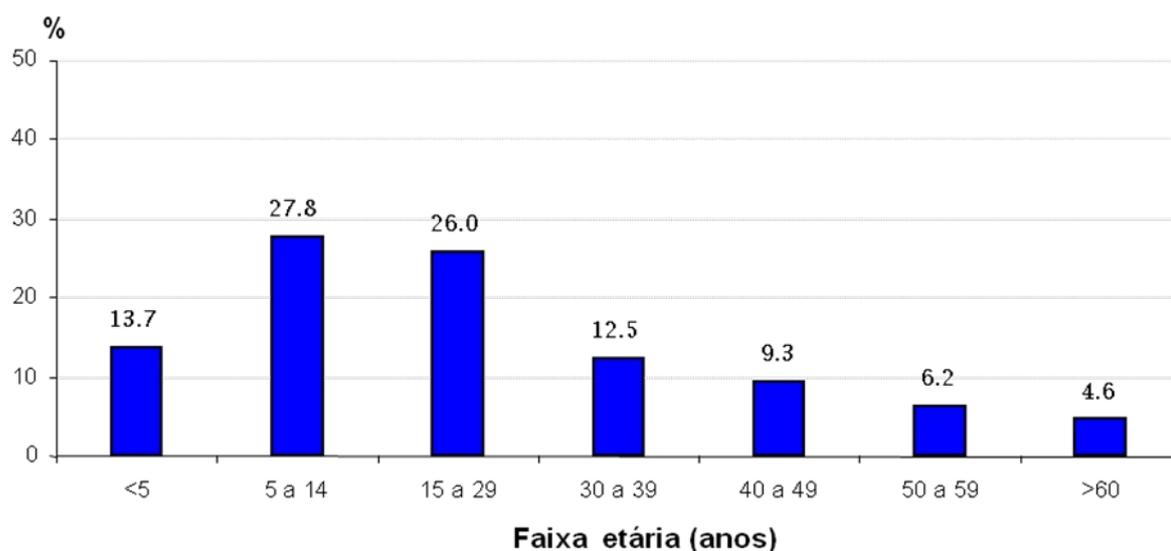


Figura 4 – Distribuição percentual da malária por faixa etária no Município do Careiro-AM, Brasil, 2007.

Fonte: SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

Similarmente à situação do estado, a malária grave no município é infreqüente. Isto é favorecido pela baixa incidência de malária falciparum, pela possível imunidade da população e pela relativa facilidade de acesso ao diagnóstico e tratamento. No período de 2003 a 2007, nota-se que o tratamento antimalárico começou a ser administrado nas primeiras 48 horas depois do início dos sintomas, em uma média anual de 64,7% dos casos notificados (SIVEP/Malária, Ministério de Saúde). Isto se reflete na parasitemia dos casos notificados que, nesse mesmo período, foi predominantemente baixa: pelo menos 60% dos casos registrados tiveram parasitemia equivalente a 301 – 500 parasitos/mm<sup>3</sup> (Figura 5).

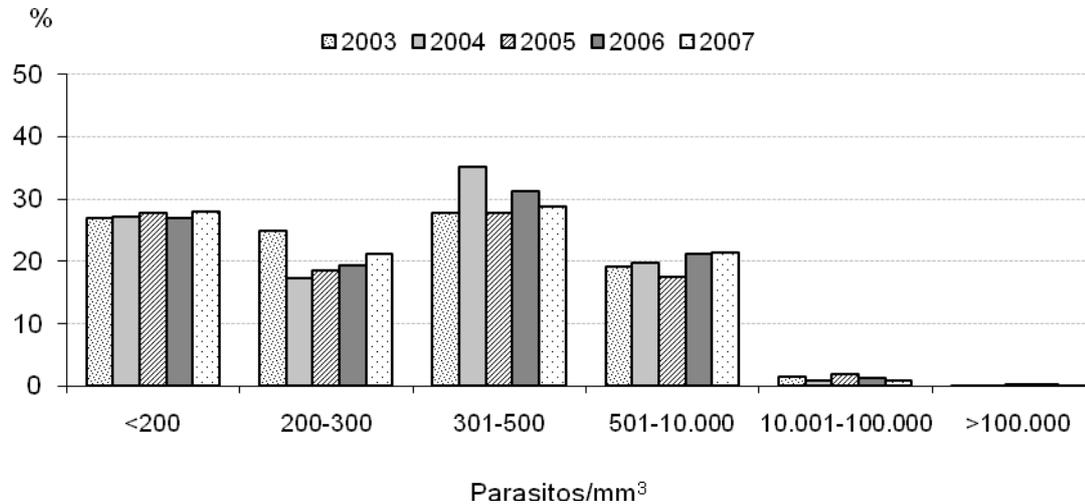


Figura 5 – Distribuição percentual da parasitemia malárica no Município do Careiro-AM, Brasil, período de 2003 a 2008.

Fonte: SIVEP/Malária, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

### 0.3 Malária, sintomas e sinais.

Classicamente, a malária se descreve como uma doença aguda febril intermitente, que em ocasiões pode produzir quadros graves com risco de morte, geralmente associadas à infecção por *P. falciparum*. Os sintomas são diversos e alguns inespecíficos: calafrios, elevação da temperatura, sudorese, cefaléia, mialgias, artralgias, dor abdominal, vômitos, lombalgia, e astenia.

Os sintomas capitais são calafrios, elevação da temperatura e cefaléia. Frequentemente, em algumas áreas endêmicas, a presença de febre já foi considerada como sinônimo de malária, e utilizada como parâmetro para se oferecer tratamento específico (Bassett e cols., 1991; Trape e cols., 1985). No entanto, a ausência de febre não rejeita a suspeita diagnóstica, como tem sido observado na área rural da Amazônia Brasileira, onde 19% dos episódios clínicos de malária foram afebris (da Silva-Nunes & Ferreira, 2007).

A mudança no espectro clínico da doença estaria modulada pela imunidade naturalmente adquirida, a carga e virulência parasitárias, e pela idade e fatores genéticos do paciente. Assim, os ataques de malária podem apresentar-se com menor frequência e/ou intensidade de sintomas (Alves, J. e cols., 2006; da Silva-Nunes & Ferreira, 2007), fazendo da sintomatologia um critério diagnóstico pouco sensível (Trape e cols., 1985).

#### **0.4 Métodos correntes de diagnóstico laboratorial e confiabilidade diagnóstica**

Para a confirmação da suspeita de malária é requerida a demonstração do parasito ou de seus componentes, em uma amostra de sangue do paciente. Atualmente, dispõe-se de vários métodos para o diagnóstico laboratorial de malária:

##### **0.4.1 Hemoscopia (microscopia)**

É o método diagnóstico rotineiro nos estabelecimentos de saúde. Consiste na visualização direta (leitura) do plasmódio em amostras de sangue coletadas em lâmina de vidro. Para isto, utiliza-se um microscópio com aumento de 1000X. A amostra de sangue pode ser preparada em forma de gota espessa (GE) e/ou esfregaço, e, depois de seca, corada pelo método de Giemsa ou de Walker. O resultado pode ser obtido, em média, a partir de 30 minutos depois da coleta. O método exige pessoal treinado e experiente, especialmente na leitura, para o reconhecimento das espécies.

##### **0.4.2 QBC® (*Quantitative Buffy Coat*)**

Este método de microscopia de fluorescência baseia-se na produção de uma gradiente de densidade e expansão mecânica das hemácias dentro de um tubo de micro-hematócrito. Utilizando um microscópio de luz ultravioleta, podem ser

observados parasitos fluorescentes dentro de eritrócitos não fluorescentes. O método é de fácil exeqüibilidade, interpretação e dura apenas dez minutos. Contudo, precisa de instrumentos especiais, além de muita experiência para distinguir as espécies de plasmódios (Moody, 2002).

#### **0.4.3 Métodos imunocromatográficos (testes rápidos)**

Os métodos imunocromatográficos detectam proteínas do parasito em eritrócitos lisados, empregando-se diferentes tipos de anticorpos mono ou policlonais. Na maioria das vezes, trata-se de expor uma gota de sangue a anticorpos dirigidos contra antígenos parasitários alvos. São testes de fácil execução no campo, realizados em 15 minutos, e a interpretação do resultado independe do observador. Porém, têm reduzida sensibilidade em casos de baixas parasitemias, não quantificam a densidade da infecção e o seu custo é superior ao de uma GE (Moody, 2002).

Os testes rápidos mais conhecidos são:

- **ParaSight** ® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) e **ICT P.f.** (Amrad-ICT, Sydney, Australia), ambas detectam a proteína 2 rica em histidina dos estágios assexuados e gametócitos jovens de *P. falciparum* (PfHRP2). Não detectam infecções mistas ou causadas por outras espécies. Como o antígeno pode persistir no sangue durante 28 dias depois do *clearance* das formas assexuadas provocado pelo tratamento, resultados falsos positivos podem aparecer (Shiff e cols., 1993). A presença do fator reumatóide no sangue do paciente também pode acusar um resultado falso positivo.
- **ICT Pf/Pv** (Amrad-ICT), detecta a PfHRP2 e outro antígeno expressado por todas as espécies de plasmódio. Não detecta infecções mistas.
- **Optimal** ® (Flow Inc. Portland, OR), detecta a lactato desidrogenase específica de *Plasmodium* (pLDH). Esta enzima intracelular, produzida somente pelo parasito vivo, é expressa por estágios assexuados e sexuados, sendo uma específica para *P. falciparum* e outra gênero específica. Permite diferenciar o diagnóstico de malária

por *P. falciparum* e por outras espécies, embora não identifique infecções mistas. É capaz de indicar infecção atual.

#### **0.4.4 Testes sorológicos.**

O estudo da resposta imunológica na malária tem permitido a descoberta de anticorpos específicos, tanto para as diferentes espécies de *Plasmodium* quanto para os diferentes estágios do parasito no homem. Contudo, essa resposta imunológica depende, entre outros fatores, do nível de exposição aos antígenos do parasito. Assim, é provável que os residentes em áreas endêmicas de malária tenham anticorpos circulantes ainda sem ter infecção concorrente. Também é provável que os imigrantes de uma área endêmica, quando infectados e tratados rapidamente, não desenvolvam uma imunidade adquirida adequada. Portanto, a detecção de anticorpos contra *Plasmodium* não é um método adequado para o diagnóstico clínico da doença.

#### **0.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Com o conhecimento do genoma das espécies de *Plasmodium* que parasitam o ser humano, técnicas de detecção de DNA do parasito puderam ser desenvolvidas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*). Com esta técnica é possível estudar a variabilidade genética das espécies, permitindo a distinção entre re-infecções, recaídas ou recrudescências, assim como a avaliação genética da resistência aos fármacos antimaláricos. A PCR pode detectar parasitemias muito baixas quando comparada com a GE (Alves, F. P. e cols., 2005; Di Santi e cols., 2004; Gama e cols., 2007), revelando infecções mistas não detectadas pela hemoscopia (Brown e cols., 1992; Snounou e cols., 1993a).

A eficácia é melhorada quando se aplica a técnica de PCR *nested* (aninhado), que realiza duas amplificações do DNA de interesse: o produto da primeira reação é utilizado como molde (*template*) na segunda amplificação (Snounou e cols., 1993b), facilitando a amplificação do produto e sua visualização nas placas de eletroforese. No entanto, esta técnica deve ser realizada em laboratórios de alta complexidade,

demanda um tempo considerável e tem risco de contaminação de amostras durante a passagem da primeira à segunda reação.

Ultimamente, desenvolveu-se a técnica de PCR em tempo real (*Real-Time PCR*), a qual se diferencia de outras técnicas em biologia molecular por precisar de uma simples reação de amplificação e utiliza um sistema de amplificação fechado em vez da análise externa. Portanto, com esta técnica pode-se obter resultados mais rápidos e com menor risco de contaminação do que com as técnicas PCR convencionais. Ademais, com a PCR em tempo real, os resultados obtidos, além de qualitativos, podem ser quantificados, permitindo assim o cálculo de parasitos por unidade de volume (Costa, 2004; Higuchi e cols., 1993; Veron e cols., 2009).

Termos como PCR de ciclo rápido, PCR homogênea e PCR cinética são sinônimos da PCR em tempo real. A técnica combina as reações químicas da PCR convencional com a detecção de fluorescência do produto amplificado na mesma reação. Em geral, a técnica baseia-se na interação de dois elementos: um elemento emissor de fluorescência (fluoróforo) e um elemento receptor (*quencher*).

Um método de detecção de ácido nucléico usado na PCR em tempo real é o SYBR Green, que detecta a acumulação de qualquer produto de DNA de dupla cadeia. O SYBR Green provê sensibilidade, mas não é específico. É usado para determinar a temperatura de fusão (*melting temperature, T<sub>m</sub>*) do produto de amplificação, permitindo a identificação de diferentes fragmentos baseados no percentual de G+C e na sua longitude. É o fluoróforo que emite fluorescência quando se une ao DNA de dupla cadeia ou ao produto amplificado pelos iniciadores da PCR (*primers*). Em cada ciclo de amplificação, duplica-se o produto desejado, formando-se mais DNA de dupla cadeia, e, portanto, mais fluorescência emitida.

A amplificação do DNA e a captura da fluorescência são realizadas no mesmo aparelho termociclador. A quantidade de fluorescência emitida é mostrada em um computador, representada graficamente por uma curva. Se o DNA da amostra contém uma seqüência complementar ao *primer* utilizado, aparecerá uma curva de fluorescência ciclos antes ou depois que a do controle positivo, dependendo da maior ou menor quantidade de DNA alvo na amostra, respectivamente (Figura 6).



Figura 6 – Tela de PCR em tempo real: emissão de fluorescência durante a amplificação. A curva de amplificação do controle positivo (linhas verde claro e vermelha) iniciou no ciclo 21 da amplificação. As amostras testadas amplificaram a partir dos ciclos 27 a 29, indicando menor quantidade de DNA alvo.

No caso do SYBR Green, é preciso determinar se a  $T_m$  da amostra testada é a mesma que a do controle, para ter certeza que ambos são o mesmo produto; se não for o caso, então se trata de alguma outra seqüência de DNA que formou dupla cadeia, como DNA humano ou o próprio *primer* quando está em excesso (Figura 7).

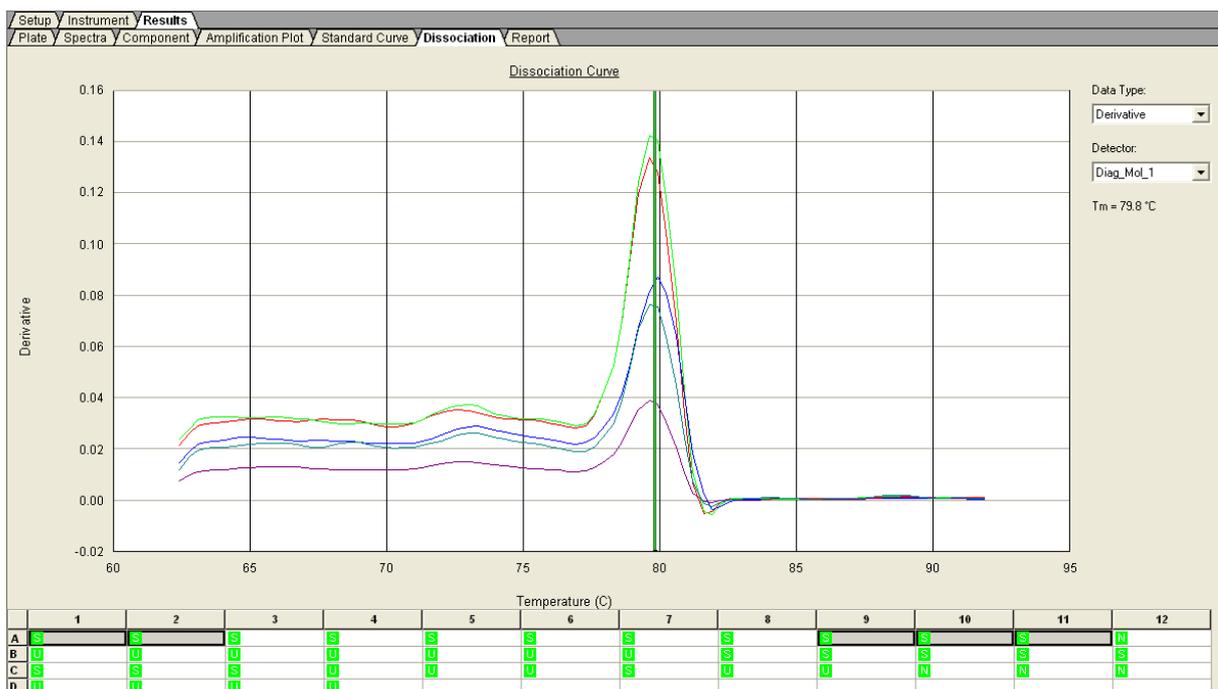


Figura 7– Tela de PCR em tempo real com SYBR Green: determinação da temperatura de fusão ( $T_m$ ) A  $T_m$  do controle positivo (linhas verde claro e vermelha) foi  $79,8^\circ\text{C}$ . Todas as amostras testadas mostram igual  $T_m$ , portanto, contem a seqüência de DNA alvo.

Outros métodos mais específicos são os que usam sondas de hibridação. Entre as mais conhecidas temos: as sondas 5' nuclease (TaqMan), as *molecular beacons*, e as sondas de hibridação que transferem energia ressonante fluorescente (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*). Estes métodos baseiam-se na união ou separação de uma molécula fluorófora e uma molécula *quencher*, que faz com que se emita mais ou menos fluorescência. São mais específicos porque as sondas de hibridação vão se unir unicamente às seqüências para as quais foram criadas (Costa, 2004; Espy e cols., 2006; Perandin e cols., 2004; Rougemont e cols., 2004; Swan e cols., 2005).

O sucesso de uma reação de PCR depende de vários fatores, entre eles o tipo de coleta de amostras, as condições de armazenamento e o método de extração de DNA a partir da amostra.

Quando comparado com a hemoscopia, os estudos mostram que a PCR de amostras de sangue coletadas em papel de filtro tem alta sensibilidade na detecção de seqüências do DNA de plasmódio e não precisam ser refrigeradas (Long e cols., 1995; Singh e cols., 1999; Singh e cols., 1996).

Farnert e cols. compararam amostras de sangue coletadas em papel de filtro com as coletadas em tubo e congeladas imediatamente. Concluíram que, o papel de filtro perdeu entre 10 a 100 vezes a sensibilidade na detecção de plasmódios na PCR, especialmente quando o papel era armazenado por 30 dias a alta temperatura e umidade (Farnert e cols., 1999).

Chorattanakawee e cols. realizaram PCR em amostras armazenadas em papel de filtro que eram positivas para *P. falciparum* na hemoscopia, e observaram que o longo tempo de armazenamento (até 4 anos) não afetou a sensibilidade da PCR (Chorattanakawee e cols., 2003).

Veron e cols. mostraram que as tiras reagentes positivas dos testes rápidos podem ser utilizadas para PCR em forma satisfatória, sem precisar de condições especiais de armazenamento e com menor risco de contaminação (Veron & Carme, 2006).

Diversos métodos de extração de DNA a partir de diferentes tipos de amostras têm sido testados. Dentre deles, o método de fenol-clorofórmio, embora dispendioso, tem se mostrado tão efetivo quanto os kits comerciais (Ekala e cols., 2000; Fugikaha e cols., 2007; Veron & Carme, 2006) e tem sido usado em pesquisas no Brasil (Suarez-Mutis e cols., 2007; Tada e cols., 2007).

No estudo da malária, a PCR em tempo real vem sendo aplicada na detecção de seqüências de DNA de plasmódio em pacientes com episódios sintomáticos (Farcas e cols., 2004; Gama e cols., 2007; Mangold e cols., 2005; Perandin e cols., 2004; Rougemont e cols., 2004), no monitoramento da resistência ao tratamento (Ferreira e cols., 2006; Wilson e cols., 2005), assim como na avaliação de vacinas (Andrews e cols., 2005). Todos mostram a capacidade de detecção de baixas parasitemias. Também têm surgido técnicas que permitem detectar, em um só procedimento, as quatro espécies infectantes do homem, facilitando assim a compreensão da dinâmica das infecções mistas (Elsayed e cols., 2006; Farcas e cols., 2004; Lee e cols., 2002; Shokoples e cols., 2009; Veron e cols., 2009).

#### **0.4.6 Confiabilidade diagnóstica**

A sensibilidade que um microscopista experiente pode alcançar no exame da GE é aproximadamente 50 parasitos/ $\mu$ L de sangue, ou 0,001% de hemácias infectadas. Na rotina, a sensibilidade da maioria dos microscopistas é menor, alcançando resultados positivos quando existem 500 parasitos/ $\mu$ L, ou 0,01% de hemácias infectadas.

A sensibilidade do QBC varia entre 41% e 93% quando a parasitemia é  $<100$  parasitos/ $\mu$ L, ou 0,002% de hemácias infectadas. A especificidade do QBC é  $>90\%$  para *P. falciparum*, e menor para as outras espécies (Gaye e cols., 1999).

Por recomendação da OMS, os testes rápidos devem alcançar, quando comparado com a hemoscopia, sensibilidade >95% e especificidade de 100% com parasitemia de 100 parasitos/ $\mu$ L, isto é, 0,002% das hemácias infectadas. Porém, quando estes são aplicados nas áreas de trabalho, os valores variam. Por exemplo, a sensibilidade do Parasight varia de 77 a 98% e a especificidade de 83 a 98% (Moody, 2002).

A PCR tem a vantagem de detectar até 5 ou menos parasitos/ $\mu$ L de sangue, com 100% de sensibilidade e especificidade (Snounou e cols., 1993a; Wataya e cols., 1993). Se a positividade da PCR depois do clareamento hemoscópico pós-tratamento reflete a presença de parasitos vivos, é, ainda, uma questão em controvérsia. Kain e cols. acompanharam pacientes após tratamento da malária falciparum e encontraram positividade da PCR até 144 horas pós-tratamento, comparado com 66 horas da hemoscopia (Kain e cols., 1994).

Por outro lado, diversos métodos de PCR em tempo real podem apresentar diferente eficácia. A detecção do DNA parasitário pela PCR em tempo real usando o método de SYBR Green pode ser alterada pela presença de algumas substâncias inibitórias quando comparada com o método de sondas (Veron e cols., 2009).

De todos os exames diagnósticos, o mais eficiente para a detecção de infecção assintomática é a PCR, porém, pelo alto custo do exame e pelas condições especiais que os aparelhos de PCR requerem, o seu uso nas áreas endêmicas de campo tem sido limitado às atividades de pesquisa.

## **0.5 Infecção assintomática por plasmódio.**

A descrição de indivíduos assintomáticos infectados com plasmódio começou no início do século XX. Robert Koch foi o primeiro a descrever a presença da infecção por *Plasmodium* em pessoas sem sintomas de malária, durante sua expedição à Papua Nova Guiné, 1899-1900 (Ewers, 1972; Muller e cols., 2003). Pesquisas posteriores foram desenvolvidas, principalmente, na África, sendo *P. falciparum* a

espécie mais estudada. Na América do Sul, onde *P. vivax* é a espécie mais prevalente, pesquisas começaram a relatar o problema nas décadas de 70 (Jones & Ferreira, 1971) e 80 (Prata e cols., 1988).

Em áreas não endêmicas, este fenômeno é descrito como relato de casos inéditos (Calderaro e cols., 2008; Marangi e cols., 2009; Szmitko e cols., 2009) ou como achados em doadores de sangue assintomáticos (Bruce-Chwatt, 1982; Fugikaha e cols., 2007; Kitchen e cols., 2005; Kitchen & Chiodini, 2006).

### **0.5.1 Dificuldades na caracterização do conceito**

A primeira dificuldade na caracterização do conceito da infecção assintomática por plasmódio tem sido a falta de uma nomenclatura padronizada. Denominações como “infecção assintomática”, “malária assintomática” e “portador assintomático” são encontradas na literatura ao descrever pessoas sem sintomatologia de malária, mas com algum exame de laboratório que evidencie a presença de parasitos no sangue. Outra dificuldade estaria relacionada com a abrangência do conceito, agrupando com o mesmo termo a pessoas cuja imunidade adquirida lhes permite evitar adoecer frente a nova exposição e a pessoas cuja primoexposição (primoinfecção) por plasmódio é assintomática.

O conceito de infecção assintomática por plasmódio envolve aspectos biológicos, clínicos, tecnológicos e epidemiológicos. Entre os biológicos pode-se mencionar a presença dos hipnozoítos de *P. vivax*, os quais podem persistir por tempo indeterminado em pessoas assintomáticas. A parasitemia durante o período de incubação, fato impossível de avaliar nos estudos seccionais, seria outro aspecto a considerar. A relação entre episódio clínico e infecção mista é outra questão de interesse; rotineiramente se assume que a sintomatologia é provocada por ambas as espécies, dirigindo o tratamento contra as duas, sendo que talvez uma delas seja responsável por uma infecção assintomática em curso.

Clinicamente, o conceito “assintomático” em algumas infecções refere-se a um indivíduo com estado geral hígido ou ausência total de sintomas. É o que acontece

com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, herpes vírus, *Tripanosoma cruzii*, etc. O caráter assintomático pode representar período de incubação, janela imunológica, convalescença, ou até um significado incerto. Em malária, por um lado, este conceito tem sido utilizado como ausência tanto do quadro clínico tradicional quanto de qualquer sintoma ou sinal. Por outro lado, existe a questão de saber se o estado assintomático encobre algum processo patológico ainda não manifestado, com o ciclo eritrocitário em funcionamento, confirmado pela presença de gametócitos circulantes.

No aspecto tecnológico, o diagnóstico em malária tem uma estreita relação com a qualidade do exame laboratorial. Os métodos de biologia molecular permitem descobrir infecções subpatentes, cuja baixa presença de parasitos circulantes não é detectada pelos métodos de rotina. Assim, a prevalência da infecção por plasmódio pode ser subestimada dependendo da tecnologia usada. Isto é tão importante para identificar os parasitos na primeira avaliação, quanto para avaliar o seu comportamento no momento em que o indivíduo apresenta sintomas.

Epidemiologicamente, a magnitude da malária tem sido tradicionalmente avaliada pela pesquisa de plasmódio em pessoas sintomáticas que procuram os serviços de saúde, seja de modo passivo ou ativo. Além disso, pessoas que já experimentaram múltiplos quadros clínicos de malária, apresentam nos episódios subseqüentes sintomas mais discretos e em menor número, o que pode fazer com que não procurem os serviços de saúde, uma vez que a suspeita de malária não é considerada. Assim, os portadores da infecção que não procuram os serviços sanitários seriam outro grupo de interesse epidemiológico, sejam eles assintomáticos ou não.

Para determinar qual a importância de um simples exame diagnóstico na avaliação da magnitude da infecção assintomática, precisa-se de estudos longitudinais de coorte prospectiva, os quais permitem estimar a incidência tanto de aparição de sintomas quanto de evolução da parasitemia. Assim, mostrou-se que pessoas assintomáticas acompanhadas mensalmente com hemoscopia permaneciam com parasitos de *P. vivax* por vários meses (Jones & Ferreira, 1971). Em uma área de alta transmissão em Rondônia, Brasil, Prata e cols. acompanharam durante uma

semana 36 moradores assintomáticos com parasitos na gota espessa basal, a maioria de *P. falciparum*; ao final do período, só um permaneceu assintomático, sugerindo fazer o tratamento medicamentoso de todos os indivíduos com parasitemia (Prata e cols., 1988). Por outro lado, em uma área de baixa transmissão na Amazônia Peruana, de 45 pessoas com GE positiva para *P. falciparum*, 30 (66,7%) encontravam-se assintomáticas no diagnóstico e mantiveram-se assim por uma semana; a GE de controle foi negativa em 16 (53%) delas (Branch e cols., 2005), contrastando com os resultados em Rondônia.

No Estado de Rondônia, Camargo e cols. acompanharam por 30 dias uma coorte de 16 indivíduos assintomáticos com PCR basal positiva para *P. vivax*. Todos se mantiveram assintomáticos, e a PCR se manteve positiva em 4 (25%) casos, e em 2 deles a GE foi positiva (Camargo, E. P. e cols., 1999). No estudo de Branch e cols., o acompanhamento por 30 dias dos casos assintomáticos com GE basal positiva mostrou que aproximadamente 40% não desenvolveram sintomas (Branch e cols., 2005). Isto mostra que, independentemente do método diagnóstico, o estado assintomático pode ser mantido em até um mês de seguimento depois do exame inicial.

Em áreas de alta endemicidade, ainda em Rondônia, Brasil, Alves e cols., confirmaram os achados descritos anteriormente por Camargo e cols., mesmo considerando um período de observação de 60 dias. O diagnóstico de assintomático abrangeu qualquer resultado positivo na GE ou na PCR. Aqueles que apresentaram sintomas de malária nesse período foram tratados sem avaliação hemoscópica no episódio de sintomas (Alves, F. e cols., 2002). Portanto, não foi possível discernir qual a evolução daqueles que só tiveram PCR positiva no início em relação aos desfechos.

Em uma área mesoendêmica do Amazonas, Brasil, Ladeia-Andrade e cols., descreveram a presença de infecção assintomática usando como critério clínico a ausência, durante 15 dias de seguimento, de 11 sintomas estabelecidos, junto ao resultado positivo da GE ou da PCR. Mostrou-se que a proporção de infecção assintomática diminuiu de 72% para 31% em 30 dias, e para 25% em 150 dias. Ademais, um resultado positivo na PCR com GE negativa constituiu um fator de

risco para anemia. O fato de ter considerado ambos os exames diagnósticos na definição de infecção assintomática não permitiu discernir qual a relação da PCR com o aparecimento de sintomas (Ladeia-Andrade e cols., 2009).

Em outra área mesoendêmica, em Uganda, África, o acompanhamento durante 30 dias de crianças assintomáticas menores de 5 anos com GE positiva para *P. falciparum*, mostrou que a metade delas desenvolvia febre nesse período. O acompanhamento mensal durante um ano mostrou que o período mais longo livre de sintomas foi 107 dias e o mais longo com parasitemia assintomática persistente foi 210 dias (Njama-Meya e cols., 2004). Porém, não foi possível comprovar se os episódios sintomáticos eram causados pelo mesmo clone de plasmódio do episódio assintomático prévio. Com esse intuito, Kun e cols., demonstraram que os episódios sintomáticos estiveram associados à maior parasitemia e ao aparecimento de novos genótipos do parasito (Kun e cols., 2002).

Também na África, Males e cols., mostraram que a infecção assintomática confirmada na GE pode ser um fator de proteção a longo prazo para um novo episódio clínico de malária (Males e cols., 2008), enquanto que, na mesma população, Le Port e cols., indicaram que os portadores assintomáticos apresentam maior risco de desenvolver ataques leves de malária a curto prazo (nove dias) (Le Port e cols., 2008).

### **0.5.2 Fatores influenciadores do caráter assintomático**

A imunidade adquirida contra a malária caracteriza-se por precisar de um contato prolongado e contínuo com o parasito, e por não ser esterilizante, protegendo contra formas graves da doença, mas sem eliminação do parasito. Os fatores associados com a infecção assintomática parecem estar relacionados, principalmente, com a interação entre tempo de exposição ao plasmódio, desenvolvimento de imunidade e nível de endemicidade da região.

Em áreas holoendêmicas e hiperendêmicas de malária as crianças até os 6 meses de idade estariam protegidas da doença devido à presença de anticorpos maternos

contra esporozoítos e formas assexuadas hemáticas, predomínio de hemoglobina fetal (HbF), aleitamento exclusivo e medidas de controle orientadas a diminuir a transmissão. Em contraste, em uma área de transmissão cíclica na Amazônia Brasileira, verificou-se baixa prevalência de infecção em crianças menores de um ano e baixo grau de proteção relacionada à presença de anticorpos maternos e ao hábito de amamentação (Urdaneta, 1990); a autora encontrou quatro de 55 episódios sem febre, irritabilidade, anorexia, desidratação, vômitos, anemia, icterícia ou alteração de consciência, denominando-os de “infecção subclínica”. Em um destes episódios a criança evoluiu sem sintomas, com GE de controle negativa e permaneceu sem tratamento.

Enquanto a criança experimenta sucessivas infecções durante os primeiros anos de vida vai desenvolvendo um nível de imunidade que se traduz, na adolescência, em menor número de infecções e/ou infecções sem sintomas (Baliraine e cols., 2009; Owusu-Agyei e cols., 2001; Rogier & Trape, 1993). As infecções maláricas posteriores se manifestam com diminuição progressiva do nível de parasitemia, chegando às vezes a tornarem-se não detectáveis pela GE, porém detectáveis pelo método de PCR, demonstrando-se a permanência da infecção na idade adulta (Bottius e cols., 1996; Roper, C. e cols., 1996).

A exposição contínua de nativos à malária em áreas hipoendêmicas ou mesoendêmicas da Amazônia Brasileira induziria também imunidade contra a infecção e contra a doença (Ladeia-Andrade e cols., 2009). Isto concorda com a associação encontrada entre infecção assintomática e maior tempo de permanência em área endêmica na mesma região (Alves, F. e cols., 2002).

Outro fator de importância na infecção assintomática por plasmódio é a maturidade do sistema imunológico. Crianças que migram de áreas não endêmicas para áreas endêmicas desenvolvem proteção mais tardiamente que os adultos (Baird e cols., 1991). Diversas pesquisas sobre o desenvolvimento de imunidade contra a malária focalizam-se no estudo da resposta humoral. A pertinência do assunto nasce do possível descobrimento de algum antígeno do plasmódio que funcione como alvo eficaz de vacinas. A imunidade adquirida é espécie específica e mais demorada contra *P. falciparum* (Bruce e cols., 2000).

Braga e cols., em uma população de garimpeiros do Mato Grosso, observaram que o nível de anticorpos IgG de tipo 1 contra a proteína de superfície do merozoíto 119 (MSP-119) de *P. falciparum* era maior nos pacientes assintomáticos do que nos sintomáticos da mesma área, sugerindo que a proteção contra a malária sintomática dependia do desenvolvimento e do balanço entre isotipos de IgG (Braga e cols., 2002).

Outra proteína plasmodial descrita foi a proteína de superfície do merozoíto 1 (MSP-1), também considerada como candidata à vacina, presente em *P. falciparum* e em *P. vivax*. Anticorpos contra a região N-terminal da MSP-1 estiveram associados com proteção de episódios clínicos de malária em uma área de transmissão estável, porém com sazonalidade, em Gana, África (Cavanagh e cols., 2004). Usando uma proteína recombinante de MSP-1 de *P. vivax*, encontrou-se alta correlação entre a presença de anticorpos IgG com o tempo de residência na área endêmica e idade, sendo os níveis maiores nos indivíduos com infecção assintomática (Nogueira e cols., 2006).

Um tipo de anticorpo associado ao menor risco de adoecer de malária foi descrito em uma área holoendêmica da Tanzânia. Pessoas assintomáticas com altos níveis de IgE anti *P. falciparum* têm menor risco de apresentar um episódio sintomático (Bereczky e cols., 2004).

Conclui-se que os mecanismos geradores de imunidade antimalárica ainda têm que ser devidamente desvendados e compreendidos.

Enfim, um possível fator associado à condição assintomática seria a variabilidade genética dos plasmódios circulantes. Tanto em indivíduos sintomáticos quanto em assintomáticos é possível detectar presença de múltiplos clones do parasito (Vafa e cols., 2008). Parasitemias subpatentes e assintomáticas podem persistir por vários meses nas áreas hipoendêmicas de transmissão sazonal, freqüentemente como infecções múltiplas (Babiker, 1998). Os episódios sintomáticos estão associados com um súbito aumento da densidade parasitária, geralmente relacionada ao aparecimento de um novo genótipo parasitário (Contamin e cols., 1996). Ainda

existe controvérsia quanto à multiplicidade genotípica da infecção nos assintomáticos como fator protetor para o desenvolvimento de um episódio clínico (Al-Yaman e cols., 1997; Vafa e cols., 2008).

### **0.5.3 Prevalência**

A frequência da infecção assintomática por plasmódio descrita na literatura é muito variável. Utilizando a hemoscopia como método diagnóstico, encontram-se proporções de infecção assintomática na África que variam de 17% (Njama-Meya e cols., 2004) a 47% (Bousema e cols., 2004; Kimbi e cols., 2005). Na América do Sul, com o mesmo método laboratorial, os valores são de 2% no Perú e na Venezuela (Marcano e cols., 2004; Roper, M. H. e cols., 2000), 5% a 9% na Colômbia (Cucunuba e cols., 2008; Gonzalez e cols., 1997), e de 1 % (Suarez-Mutis e cols., 2007) a 70% (de Andrade e cols., 1995) no Brasil.

A grande variação de frequências pode corresponder, em parte, às diferentes características epidemiológicas das áreas, como as épocas de transmissão ou a idade da população, mas, principalmente, ao fato das pesquisas utilizarem métodos diversos para definir o que é infecção assintomática. Nesse assunto, o número de sintomas utilizado pode ser um fator importante; por exemplo, baseada na ausência de 13 sintomas, descreveu-se, em comunidades ribeirinhas da Amazônia Brasileira, até 29% de episódios assintomáticos de malária (da Silva-Nunes & Ferreira, 2007).

A metodologia de pesquisa também afeta os resultados. Por uma parte, os estudos transversais tendem a aumentar a prevalência devido à falta de acompanhamento clínico, que possa determinar se a pessoa não se encontra no tempo de incubação da doença, ou, devido à estrita definição do episódio clínico, geralmente associado à febre, que pode prolongar um estado afebril, mas não assintomático. Por outro lado, os estudos longitudinais apresentam diferentes períodos de acompanhamento, tornando difícil a comparação de resultados. Quanto ao modo de detectar a infecção assintomática, multiplicam-se os relatos na literatura sobre a maior sensibilidade da PCR com respeito à hemoscopia. A PCR aumenta em 2 a 7 vezes a magnitude da

infecção detectada pela hemoscopia (Alves, F. e cols., 2002; Bottius e cols., 1996; Roshanravan e cols., 2003; Scopel e cols., 2004; Tada e cols., 2007).

#### **0.5.4 Importância clínico-epidemiológica**

A infecção assintomática por *Plasmodium* surge então como um novo aspecto cuja importância exige ser esclarecida (Coura e cols., 2006; Vinetz & Gilman, 2002). No aspecto individual, ressalta-se a importância de distinguir se a infecção assintomática representa um equilíbrio ideal humano-parasito ou, pelo contrário, trata-se de algum processo patológico ainda não manifestado (Greenwood, 1987; Njama-Meya e cols., 2004). No aspecto epidemiológico, constitui-se em uma possível fonte de infecção para os vetores, especialmente nas épocas de baixa transmissão. A presença de gametocitemia é relatada em alguns estudos de seguimento (Bousema e cols., 2004; John e cols., 2005). Inclusive, a capacidade dos assintomáticos para infectar vetores foi testada em condições experimentais; em pessoas com resultado positivo de PCR para plasmódio e que se mantiveram assintomáticas por dois meses, encontrou-se uma taxa de infecção vetorial de 1% (Alves, F. P. e cols., 2005).

#### **0.5.5 Importância para as ações de controle**

Um aspecto interligado ao clínico-epidemiológico é a questão de tratar ou não a infecção assintomática. Por um lado, alguns autores indicam que a infecção assintomática protege contra novos episódios sintomáticos de malária (Males e cols., 2008), pelo menos contra a mesma cepa (Kun e cols., 2002). Ao contrário, poderia não proteger de novos episódios (Le Port e cols., 2008), ou com seu tratamento, poder-se-ia afetar a imunidade desenvolvida contra o plasmódio, colocando à pessoa em risco de desenvolver a doença posteriormente (Owusu-Agyei e cols., 2002; Owusu-Agyei e cols., 2001). Ademais, existe a dificuldade da adesão ao tratamento, devido às pessoas não se sentirem doentes, especialmente quando este envolve vários medicamentos, por vários dias, e a produção de efeitos colaterais (Prata e cols., 1988).

Como se pode apreciar, estes aspectos afetariam, entre outras coisas, a abordagem estratégica dos programas atuais de controle da malária, focalizados na pessoa doente, trazendo ao debate a importância da infecção assintomática pelo plasmódio como fonte de continuação da endemia malárica, isto é, como reservatório humano de plasmódio (Tada e cols., 2007). A forma de identificar estas pessoas com ferramentas diagnósticas, com um enfoque custo-efetivo, devido às limitações da hemoscopia nestes casos, representa outro desafio. Conhecendo a magnitude da situação em uma determinada área geográfica talvez pudesse se justificar um tratamento em massa na população se for o caso (Coura e cols., 2006).

## **0.6 Marco contextual da pesquisa.**

Em novembro de 2008 celebrou-se em Manaus-AM, a "II Oficina Brasileira Sobre a Infecção Plasmodial Assintomática - OBIPA" como tema especial do "XI Encontro Nacional de Pesquisa em Malária", com o intuito de trabalhar na padronização das diferentes áreas de interesse da infecção assintomática no Brasil. Quanto aos aspectos clínicos, foi mantida a definição de infecção assintomática feita na I OBIPA: **pessoa que após a detecção de parasitemia não teve nenhum sintoma 30 dias antes e até 30 dias depois da coleta da amostra de sangue, sem ter sido tratada com medicamentos antimaláricos no período.** Concordou-se que os indivíduos com GE negativa e PCR positiva não deveriam receber tratamento e sim serem acompanhados em coorte de estudo. Estas orientações tiveram o objetivo de padronizar as pesquisas a fim de ser possível comparar os resultados.

Por outro lado, desde o ano 2008 está sendo desenvolvida na área de estudo a pesquisa intitulada "Epidemiologia da malária no Município do Careiro, Amazonas", cuja instituição sediadora é a FMT-AM. Esse projeto faz parte da pesquisa de cooperação estrangeira "Epidemiologia da malária vivax e caracterização da malária vivax grave na Amazônia Brasileira", cujo componente clínico é multicêntrico. No componente epidemiológico, para todos os casos suspeitos de malária são

realizados exames laboratoriais diagnósticos visando a identificação das espécies *P. vivax* e *P. falciparum*, tanto pela microscopia quanto pela PCR.

Diante das informações resultantes da revisão da literatura, deduz-se que:

- Existe uma ampla informação sobre a infecção assintomática por plasmódio, mas, em sua maioria, utilizam-se critérios diversos para defini-la, fazendo difícil a comparação de resultados. Embora o número de estudos feitos na Região Amazônica, a principal área de malária nas Américas, seja crescente, ainda é limitado.
- Ambas as espécies de plasmódio mais prevalentes na Amazônia, *P. vivax* e *P. falciparum*, têm sido associadas à infecção assintomática na região.
- Vários estudos baseiam-se unicamente em um resultado basal positivo para definir infecção assintomática, como tem sido proposto pela OBIPA. A viragem para resultado negativo, sem tratamento, poderia significar um caráter intermitente da infecção ou uma infecção de curto tempo com eliminação do parasito. No segundo caso, a pessoa não deveria ser considerada mais com infecção assintomática, o que deveria ser levado em consideração ao interpretar os resultados. Isto tem sido pouco estudado na Amazônia, especialmente com a PCR.
- Na Amazônia, ainda não existe experiência publicada em campo que utilize a PCR em tempo real como ferramenta para a detecção de infecção assintomática.

## 1 JUSTIFICATIVAS

Os estudos transversais oferecem apenas uma idéia imprecisa da magnitude da infecção plasmodial assintomática, freqüentemente superestimada, porque o estado assintomático pode variar segundo o tempo que a pessoa é acompanhada, tornando-se menos freqüente quanto mais prolongado for este período. O seguimento dos casos por longo período aproxima a possibilidade de comprovação da condição “assintomática”. O tempo de acompanhamento e os sintomas avaliados têm sido muito variáveis nos diversos estudos registrados na literatura. A informação obtida em área endêmica com metodologia adequada ainda é escassa devido à dificuldade de combinar-se o trabalho de campo com a tecnologia avançada, geralmente centrada em laboratórios das grandes cidades.

O significado da PCR na definição da infecção assintomática por plasmódio e no prognóstico da mesma ainda não está plenamente estabelecido. A maior parte dos trabalhos publicados tem usado a PCR convencional enquanto a PCR em tempo real tem sido usada em poucos trabalhos, principalmente no discernimento de casos clínicos em áreas não endêmicas ou em amostras de população africana, onde *P. falciparum* constitui a principal espécie estudada.

Tem havido falta de uma definição padronizada para a plena caracterização de infecção plasmodial assintomática entre os diversos trabalhos publicados, assim como o estabelecimento de conclusões consensuais. Pesquisadores do Brasil vêm trabalhando nesta padronização, conseguindo elaborar um protocolo unificado de pesquisa na II OBIPA. No protocolo concordou-se que, a fim de melhor caracterizar a infecção subpatente assintomática, indivíduos com GE negativa e PCR positiva não receberiam tratamento antimalárico, porém seriam acompanhados em coorte, gerando conhecimento necessário e inédito da Região Amazônica. O encontro estimulou os pesquisadores a incrementarem as pesquisas sobre o tema com a finalidade de elucidar os pontos ainda obscuros ou mal caracterizados referentes a esta condição.

Nesse sentido, o presente estudo incluiu a observação do comportamento da parasitemia subpatente em pessoas assintomáticas, elemento fundamental para distinguir uma infecção com caráter intermitente de uma infecção autocontrolada.

Justifica-se a presente investigação porque ajudará a compreender melhor a infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*, embora a incidência de malária por esta espécie atualmente não seja mais elevada. Como a maior parte da literatura sobre o tema tem sido com *P. falciparum*, haverá possibilidade de comparação com outros trabalhos. Além disso, o estudo desta espécie oferece a vantagem de excluir recaídas assintomáticas devido a não ter formas latentes no seu ciclo biológico, não obstante as ferramentas biotecnológicas empregadas não permitam descobrir se a persistência da parasitemia durante o acompanhamento obedece à nova infecção. Desta forma, pretende-se contribuir na melhor caracterização da infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral.

Caracterizar a infecção assintomática subpatente causada por *P. falciparum* em residentes maiores de 5 anos de idade do Município do Careiro, área endêmica da Amazônia Brasileira.

### 2.2 Objetivos Específicos.

1. Estimar a frequência de infecção assintomática em uma coorte com infecção subpatente por *P. falciparum*.
2. Descrever as características da infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*.
3. Determinar a frequência de parasitemia patente em até 60 dias de seguimento em uma coorte com infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*.
4. Descrever o comportamento da parasitemia subpatente em até 60 dias de seguimento de uma coorte com infecção assintomática por *P. falciparum*.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Tipo de estudo**

Estudo misto conformado por um estudo transversal e uma coorte descritiva. No corte transversal foram identificados indivíduos com infecção subpatente por *P. falciparum*. Neles foram aplicados critérios de inclusão para constituir uma coorte que foi acompanhada inicialmente em até 90 dias. No dia 30 do acompanhamento, foram reconhecidas as pessoas com infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*.

#### **3.2 Área e população do estudo.**

##### **3.2.1 Área do estudo.**

O estudo foi desenvolvido em duas localidades do Município do Careiro, situado no Estado do Amazonas, Brasil.

O Estado do Amazonas, o maior do Brasil, estende-se em uma área de 1.570.745km<sup>2</sup>, e está localizado na região Norte. Limita com a Venezuela e o Estado de Roraima ao norte; ao leste com o Estado do Pará; ao oeste com os países da Colômbia e Perú e ao sul com os Estados do Acre, Rondônia e Mato Grosso. Apresenta clima equatorial úmido, com variações médias de temperatura entre 23,3 e 31,4°C, e umidade relativa do ar em torno de 80%, podendo diferenciar-se duas estações, a chuvosa e a seca. A cena geográfica é formada principalmente por floresta e água, encontrando-se nessa área a maior rede hidrográfica do planeta (constituída principalmente pelos rios Negro e Solimões que formam o rio Amazonas), navegável praticamente o ano todo. A vocação econômica do estado

está dirigida a incentivar o desenvolvimento sustentável, tendo atualmente as maiores taxas de crescimento no Brasil nos últimos anos.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2006 a população do Amazonas representava aproximadamente 2,5% da população nacional, determinando uma densidade demográfica de 2,06 hab/km<sup>2</sup>. O estado divide-se em meso-regiões centro, norte, sudoeste e sul, tendo um total de 62 municípios.

### **3.2.1.1 Município do Careiro.**

Na meso-região centro (7<sup>a</sup> sub-região do rio Negro-Solimões) do Estado do Amazonas, encontra-se o Município do Careiro, que limita com os Municípios de Careiro da Várzea, Borba, Autazes e Manaquiri (Figura 8).

O nome do município originou-se da palavra Careiro, significa caminho do índio, e está vinculado ao traçado do rio que o corta. Os registros históricos relatam que em 1877, parte da população nordestina que chegou a Manaus, fixou-se no atual território do Careiro, incrementando o povoamento da região. Treze anos depois, em 1890, foram criadas as colônias de Santa Maria do Janauacá e de Treze de Maio, para a fixação daquela população, que recebeu extensões de terra para trabalhar e incentivo econômico do governo do Estado do Amazonas por 6 meses.

Mais tarde, pelo Decreto Estadual nº 176 de 1º de dezembro de 1938, foi criado o distrito do Careiro, fazendo parte do Município de Manaus, constituído por território desmembrado do Município de Manacapuru. Duas décadas depois, pela Lei Estadual nº. 99, de 19 de dezembro de 1955, foi criado o Município do Careiro, desta vez desmembrando-se do Município de Manaus. Com uma área geográfica de 6.092km<sup>2</sup>, correspondendo a 0,39% do território do estado, o município foi constituído por um só distrito e com sede na ex-vila do Careiro, elevada então à categoria de cidade. Em 1977, a sede do município é transferida definitivamente para uma área de terra firme, no km 102 da BR-319.

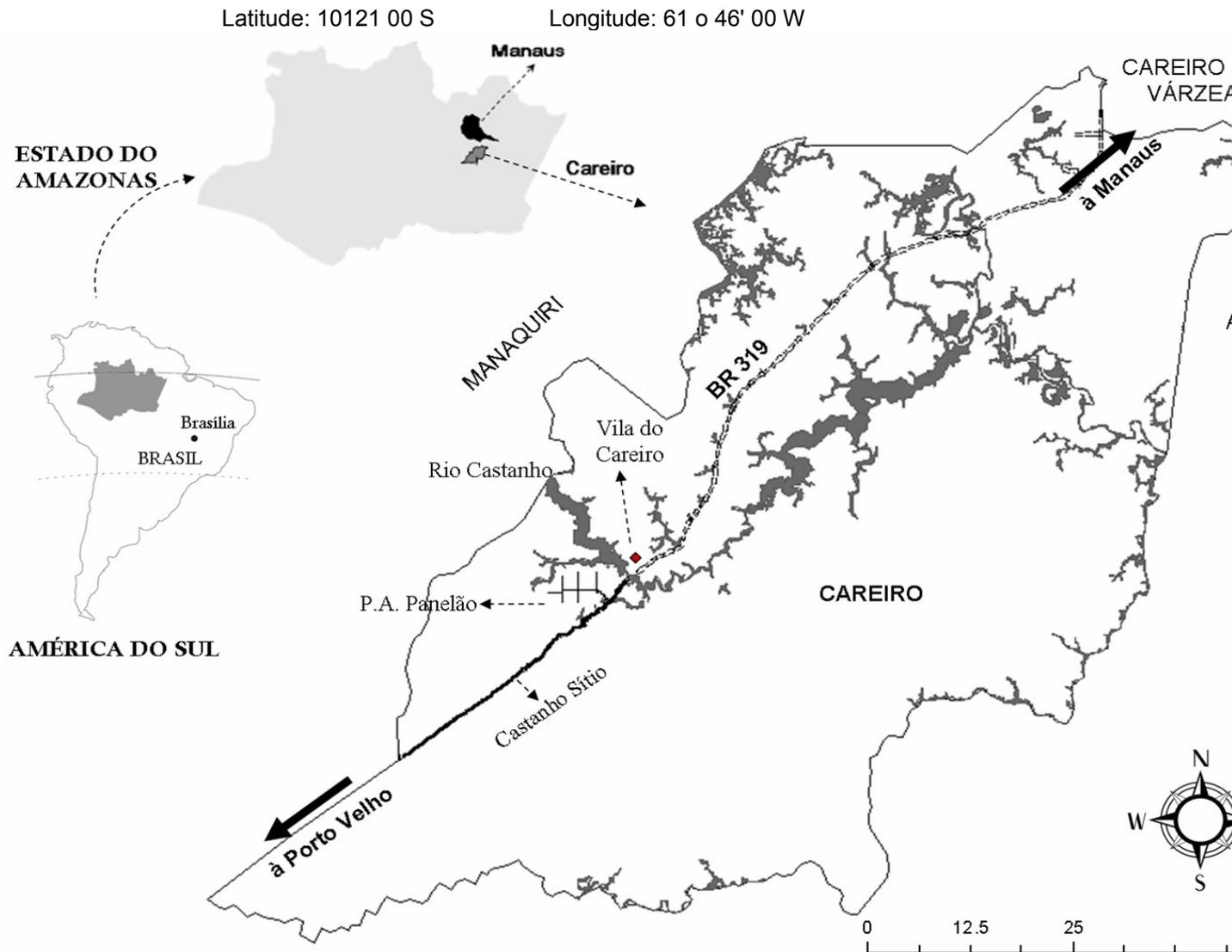


Figura 8 – Localização geográfica do Município do Careiro e das localidades de estudo. Estado do Amazonas (AM), Brasil.

O relevo do Município do Careiro, a 30 metros acima do nível do mar, pode ser considerado semiplano com altitude nunca superior a 100 metros. O clima é tropical chuvoso, com temperatura média de 26°C a 30°C. A estação chuvosa ocorre nos meses de novembro a abril, tendo em média uma precipitação pluviométrica mensal de 300mm<sup>3</sup> e, de 100mm<sup>3</sup> na estação seca. A precipitação pluviométrica anual da região varia de 2,100 a 2,400mm<sup>3</sup> e a umidade relativa do ar de 85% a 90%. (Brasil. Instituto Nacional de Meteorologia, 2008).

A sede do município, a Vila do Careiro, tem acesso pela Estrada Federal BR-319 (rodovia Manaus/Porto Velho), e está a 110km de Manaus, a capital do Estado do Amazonas. Esta rodovia também a interliga com os Municípios de Autazes (km26)

pela Estrada AM-461 e de Manaquiri (km 90) pela Estrada CRO-2. Existe também acesso ao município por via fluvial, através do rio Castanho, afluente do rio Solimões, com seus inúmeros igarapés (pequenos cursos de água que penetram pela floresta) e paranás (braços de rio separados deste por uma ilha), que são navegáveis durante a época da "cheia". O tempo médio do percurso desde Manaus varia em média de 4 a 10 horas, dependendo da potência da embarcação.

Dentre as principais atividades econômicas do município temos:

a) Agricultura: principal atividade, destacando-se as culturas de mandioca, abacaxi, arroz, batata-doce, cana-de-açúcar, cacau, hortaliças, abacate, coco, banana, cupuaçu e pupunha. Várias destas atividades são estimuladas por programas federais de apoio;

b) Pecuária: contribui bastante para a economia do município. Destaca-se a criação de bovinos e suínos, cuja produção de carne, leite, manteiga e queijo, destina-se ao consumo local e a comercialização fora do município;

c) Avicultura: é a maior produção do interior do estado; baseia-se principalmente na criação de patos, perus e gansos;

d) Pesca: é praticada para o consumo local, mas algumas fazendas de piscicultura comercializam seus produtos em Manaus;

e) Indústria: estabelecimentos de beneficiamento de arroz, serrarias, padarias, marcenaria;

f) Comércio: atacadista e varejista;

d) Serviços: restaurantes, boates, borracharias, oficinas para veículos, protéticos, advogados, serviços de alto-falantes e postos de vendas de passagens rodoviárias (duas empresas de ônibus que fazem o percurso Manaus/Careiro).

As principais riquezas naturais são constituídas pela flora e pela fauna. Encontramos árvores de grande porte nos terraços aluviais, e árvores de médio porte nas encostas. As espécies mais importantes são: pau-rosa, castanha-do-pará e a seringueira. A fauna é rica em peixes tais como o pirarucu e o tucunaré, cetáceos, principalmente botos, e animais silvestres: queixadas (porco selvagem), veados, caititus (porco-do-mato) e capivaras. Devido estar localizado às margens do rio, Careiro possui ainda grande quantidade de lagos; os mais conhecidos são os lagos do Janauacá e do Juma. Na Vila do Careiro encontra-se o Lago do Rei, de águas mansas, povoado de vitórias-régias e circundado de exuberante vegetação.

O Município do Careiro dispõe de serviços telefônicos, rádio local e um canal de TV local interligada em rede nacional, além de serviço de internet e de uma agência bancária. As festividades que mais se destacam são as religiosas, principalmente a de Nossa Senhora Santana, no mês de julho. Ademais, toda quarta-feira realiza-se, na sede do município, a “feira do Careiro”, atividade comercial onde os moradores de localidades fora da sede vendem seus produtos, contando com apoio da prefeitura no transporte. O horário desta atividade vai das seis horas da manhã até as três horas da tarde.

Segundo os dados disponíveis do IBGE, em 2003 a proporção de pobreza no município foi 44,1% (limites de 35,1% a 53,1%), pertencendo ao grupo de municípios do estado com maior pobreza (de 19,2% a 48,6%). Naquele ano, Manaus foi a 6ª capital com maior frequência de pobreza do país, com 40,9%. Em 2006, o Produto Interno Bruto (PIB) *per cápita* do Careiro foi 4.111,1 reais, três vezes menor que o PIB do Amazonas e do Brasil, de 11.829,1 e 12.688,3 respectivamente. Nesse ano, Careiro tinha 6 indústrias de transformação, 1 de construção e 1 de produção e distribuição de eletricidade, gás e água. Contudo, o valor adicionado do PIB foi maior em ocupações temporárias e na agropecuária do que na indústria, diferente do Estado do Amazonas, onde a indústria foi maior do que na agropecuária.

Segundo o IBGE, enquanto a população cresceu progressivamente no Amazonas e no Brasil no período de 1991 a 2007, no Careiro a população evoluiu de modo diferente. De 1991 a 1996, a população no município diminuiu de 31.816 para 18.755 habitantes (41,1%) e a partir desse ano, o número foi aumentando progressivamente. Assim, em 2007, o número estimado de moradores foi 31.070, ocupando principalmente a zona rural.

De acordo com as informações do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde em 2007, a rede assistencial no Careiro consiste de 1 hospital com 20 leitos e 17 estabelecimentos (postos) de saúde para a atenção sanitária da população, dispondo de 0,6 médico por 1.000 habitantes.

O Município do Careiro está dividido em 06 distritos (Purupuru, Anveres, Janauacá, Araçá, Mamori, Andirobão), contendo 72 comunidades. Baseados no baixo movimento migratório e no perfil semelhante de transmissão da malária rural, foram escolhidas duas localidades para a pesquisa:

- a) o Projeto de Assentamento Panelão, que se localiza à margem direita do quilômetro 115 da BR-319; consta de seis ruas, chamadas de vicinais, não asfaltadas, frequentemente atravessadas por igarapés, e que são transitáveis por veículos motorizados (Figura 9);
- b) a localidade Castanho Sítio, que se estende do quilômetro 115 ao 152, ao longo da BR-319, a qual encontra-se asfaltada na maior parte de sua extensão, porém entremeada por igarapés (Figura 10).

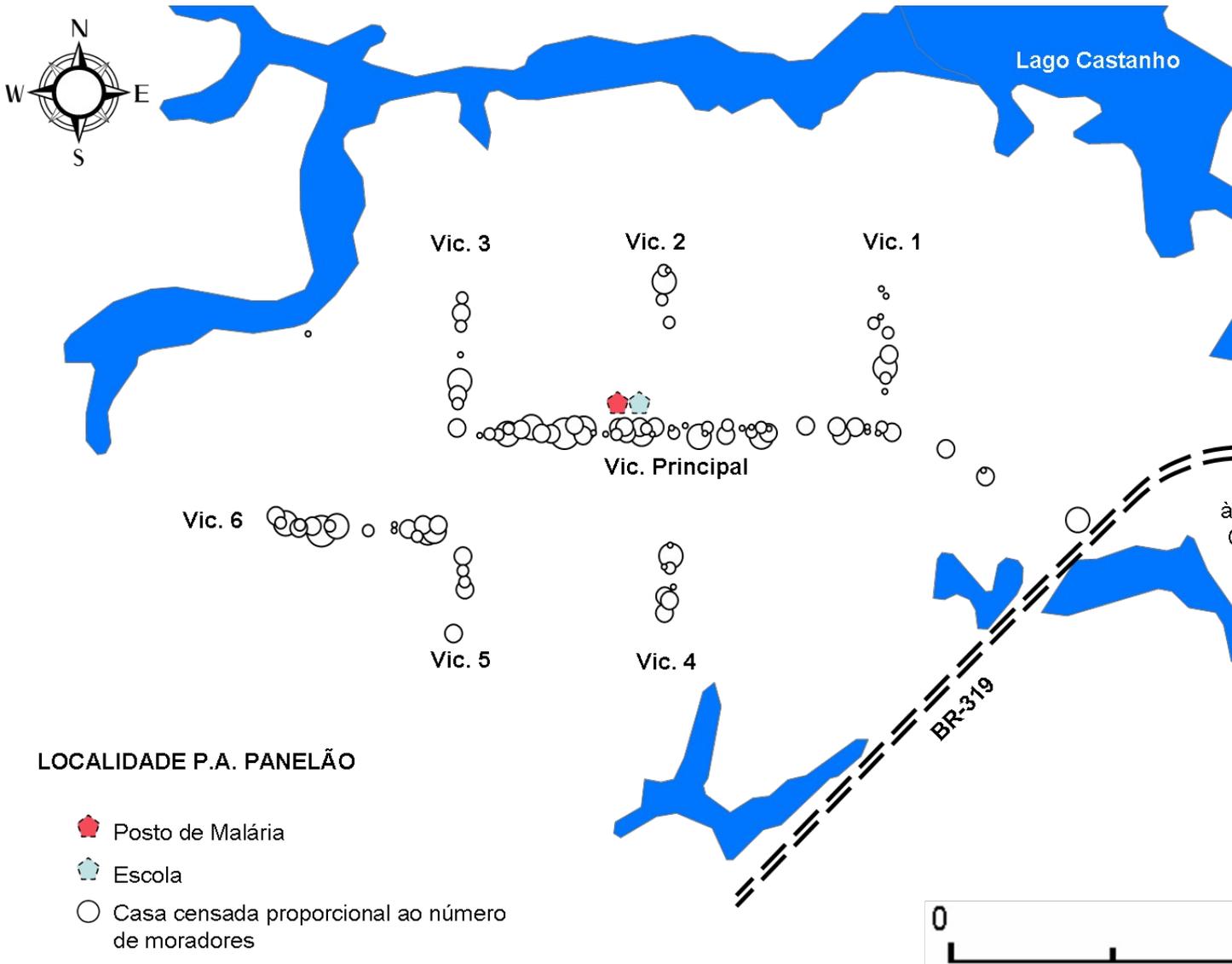


Figura 9 – Detalhe geográfico da localidade Panelão, Município do Careiro-AM, Brasil.

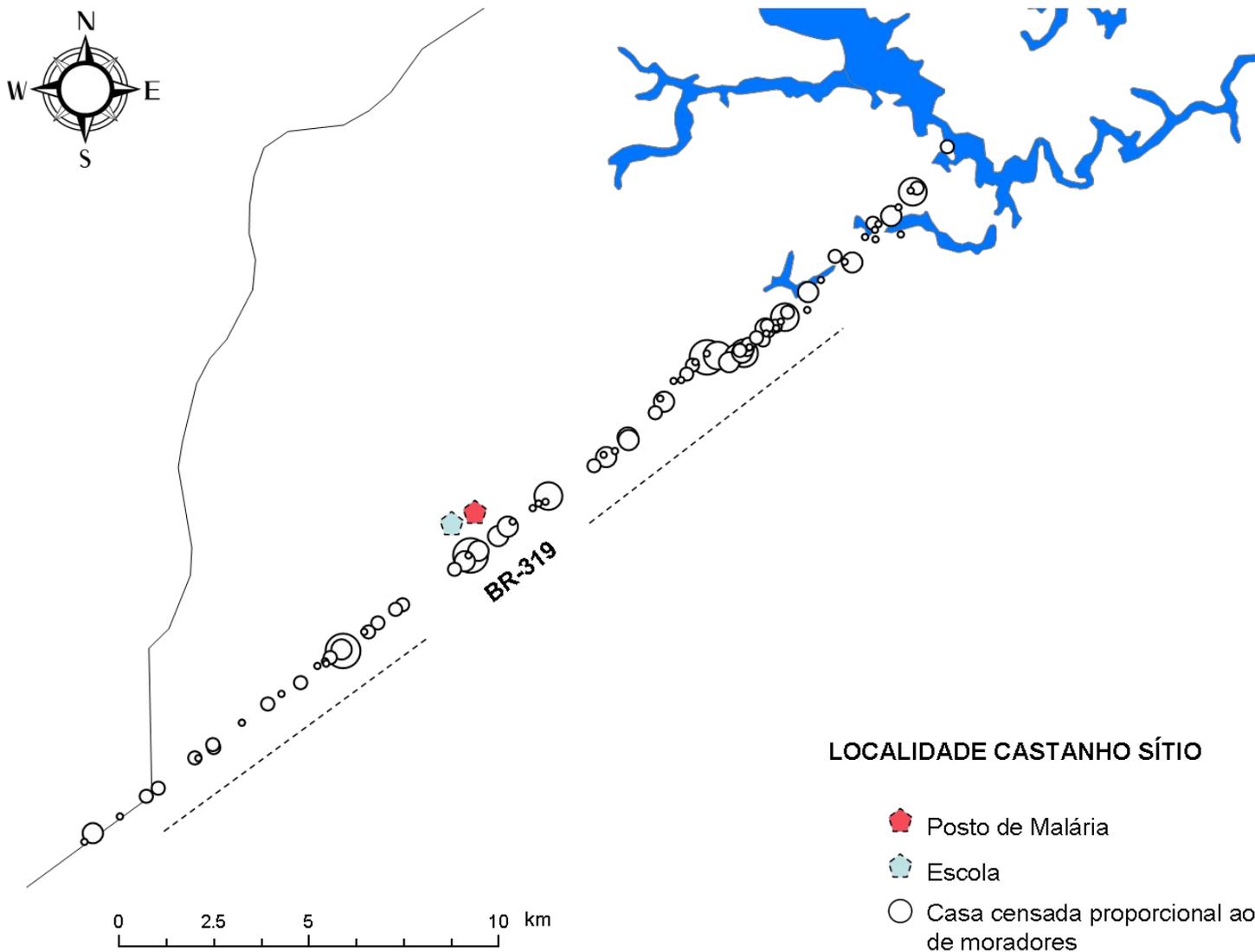


Figura 10 – Detalhe geográfico da localidade Castanho Sítio, Município do Careiro-AM, Brasil.

Ambas as localidades encontram-se ao longo da BR-319, alcançadas por balsa através do Rio Castanho. Cada localidade dispõe de uma escola de ensino fundamental e alfabetização, com turmas matutinas e vespertinas; porém, alguns escolares assistem às aulas na sede. A madeira é o principal material de construção das casas e a maioria delas não tem janelas nem portas teladas. As comunidades dispõem de energia elétrica. A água para consumo humano é coletada em cacimbas (poças de água que se formam no leito de rios temporários na época da estiagem), poços, igarapés ou da própria chuva. Em ambas as localidades existem pequenos estabelecimentos comerciais de produtos de consumo diário. As figuras 11 e 12 mostram aspectos geográficos da área de estudo.



Figura 11 – Rio Castanho ao lado da sede (a) e estrada vicinal principal do Panelão (b)



Figura 12 – Estrada BR- 319 no Castanho Sítio (a) e uma habitação típica da região (b)

### 3.2.2 Atividades de vigilância em malária.

Rotineiramente, as atividades de diagnóstico e tratamento da malária nestas localidades são feitas pelo pessoal de saúde da própria localidade ou da Gerência Municipal de Endemias do Careiro (GEMEC), órgão que coordena as atividades de controle com a Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS/AM) da Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas (SUSAM).

– A localidade de Panelão conta com um microscopista e dois agentes de saúde da própria localidade, recebendo o apoio de um agente de combate às endemias, da GEMEC; um posto de saúde funciona como local de diagnóstico e tratamento da malária. Os microscopistas locais fazem atividades de reciclagem pelo menos uma

vez anualmente com os revisores da própria GEMEC, os quais também revisam rotineiramente as lâminas positivas do município.

– A localidade de Castanho Sítio conta com uma agente de saúde da própria localidade e com dois agentes de combate às endemias, da GEMEC, sendo um deles o microscopista. O local de diagnóstico e tratamento da malária funcionou na escola da localidade até outubro de 2008; depois foi transferido para um local recuperado em convenio entre a prefeitura do Município do Careiro e a FMT-AM.

– Todos os agentes estão treinados para fazer a punção digital e a coleta de sangue em gota espessa em lâmina (GE). Os agentes de saúde se mobilizam aos domicílios a pé ou de bicicleta; já os agentes de combate às endemias se mobilizam de moto, cedida pela GEMEC, diariamente. Os microscopistas têm a responsabilidade de corar as lâminas, fazer a leitura das mesmas e calcular o esquema de tratamento antimalárico. O tratamento é oferecido no próprio posto de saúde ou levado até o domicílio do paciente pelos agentes, no mesmo dia da coleta. O horário de atendimento nos postos de saúde de cada localidade é das oito horas da manhã até às quatro horas da tarde. Aos sábados, o atendimento só funciona no Panelão, até as onze horas da manhã. Lâminas preparadas no final do horário de atendimento, ou depois deste, são lidas no dia seguinte (ou na segunda-feira, caso a coleta seja feita no final de semana).

– Para o controle vetorial, a GEMEC programa atividades de aplicação domiciliar e/ou espacial de inseticida, dependendo da intensidade da transmissão local da malária, e também trabalha na redução dos criadouros; ações contra a fase larvária do vetor não são aplicadas rotineiramente. No entanto, o município carece de informação local atualizada sobre os indicadores entomológicos de malária.

### **3.2.3 População do estudo.**

Dentro do projeto “Epidemiologia da Malária no Careiro”, foi realizado inicialmente um censo populacional nas localidades selecionadas no mês de maio de 2008, no qual participou o pesquisador. O censo apontou uma população de 773 residentes, assim distribuídos: 445 (57,6%) em Panelão e 328 (42,4%) em Castanho Sítio.

A tabela 1 exibe a ocorrência das características demográficas obtidas no censo. Globalmente, houve um predomínio de homens (439/773; 56,8%), sendo a razão do sexo masculino para feminino de 1,3:1.

Os testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) das variáveis idade (estatístico=0,133,  $gl=773$ ,  $p<0,001$ ) e tempo de permanência na área de estudo (estatístico=0,212,  $gl=766$ ,  $p<0,001$ ) indicaram que ambas as variáveis não tiveram distribuição normal. Portanto, testes não paramétricos foram usados nessas variáveis (teste  $U$  de Mann-Whitney).

A idade da população variou de 0 a 91 anos, com mediana de 23 anos (percentil 25=11, percentil 75=44). A distribuição por faixa etária indicou uma população jovem: 39% tinham menos de 15 anos, 22% entre 16 a 30 anos e, com o aumento da idade, a proporção foi diminuindo progressivamente.

A permanência da população na área de estudo variou de 0 a 48 anos, sendo que metade dela tinha permanecido pelo menos 3 anos (percentil 25=1, percentil 75=7). Verificou-se que 79 (10%) pessoas eram naturais da área de estudo; destas, 70 (88,6%) tinham até 15 anos de idade.

Tabela 1 – Características demográficas da população do estudo, segundo os dados do censo, Município de Careiro-AM, Brasil. 2008.

Características epidemiológicas		Panelão		Castanho Sítio		Valor de p <sup>†</sup>	Total			
		n	%*	n	%*		n	%*		
Sexo	Feminino	197	59,0 <b>44,3</b>	137	41,0 <b>41,8</b>	0,488	334	100,0 <b>43,2</b>		
	Masculino	248	56,5 <b>55,7</b>	191	43,5 <b>58,2</b>		439	100,0 <b>56,8</b>		
Faixa etária (anos)	≤ 5	67	68,4 <b>15,1</b>	31	31,6 <b>9,5</b>	0,087	98	100,0 <b>12,7</b>		
	6 – 10	48	54,5 <b>10,8</b>	40	45,5 <b>12,2</b>		88	100,0 <b>11,4</b>		
	11 – 15	74	63,8 <b>16,6</b>	42	36,2 <b>12,8</b>		116	100,0 <b>15,0</b>		
	16 – 30	89	56,0 <b>20,0</b>	70	44,0 <b>21,3</b>		159	100,0 <b>20,6</b>		
	31 – 45	70	51,5 <b>15,7</b>	66	48,5 <b>20,1</b>		136	100,0 <b>17,6</b>		
	46 – 60	64	58,7 <b>14,4</b>	45	41,3 <b>13,7</b>		109	100,0 <b>14,1</b>		
	> 60	33	49,3 <b>7,4</b>	34	50,7 <b>10,4</b>		67	100,0 <b>8,7</b>		
	Tipo de morador na área <sup>‡</sup>	Originário	36	45,6 <b>8,1</b>	43		54,4 <b>13,1</b>	0,023	79	100,0 <b>10,2</b>
		Imigrante	408	59,0 <b>91,9</b>	284		41,0 <b>86,9</b>		692	100,0 <b>89,8</b>

\* proporção por categorias e entre categorias (em negrita); <sup>†</sup> teste de Qui-quadrado de Pearson; <sup>‡</sup> não foi obtido o dado de uma pessoa em cada localidade.

Na análise das características demográficas por localidade, não houve diferença significativa na distribuição por sexo.

A idade da população no Panelão variou de 0 a 91 anos, com mediana de 19,5 anos (percentil 25=10, percentil 75=43) e no Castanho Sítio variou de 1 a 83 anos, com mediana de 27,2 anos (percentil 25=12, percentil 75=45), sendo a diferença entre as localidades significativa ( $p=0,020$ ). No entanto, a distribuição por faixa etária não mostrou diferenças entre elas ( $p=0,087$ ), embora a faixa de 0 a 15 anos tenha sido mais freqüente no Panelão (189/445; 42,5%) que no Castanho Sítio (113/328; 34,5%).

Por outro lado, analisando o tempo de permanência na área de estudo, notou-se uma migração mais recente no Panelão que no Castanho Sítio, com medianas de permanência de 2 anos (percentil 25=1, percentil 75=6) e 5 anos (percentil 25=1, percentil 75=11,5), respectivamente ( $p<0,001$ ). No Panelão, 36/444 (8,1%) pessoas

eram originárias (sempre viveram na área) e no Castanho Sítio, 43/327 (13,1%) ( $p=0,023$ ).

### **3.3 Participantes do estudo.**

Para o estudo “Epidemiologia da Malária no Careiro” foi realizado inicialmente um corte transversal dentro da população levantada no censo, realizado em agosto de 2008, para pesquisa de plasmódio. Participaram do corte transversal 637 habitantes identificados no censo, de todas as idades. Deles, todos os que tiveram GE negativa e PCR positiva exclusivo para *P. falciparum* formaram a população elegível para a coorte do estudo.

### **3.4 Critérios de inclusão.**

Para o censo:

- Ser residente na comunidade, segundo a seguinte definição:

Residente: pessoa que pernoita na localidade por 4 ou mais dias por semana.

- Não ter previsão de mudança de residência fora da comunidade nos seguintes 3 meses.

Para o corte transversal:

- Ter o número de identificação permanente fornecido no censo do projeto “Epidemiologia da Malária no Careiro”.
- Ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto “Epidemiologia da Malária no Careiro” (Anexo 1)

Para a coorte:

- Ter resultado positivo de PCR só para *P. falciparum* e GE negativa.
- Idade mínima de 6 anos.
- Não referir tratamento prévio com antimaláricos nos 30 dias anteriores à data do corte transversal.
- Não referir sintomas de malária nos 30 dias anteriores à data do corte transversal, segundo a seguinte definição:

**Sintomas de malária:** calafrios, aumento da temperatura (temperatura axilar > 37,5°C ou relato de febre), sudorese, cefaléia, mialgia, artralgia, mal-estar, náuseas ou vômitos, hiporexia, lombalgia, fraqueza, dor abdominal.

### 3.5 Critérios de exclusão.

No início do seguimento:

- Referir doenças crônicas como insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, insuficiência renal crônica, *diabetes mellitus*, tuberculose ou hepatopatia crônica.
- Gestantes.

Durante o seguimento.

- Mudança de residência para fora das localidades escolhidas.
- Uso de qualquer medicamento antimalárico padronizado.

- Ter a primeira visita de acompanhamento depois de 30 dias da data do corte transversal.

### **3.6 Procedimentos na seleção dos participantes.**

- Inicialmente, fez-se uma explicação e divulgação sobre as atividades a serem realizadas no corte transversal aos representantes de cada comunidade e também nas respectivas escolas. O corte transversal começou no dia 11 de agosto de 2008 e teve uma duração de 3 semanas. O tempo foi calculado com base na inclusão de 60 habitantes por dia durante 2 semanas, mais uma semana para aqueles que não fossem encontrados previamente. As atividades foram realizadas de segunda a sábado, no horário de 08:00 horas até 16:00 horas. Utilizou-se como meio de transporte os veículos da FMT-AM (camioneta e motos).

- Para as atividades do corte transversal do estudo “Epidemiologia da Malária no Careiro”, formou-se uma equipe fixa de trabalho de campo formada por:

- Enfermeira do projeto, responsável pela apresentação da equipe do projeto, tomada da assinatura do Termo de Consentimento e atualização do censo (inclusão de novos habitantes não identificados previamente).

- Médico do projeto (pesquisador), responsável pela coleta das informações epidemiológicas e dos dados do exame físico.

- Agente de saúde da localidade e agente da GEMEC, responsáveis pela coleta da amostra de sangue em lâmina, em papel de filtro e avaliação da taxa de hemoglobina, utilizando o aparelho HemoCue®, preparo e transporte das lâminas.

- Técnico de laboratório da FMT-AM, responsável pela conservação e transporte das amostras de sangue coletadas em papel de filtro, e pelo preenchimento dos formulários de laboratório.

- Motorista do veículo da FMT-AM, responsável pelo transporte da equipe na área de estudo e apoio logístico.

- Os demais agentes de saúde e pessoal da GEMEC continuaram as atividades de detecção passiva nas localidades do estudo.
  
- Os microscopistas de cada localidade fizeram a leitura das lâminas correspondentes ao corte transversal e da detecção passiva, no posto do Panelão. Um terceiro microscopista do projeto colaborou na leitura das lâminas do corte transversal.
  
- A seleção dos participantes foi feita casa por casa, solicitando a participação dos indivíduos identificados previamente no censo, e retornando-se na terceira semana caso algum morador estivesse ausente durante a primeira visita.
  
- Quando aproximadamente 30 lâminas eram preparadas durante as visitas domiciliares, eram levadas ao posto de saúde para leitura.
  
- Para cada participante aplicou-se, no domicílio, um *Questionário de visita transversal* (Anexo 2), para coleta de dados epidemiológicos e para lançamento dos dados sobre medição da temperatura axilar, palpação do baço, registro da coleta das amostras de sangue capilar em lâmina e resultado da aferição de hemoglobina. Ao final de cada jornada, os questionários eram complementados acrescentando-se os resultados da leitura das lâminas.
  
- A leitura das lâminas preparadas com gota espessa foi realizada em cada localidade. Todas as lâminas lidas foram armazenadas no posto de saúde do Panelão até serem levadas a FMT-AM para o controle de qualidade (revisão por dois microscopistas experientes).
  
- Os papéis de filtro com amostras de sangue foram inicialmente armazenados à temperatura ambiente no local de centralização do projeto na sede do Careiro. Os procedimentos de extração de DNA do papel de filtro e de PCR do DNA extraído foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da Gerência de Malária da

FMT-AM, e iniciaram oito dias depois do início do corte transversal, com as amostras armazenadas também à temperatura ambiente. Os primeiros resultados foram conhecidos pelo pesquisador no Careiro, quinze dias depois do início do corte transversal.

- Conhecendo os resultados da PCR, aplicaram-se os critérios de inclusão para a coorte.

### **3.7 Procedimentos no seguimento da coorte.**

- Estabeleceu-se um plano de visita domiciliar aos indivíduos incluídos na coorte. As visitas foram planejadas para serem realizadas com intervalos de 15 dias aproximadamente, durante 90 dias.
- Em cada visita participaram o médico do projeto (pesquisador), encarregado do preenchimento das informações clínicas, e um agente de saúde ou agente da GEMEC para a coleta das amostras de sangue.
- Em cada visita perguntava-se ao participante selecionado se havia sido submetido a exame microscópico de sangue para malária desde a última visita (ou desde o corte transversal no caso da primeira visita) e, se apresentara algum sintoma de malária nas últimas 48 horas. Em seguida, realizava-se o exame físico (visando palidez, icterícia, hepatomegalia, esplenomegalia e temperatura axilar) e a coleta de amostra de sangue capilar em lâmina e em papel de filtro. As lâminas foram lidas pelo microscopista da localidade no prazo máximo de 24 horas e os resultados anotados no *Questionário de seguimento de GE (-) e PCR (+)* (Apêndice 1). Se positiva para qualquer espécie de *Plasmodium*, era oferecido o tratamento específico ao participante e considerava-se o seguimento terminado.

- Os papéis de filtro foram armazenados a - 4°C no Centro de Atividades de Campo do Projeto e os procedimentos de extração de DNA e de PCR só foram realizados no final do período de acompanhamento.
  
- Para o diagnóstico dos episódios sintomáticos (detecção passiva), os postos de saúde de cada localidade estiveram disponíveis de modo permanente, de segunda a sábado. Todos os agentes envolvidos na pesquisa foram treinados pelo projeto “Epidemiologia da Malária no Careiro” para o correto preenchimento dos *Questionários de Detecção Passiva* (Anexo 3) e do formulário rotineiro do Sistema de Vigilância Epidemiológica (SIVEP), e orientados a coletar sempre amostras de sangue em lâmina e em papel de filtro de todo indivíduo suspeito de malária. Estes papéis de filtro com amostra de sangue foram armazenados à temperatura ambiente na sede do projeto do Careiro por uma semana e, posteriormente, na FMT-AM, em Manaus. Os procedimentos de extração de DNA e de PCR a partir destes papéis de filtro só foram realizados no final do período de acompanhamento. Quando uma lâmina era preparada com propósito de verificar-se a eficácia do tratamento (lâmina de verificação de cura), os agentes foram orientados a não coletar amostra de sangue em papel de filtro.
  
- Se no momento da visita programada, o participante já havia sido submetido a exame microscópico de sangue para detecção passiva nas últimas 48 horas, não se coletava nova amostra; nestes casos, a informação era obtida a partir dos *Questionários de detecção passiva* do estudo “Epidemiologia da Malária no Careiro”.
  
- Quando a detecção passiva era feita fora da área de estudo e o participante não iniciava tratamento antimalárico, foi coletada nova amostra de sangue.
  
- Quando a detecção passiva era feita fora da área de estudo e o participante iniciava tratamento antimalárico, foi registrado somente a espécie detectada e não foi coletada nova amostra.

### 3.8 Procedimentos de laboratório

#### 3.8.1 Hemoscopia.

Utilizou-se o método da gota espessa (GE) para o diagnóstico de *Plasmodium*. O procedimento para a coleta da amostra de sangue consistiu em limpar a polpa do dedo com algodão embebido em álcool a 70% e fazer a punção digital com lanceta estéril descartável. Em seguida, comprimia-se o dedo puncionado até cair duas gotas de sangue na lâmina. Logo as gotas eram expandidas cuidadosamente com outra lâmina limpa com o intuito de formar duas áreas retangulares homogêneas de 1,5 x 1,0cm (Figura 13).

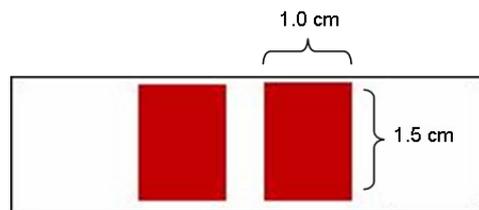


Figura 13 – Representação da lâmina com gota espessa utilizada no projeto.

A lâmina era deixada à temperatura ambiente para secar e, posteriormente, corada pelo método de Giemsa.

De acordo com as normas do Ministério da Saúde, descritas no Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária (2005), a leitura da lâmina de gota espessa foi feita por imersão em uma gota de óleo, utilizando-se ocular de 10X e objetiva de 100X. A leitura era iniciada da periferia do campo e terminada no centro. Quando o campo era lido, movia-se a lâmina longitudinalmente para examinar os campos adjacentes. Movia-se a lâmina verticalmente para que outra fileira/largura fosse lida, considerando que 100 campos (equivalente a 0,25µl de sangue) tomam um eixo de 2cm da lâmina.

Nos postos de saúde de cada localidade, a leitura das lâminas foi realizada conforme a prática padrão do Ministério da Saúde, visando a presença do parasito e

a identificação da espécie, no mínimo em 100 campos e por 10 minutos. Na FMT-AM, a revisão das lâminas considerou a metodologia padronizada pelo Ministério da Saúde com as seguintes considerações:

- Até 200 campos microscópicos examinados em alta resolução para considerar a lâmina negativa.
- Até 300 leucócitos, caso fossem vistas formas assexuadas de *Plasmodium* para quantificar a parasitemia por  $\mu\text{l}$ , usando a seguinte fórmula: (Nº. de parasitos assexuados em 300 leucócitos) \* 6000 / 300. No caso das infecções mistas, contou-se separadamente os parasitos de cada espécie.
- A contagem de gametócitos foi feita de forma específica para cada espécie usando da mesma metodologia para quantificação das formas assexuadas.

Sempre se considerou o resultado da revisão como resultado final da leitura de lâmina. Quando a lâmina não tinha condições para ser revisada, mantinha-se o resultado da leitura local inicial. A revisão das lâminas do corte transversal foi feita por dois microscopistas experientes da FMT-AM. Quando os microscopistas revisores não concordavam no resultado, uma terceira leitura por um deles o definiu. A revisão das lâminas do seguimento foi feita apenas por um microscopista experiente.

### **3.8.2 PCR**

O Anexo 4 detalha os procedimentos operacionais padronizados empregados na extração do DNA e na realização da PCR em tempo real.

No corte transversal, a extração do DNA a partir das amostras de sangue coletadas em papel de filtro INLAB tipo 30 (que corresponde ao Whatman 41, com porosidade de 7,5 micras) foi realizada com o *Easy-DNA™ Kit* da empresa Invitrogen, aplicando o protocolo de extração de 30 minutos, segundo as instruções do fabricante.

A extração do DNA, a partir do papel filtro INLAB tipo 30, das amostras coletadas durante o seguimento e na detecção passiva, foi realizada usando o protocolo fenol-clorofórmio. A cada grupo de 28 amostras foi incluído um controle positivo (positivo

na gota espessa para cada espécie de *Plasmodium*) e um controle negativo (sem papel de filtro). Os tubos contendo o DNA extraído foram armazenados a -20°C.

O protocolo para a realização da PCR em tempo real propriamente dita está detalhado no Anexo 4. Utilizou os seguintes iniciadores ou *primers*, que reconhecem as seqüências conservadas do gene da subunidade menor do RNA ribossomal (s18rRNA) para cada espécie:

*Plasmodium vivax*

PVIV1 – 5' CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC 3'

PVIV2 – 5' ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA 3'

*Plasmodium falciparum*

PFAL1 – 5' AGT GTG TAT CAA TCG AGT TTC 3'

PFAL2 – 5' AGT TCC CCT AGA ATA GTT ACA 3'

A PCR em tempo real foi realizada pelas mesmas pessoas experientes no sistema *7500 Fast Real Time PCR System* da *Applied Biosystem*®, com o método do SYBR Green I, utilizando-se como ponto de corte Cts acima de 38 ciclos. As curvas de dissociação padronizadas no laboratório da Gerência de Malária da FMT-AM possuem Tm (melting temperature) de 74°C (±1°C) para *P. vivax*, e 80°C (±1°C) para *P. falciparum*.

Em cada reação de PCR foram incluídos um controle negativo (água miliQ) e um controle positivo contendo DNA de *Plasmodium spp* (*P. falciparum* - MR4, *P. vivax* – amostras de cultivo in vitro). Além dos controles da reação de PCR, foram incluídos controles provenientes do processo de extração das amostras em estudo: amostras correspondentes a pacientes com GE positiva para cada espécie (controles positivos) e água MiliQ (controle negativo).

A interpretação dos resultados foi feita por uma mesma pessoa na FMT-AM, que desconhecia os resultados da gota espessa. Quando o resultado era indeterminado, repetiu-se o procedimento uma vez. Se o resultado ainda era indeterminado, considerava-se a amostra como negativa.

### 3.9 Análise dos dados

A base de dados foi organizada utilizando-se o programa estatístico SPSS 15.0 for Windows® (Chicago, Illinois). Para efeitos de análise, foram criadas duas variáveis: idade até 15 anos e tipo de morador na área (“originário” quando o tempo de permanência coincidia com a idade e “imigrante” em caso contrário). Em uma primeira etapa foi realizada uma análise exploratória dos dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais segundo a positividade da PCR para *P. falciparum* no corte transversal. Na segunda etapa, a análise considerou os primeiros 30 dias de seguimento, tendo como desfecho o desenvolvimento de sintomas de malária. A terceira etapa descreveu a evolução posterior do estado clínico, GE e PCR do grupo que permaneceu assintomático e sem parasitos detectáveis na segunda etapa.

Para fins da pesquisa, a definição de infecção subpatente assintomática por *Plasmodium* foi a adotada na II OBIPA:

- Infecção subpatente assintomática por *Plasmodium*: indivíduo com resultado positivo na PCR para *Plasmodium* e com exame de lâmina de GE negativo, que não apresenta sintomas de malária nos 30 dias anteriores e posteriores à coleta da amostra de sangue para diagnóstico, sem receber medicação antimalárica nesse período.

Realizaram-se também comparações com as variáveis de estudo, segundo os seguintes critérios:

- Na primeira etapa, segundo o resultado da GE e da PCR para *P. falciparum*, exames feitos no corte transversal.
- Na segunda etapa, segundo o estado clínico (sintomático ou assintomático) ao final dos primeiros 30 dias de seguimento.

Para a determinação de anemia foram considerados os critérios da OMS para a anemia por deficiência de ferro, ajustados por idade e sexo (World Health Organization, 2001).

Nas comparações, para a detecção de diferenças de variáveis contínuas (idade, tempo de permanência na área de estudo, valor de hemoglobina, tempo livre de

sintomas), utilizou-se o teste *t* de Student (paramétrico) para as de distribuição normal, e o teste *U* de Mann-Whitney (não paramétrico) para as de distribuição não normal. A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi verificada com teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando como distribuição normal se  $p > 0,05$ . Para a detecção de diferenças entre proporções, empregou-se o teste de associação de atributos (Qui-quadrado de Pearson) ou o teste exato de Fisher, quando necessário. Considerou-se um nível de significância ( $p$ ) de 0,05.

Também foi realizada uma análise de curva de sobrevida dos indivíduos assintomáticos pelo método de Kaplan Méier, tendo como desfechos a aparição de sintomas e a positividade da GE.

### **3.10 Considerações éticas.**

Este trabalho esteve inserido no projeto “Epidemiologia da malária vivax e caracterização da malária vivax grave na Amazônia Brasileira”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FMT-AM (CAAE-0056.0.114.000-08; Registro CEP N° 2756-08) (Anexo 5). Foi usado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido elaborado no projeto “Epidemiologia da Malária no Careiro” (Anexo 1), onde se explicitam os objetivos do trabalho, incluindo riscos e benefícios para os participantes. Todos os participantes (e/ou responsáveis) foram informados da pesquisa e dos exames a que seriam submetidos antes de dar o consentimento escrito, assim como da liberdade para deixar a pesquisa em qualquer momento. O material biológico dos participantes, devidamente identificado, foi armazenado nos laboratórios da Gerência de Malária da FMT-AM, garantindo total sigilo.

Foi prestada assistência médica à população mediante mutirões de atendimento de saúde e durante as visitas domiciliares do seguimento. Foi facilitado o encaminhamento aos hospitais de Manaus para consulta especializada ou para realização de exames especiais, quando necessário.

## 4 RESULTADOS.

### 4.1 Participantes do corte transversal.

Participaram do corte transversal 642 (83,1%) dos 773 moradores nas duas localidades de estudo; dois (0,3%) moradores se recusaram a participar e 129 (16,7%) não se encontravam na área durante o período do corte (figura 14).

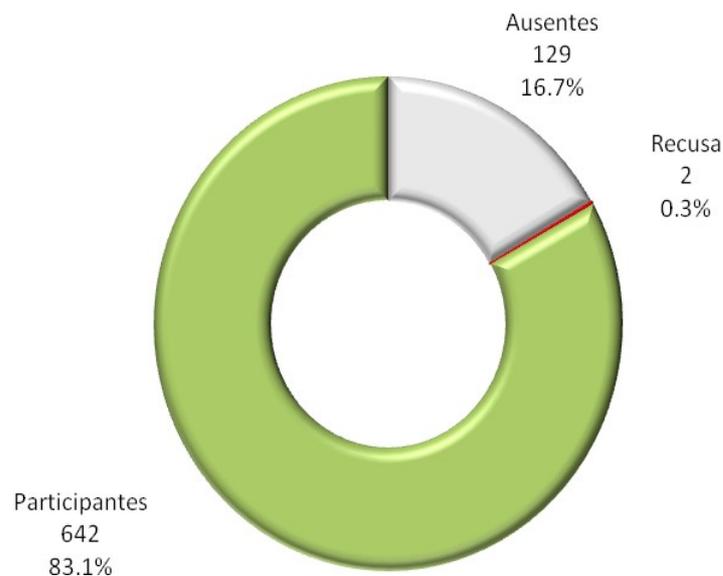


Figura 14 – Participação dos moradores durante o corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

### 4.2 Resultados da microscopia no corte transversal.

Dos 642 participantes do corte transversal, 47 (7,4%) tiveram parasitos de plasmódio no exame da GE feito por microscopistas locais: 40 (6,3%) com *P. vivax* e 7 (1,1%) com *P. falciparum* (figura 15).

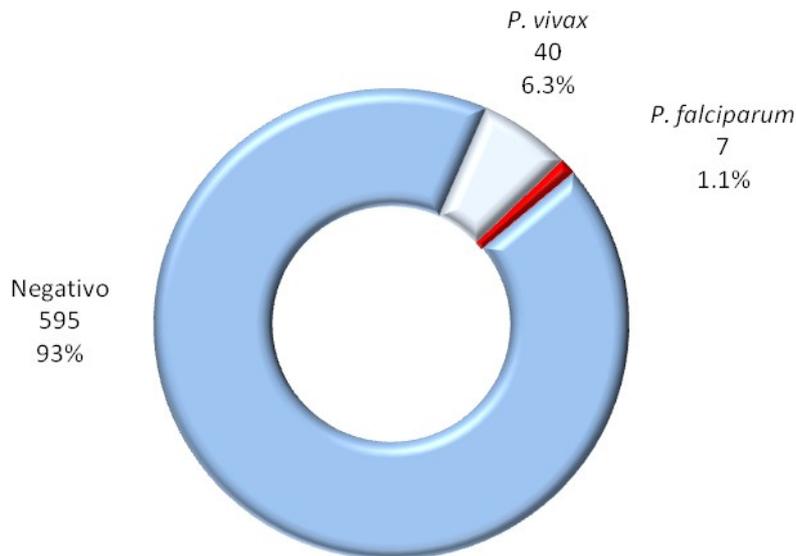


Figura 15 – Resultado do exame da gota espessa durante o corte transversal em duas localidades do Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

Os participantes com parasitos de plasmódio identificados pelos microscopistas locais receberam tratamento antimalárico específico após o diagnóstico. Na revisão dos exames de GE não foram encontrados parasitos em 7 casos, 5 inicialmente diagnosticados de *P. vivax* e 2 de *P. falciparum*.

Nos casos confirmados de *P. vivax* a parasitemia assexuada variou de 24 a 6.000 parasitos/ $\mu$ l (média de 890 parasitos/ $\mu$ l) e foram identificados gametócitos em 4 casos (12 – 192 parasitos/ $\mu$ l).

Todos os casos confirmados de *P. falciparum* tiveram gametócitos (60 – 156 parasitos/ $\mu$ l) e somente dois tiveram formas assexuadas (1800 – 2124 parasitos/ $\mu$ l).

#### 4.3 Formação da coorte do estudo.

Com a finalidade de identificar somente as infecções subpatentes por plasmódio, foram escolhidos os 595 participantes sem parasitos no exame da GE. Neste grupo, estiveram disponíveis 533 (89,6%) exames de PCR para *P. falciparum* e 344 (57,8%) para *P. vivax*, no momento do estudo (figura 16).

A PCR para *P. falciparum* foi positiva em 152/533 (28,5%) casos e para *P. vivax* em 88/344 (25,6%). Reconheceram-se 11 casos de infecção mista subpatente e 125 casos livres de infecção.

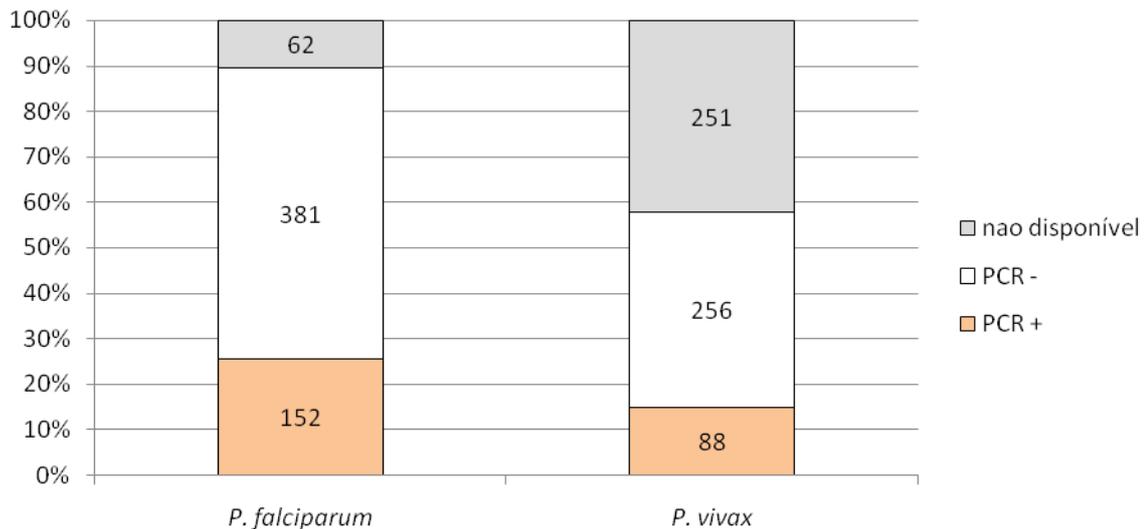


Figura 16 – Resultados da PCR em 595 participantes com exame de GE negativo. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

Para a coorte do estudo foram considerados elegíveis os 141 participantes com infecção subpatente exclusiva por *P. falciparum*.

Dos participantes elegíveis, 92 (65,3%) cumpriam os critérios de inclusão. No entanto, 15 (16,3%) pessoas tiveram a primeira visita do pesquisador depois de 30 dias a partir da data do corte transversal, sendo consideradas como perdas para análise.

Finalmente, até o dia 30 do seguimento, 28/77 (36,4%) pessoas permaneceram assintomáticas; 24/76 (31,6%) até o dia 60, e 20/73 (27,4%) até o dia 90, conforme se indica no fluxograma da coorte (figura 17).

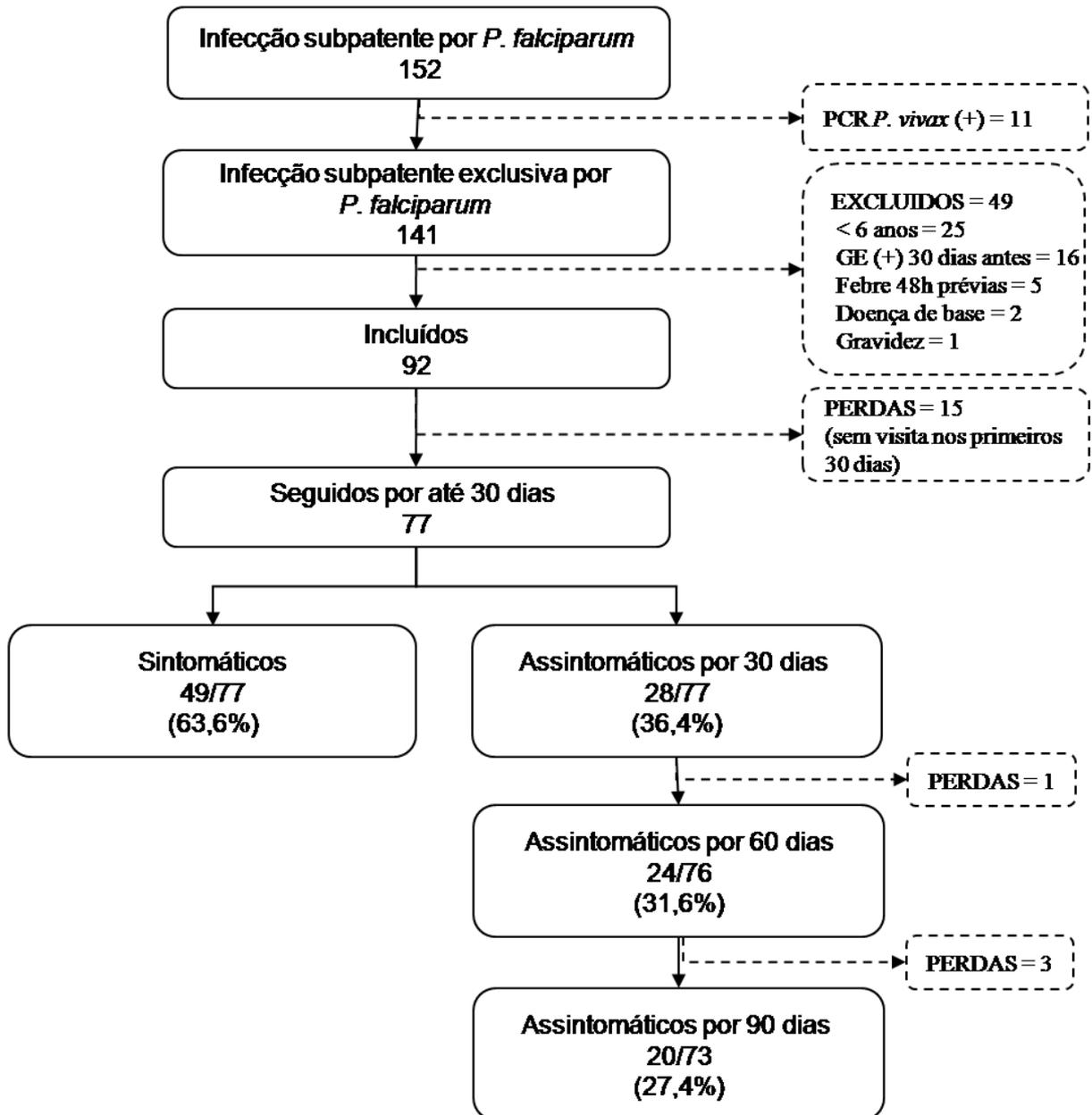


Figura 17 – Fluxograma da coorte do estudo.  
GE = gota espessa.

O estudo foi analisado em três etapas descritas na metodologia. A primeira etapa refere-se à análise do corte transversal; a segunda etapa, ao seguimento dos participantes por um período de até 30 dias; e, a terceira etapa, aos desfechos do seguimento por um período de até 90 dias.

#### **4.4 Primeira etapa da análise do estudo: análise do corte transversal.**

##### **4.4.1 Características demográficas**

No corte transversal, houve uma participação de 642/773 (83,1%) pessoas identificadas no censo, assim distribuídas: 366 (57,0%) da localidade Panelão e 276 (43,0%) do Castanho Sítio, fazendo uma representação de 82,2% e 84,1% da população em cada localidade, respectivamente.

Houve 354 (55,1%) participantes do sexo masculino e 288 (44,9%) do feminino.

A idade dos participantes variou de 0 a 86 anos; metade da população tinha até 20 anos de idade (percentil 25=10, percentil 75=43). Com o aumento da idade, diminuiu progressivamente a proporção das faixas etárias: 271 (42,2%) pessoas tiveram 15 anos ou menos, 120 (18,7%) entre 16 e 30 anos, 111 (17,3%) entre 31 e 45 anos, 83 (12,9%) entre 46 e 60 anos, e 57 (8,9%) com mais de 60 anos.

Uma de cada duas pessoas tinha permanecido na área de estudo por até três anos (percentil 25=1, percentil 75=7). Considerando o lugar de origem e o tempo de permanência nas localidades, 73 (11,4%) eram originários da área e 567 (88,3%) procediam de outras áreas. Em 2 indivíduos não foi obtida esta informação.

Não houve diferença significativa entre as localidades quanto a distribuição por sexo nem por faixa etária. Castanho Sítio teve maior quantidade de moradores originários do que Panelão, com tendência à significância ( $p=0,055$ ).

Tabela 2 – Características demográficas relativas à população participante do corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

Características demográficas		Panelão		Castanho Sítio		Valor de p <sup>†</sup>	Total	
		n	%*	n	%*		n	%*
Sexo	Feminino	167	58,0 <b>45,6</b>	121	42,0 <b>43,8</b>	0,652	288	100,0 <b>44,9</b>
	Masculino	199	56,2 <b>54,4</b>	155	43,8 <b>56,2</b>		354	100,0 <b>55,1</b>
Faixa etária (anos)	≤ 5	58	66,7 <b>15,8</b>	29	33,3 <b>10,5</b>	0,128	87	100,0 <b>13,6</b>
	6 – 10	42	51,2 <b>11,5</b>	40	48,8 <b>14,5</b>		82	100,0 <b>12,8</b>
	11 – 15	64	62,7 <b>17,5</b>	38	37,3 <b>13,8</b>		102	100,0 <b>15,9</b>
	16 – 30	67	55,8 <b>18,3</b>	53	44,2 <b>19,2</b>		120	100,0 <b>18,7</b>
	31 – 45	56	50,5 <b>15,3</b>	55	49,5 <b>19,9</b>		111	100,0 <b>17,3</b>
	46 – 60	51	61,4 <b>13,9</b>	32	38,6 <b>11,6</b>		83	100,0 <b>12,9</b>
	> 60	28	49,1 <b>7,7</b>	29	50,9 <b>10,5</b>		57	100,0 <b>8,9</b>
	Tipo de morador na área <sup>‡</sup>	Originário	34	46,6 <b>9,3</b>	39		53,4 <b>14,2</b>	0,055
	Imigrante	331	58,4 <b>90,7</b>	236	41,6 <b>85,8</b>	567	100,0 <b>88,6</b>	

\* proporção por categorias e entre categorias (em negrita); <sup>†</sup> teste de Qui-quadrado de Pearson; <sup>‡</sup> não foi obtido o dado de uma pessoa em cada localidade.

#### 4.4.2 Características epidemiológicas e clínicas

As características epidemiológicas e clínicas da população participante do corte transversal estão indicadas na tabela 3.

O uso de mosquiteiro para dormir foi referido por 312/629 (49,6%) participantes e 548/629 (87,1%) referiram ter a casa borrifada com inseticida nos últimos seis meses. Ambas as características foram mais freqüentes na localidade de Panelão ( $p < 0,01$ ).

O uso de algum antimalárico nos 30 dias prévios ao dia da visita do corte transversal, em consequência de um diagnóstico por GE, foi referido por 107/629 (16,8%) participantes: 81 consumiram cloroquina (CQ) + primaquina, 21 lumefantrina + artemether, 4 somente CQ (não eram grávidas) e 1 não lembrava o nome do

medicamento. A respeito, a proporção de pessoas com antecedente recente de malária foi 21,2% no Panelão e 11,5% no Castanho Sítio ( $p < 0,01$ ).

Febre nas últimas 48 horas (aferida ou não) foi relatada por 59 (9,4%) participantes, sendo mais freqüente no Panelão ( $p = 0,043$ ).

Ao exame clínico, o baço foi palpável em 53 (8,4%) participantes: no rebordo costal em 48 e, no ponto medial entre o rebordo costal e a cicatriz umbilical, em cinco; não foi possível a avaliação em seis pessoas (por obesidade em 4 e por recusa em 2). Não houve diferença significativa na proporção de esplenomegalia entre as localidades. Entre as 128 crianças de 2 a 9 anos de idade, o exame clínico revelou baço palpável em 10 (7,8%): 9/73 (12,3%) no Panelão e 1/55 (1,8%) no Castanho Sítio ( $p = 0,043$ ).

A taxa de hemoglobina teve média de  $12,7 \pm 1,77$  mg/dL, sendo mais elevada no Castanho Sítio (12,9 mg/dL) que no Panelão (12,5 mg/dL) ( $p = 0,006$ ). Considerando os valores referenciais da OMS, houve 196/629 (31,2%) pessoas com anemia, mas sem diferença significativa entre as localidades. A proporção de anemia foi maior na faixa etária de 0 a 5 anos (43,0%), seguida pelas faixas de 6 a 10 (35,8%) e de 11 a 15 (34,0%), com tendência a diminuir com o aumento da idade ( $p = 0,031$ ) (Figura 18).

A presença de plasmódio detectada pela GE ocorreu em 47 (7,3%) pessoas, sendo esta proporção maior no Panelão que no Castanho Sítio ( $p = 0,005$ ).

Tabela 3 – Características epidemiológicas e clínicas relativas à população participante do corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

Características epidemiológicas e clínicas		Panelão		Castanho Sítio		Valor de p <sup>†</sup>	Total	
		n	%*	n	%*		n	%*
Uso de mosquiteiro para dormir	Sim	204	65,4 <b>56,8</b>	108	34,6 <b>40,0</b>	<0,001	312	100,0 <b>49,6</b>
	Não	155	48,9 <b>43,2</b>	162	51,1 <b>60,0</b>		317	100,0 <b>50,4</b>
Aplicação domiciliar de inseticida nos últimos 6 meses	Sim	325	59,3 <b>90,5</b>	223	40,7 <b>82,6</b>	0,003	548	100,0 <b>87,1</b>
	Não	34	42,0 <b>9,5</b>	47	58,0 <b>17,4</b>		81	100,0 <b>12,9</b>
Uso de medicamento antimalárico último mês	Sim	76	71,0 <b>21,2</b>	31	29,0 <b>11,5</b>	0,001	107	100,0 <b>17,0</b>
	Não	283	54,2 <b>78,8</b>	239	45,8 <b>88,5</b>		522	100,0 <b>83,0</b>
Febre nas últimas 48 horas	Sim	41	69,5 <b>11,4</b>	18	30,5 <b>6,7</b>	0,043	59	100,0 <b>9,4</b>
	Não	318	55,8 <b>88,6</b>	252	44,2 <b>93,3</b>		570	100,0 <b>90,6</b>
Baço palpável	Sim	35	66,0 <b>9,7</b>	18	34,0 <b>6,7</b>	0,168	53	100,0 <b>8,4</b>
	Não	324	56,3 <b>90,3</b>	252	43,8 <b>93,3</b>		576	100,0 <b>91,6</b>
Anemia	Sim	121	61,7 <b>33,7</b>	75	38,3 <b>27,8</b>	0,112	196	100,0 <b>31,2</b>
	Não	238	55,0 <b>66,3</b>	195	45,0 <b>72,2</b>		433	100,0 <b>68,8</b>
Gota Espessa	Pos.	36	76,6 <b>9,8</b>	11	23,4 <b>4,0</b>	0,005	47	100,0 <b>7,3</b>
	Neg.	330	55,5 <b>90,2</b>	265	44,5 <b>96,0</b>		595	100,0 <b>92,7</b>

\* proporção por categorias e entre categorias (em negrita); † teste de Qui-quadrado de Pearson

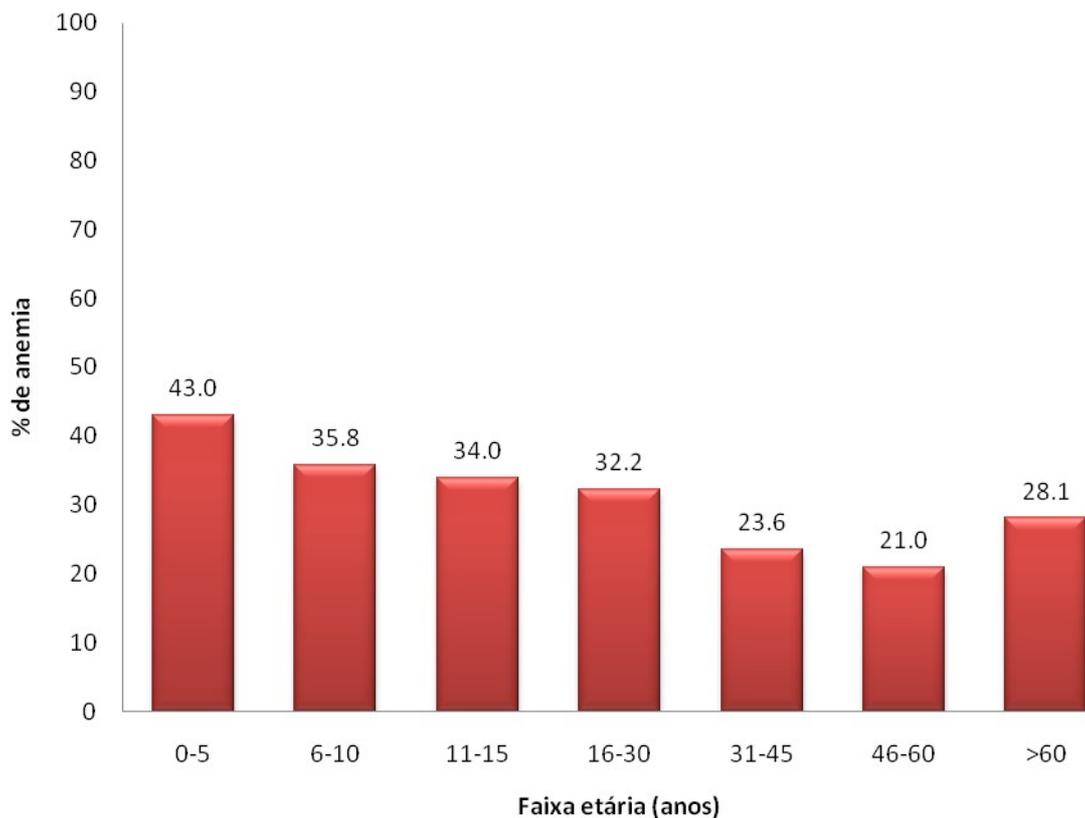


Figura 18 - Distribuição percentual de anemia por faixa etária na população participante do corte transversal. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

#### 4.4.3 Exames laboratoriais específicos para o diagnóstico de malária

##### 4.4.3.1 Gota espessa (GE)

O exame de GE feito pelos microscopistas locais detectou 47 infecções por *Plasmodium spp.*: 40 (85,1%) por *P. vivax* e 7 (14,9%) por *P. falciparum*. Não foram detectadas infecções por ambas as espécies (malária mista) nem por outra espécie. Dos participantes com parasitos detectados na GE, 24 (51,1%) negaram sintomas no momento da coleta da amostra de sangue.

A identificação das espécies durante a revisão das lâminas positivas coincidiu com a leitura dos microscopistas locais em 31 casos (27 *P. vivax*, 4 *P. falciparum*); em 7 não foram achados parasitos na revisão (5 *P. vivax*, 2 *P. falciparum*) e em 9 a mesma não foi possível devido a má qualidade da lâmina. A concordância entre as leituras de lâminas positivas foi 81,6% (31/38).

Analisaram-se as características demográficas, epidemiológicas e clínicas em relação ao resultado da GE feita pelos microscopistas locais. Os resultados são mostrados na tabela 4.

Não se encontrou associação significativa entre a detecção de parasitos na GE e sexo, tipo de morador, uso de mosquiteiro, casa borrifada com inseticida nos últimos 6 meses ou uso de antimaláricos nos 30 dias prévios.

Em relação à distribuição pela idade, a detecção de parasitos pela GE foi mais freqüente nas faixas de 6 a 10 anos e de 16 a 30 anos ( $p < 0,05$ ). O grupo com parasitos foi mais jovem do que o grupo sem parasitos na GE (medianas de 14,6 e 20,7 anos, respectivamente;  $p = 0,031$ ).

A presença de febre nas últimas 48 horas e o achado de baço palpável no exame clínico estiveram associados à positividade da GE ( $p < 0,01$ ).

Também a anemia ficou associada à parasitemia patente ( $p = 0,046$ ), embora a média da taxa de hemoglobina não tenha variado significativamente na presença (12,4 mg/dL) ou ausência (12,7 mg/dL) de parasitemia ( $p = 0,304$ ).

Entretanto, a associação anemia-parasitemia foi sustentada para a faixa etária de 0 a 15 anos, onde 14/100 (14,0%) indivíduos com anemia tiveram GE positiva frente à 9/167 (5,4%) sem anemia ( $p = 0,015$ ). Por sua parte, nos maiores de 15 anos, a parasitemia patente esteve presente em 6/96 (6,3%) pessoas com anemia e em 16/266 (6,0%) sem anemia ( $p > 0,05$ ).

Tabela 4 – Características demográficas, epidemiológicas e clínicas dos participantes do corte transversal segundo o resultado da gota espessa (GE). Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

Características Demográficas, epidemiológicas e Clínicas	GE positiva		GE negativa		Valor de p*	
	n	%	n	%		
Sexo						
Feminino	24	8,3	264	91,7	0,374	
Masculino	23	6,5	331	93,5		
Faixa etária						
≤ 5	5	5,7	82	94,3	0,005	
6 – 10	13	15,9	69	84,1		
11 – 15	6	5,9	96	94,1		
16 – 30	14	11,7	106	88,3		
31 – 45	4	3,6	107	96,4		
46 – 60	4	4,8	79	95,2		
> 60	1	1,8	56	98,2		
Tipo de morador						
Originário	3	4,1	70	95,9	0,260	
Imigrante	44	7,8	523	92,2		
Uso de mosquiteiro	Sim	24	7,7	288	92,3	0,603
	Não	21	6,6	296	93,4	
Casa borrifada nos 6 meses prévios	Sim	38	6,9	510	93,1	0,578
	Não	7	8,6	74	91,4	
Antimaláricos nos 30 dias prévios	Sim	11	10,3	96	89,7	0,168
	Não	34	6,5	488	93,5	
Febre nas últimas 48 horas	Sim	18	30,5	41	69,5	<0,001 †
	Não	27	4,7	543	95,3	
Baço palpável (n=631)	Sim	9	17,0	44	83,0	0,009 †
	Não	36	6,3	540	93,8	
Anemia	Sim	20	10,2	176	89,8	0,046 ‡
	Não	25	5,8	408	94,2	

\* Teste de Qui-quadrado de Pearson para as variáveis categóricas.

† Teste exato de Fisher

‡ 1 pessoa com GE negativa sem dado de hemoglobina

#### 4.4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para *P. falciparum*

Foram comparados os resultados da revisão das lâminas positivas do corte com os disponíveis da PCR para *P. falciparum*.

Quando não foram encontrados parasitos na microscopia, a PCR para *P. falciparum* foi negativa em todos os 6 casos.

Quando foram observados parasitos de *P. falciparum*, a PCR para *P. falciparum* foi positiva somente em 1 de 4 casos.

Quando foram visualizados parasitos de *P. vivax* na revisão, a PCR para *P. falciparum* foi negativa em todos os 23 casos.

Das 595 pessoas sem parasitos na GE, resgatou-se a PCR para *P. falciparum* de 533 (89,6%) e para *P. vivax* de 341 (57,3%). Os resultados disponíveis permitiram identificar 152 amostras positivas na PCR para *P. falciparum*; quando submetidas a PCR para *P. vivax*, 11 destas foram positivas.

Dos 152 participantes com PCR positiva para *P. falciparum*, 148 (97,4%) eram mestiços e 4 (2,6%) de cor branca.

Em relação à ocupação, 54 (35,5%) eram estudantes, 46 (30,3%) dedicados à agricultura ou piscicultura, 26 (17,1%) menores de 6 anos de idade, 13 (8,6%) domésticas, 6 (3,9%) aposentados, 2 (1,3%) funcionários públicos e 5 (3,3%) tinham outras atividades.

Segundo o grau de escolaridade, 38 (25,0%) eram analfabetos, 103 (67,8%) fizeram o curso fundamental completo ou incompleto, 8 (5,3%) freqüentaram o ensino médio completo ou incompleto e 2 (1,3%) tinham curso superior completo.

De acordo com o local de procedência, 71 (46,7%) eram do Careiro, 75 (49,3%) de outros municípios do Amazonas e 6 (4,0%) de outros estados (3 do Pará, 1 de Rondônia, 1 de Ceará, 1 de Minas Gerais).

A proporção de positividade da PCR para *P. falciparum* nas faixas etárias foi maior nas crianças de 0 a 10 anos (média de 38,2%) e homogênea nas demais faixas (média de 25,4%), porém sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,166$ ) (Figura 19).

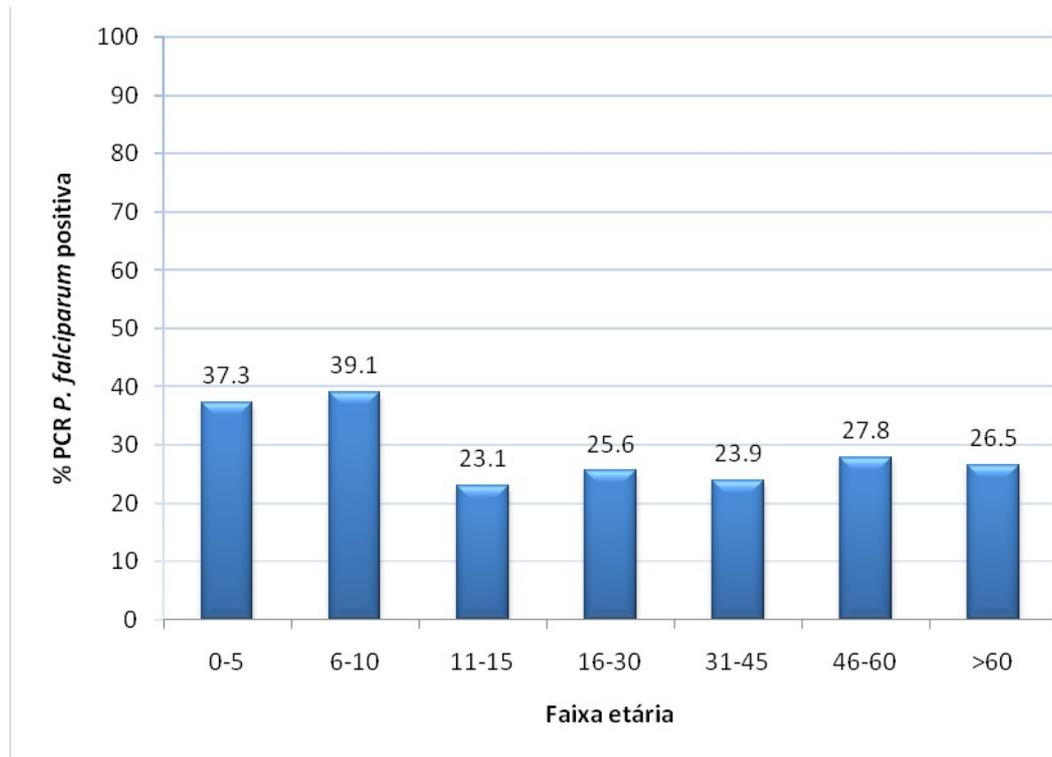


Figura 19 – Distribuição percentual da PCR positiva para *P. falciparum* por faixa etária em indivíduos sem parasitos detectáveis na gota espessa. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

Ao comparar as características demográficas do corte transversal em relação à presença de infecção subpatente por *P. falciparum* observou-se que não houve associação com localidade, sexo, faixa etária ou tipo de morador (tabela 5).

A mediana da idade foi menor no grupo com PCR positiva (16,8 vs. 21,6 anos;  $p=0,068$ ) enquanto que o tempo de permanência na área do estudo foi similar (3 vs. 4 anos;  $p=0,050$ ).

Ao comparar as características epidemiológicas e clínicas avaliadas no corte transversal em relação à presença de infecção subpatente por *P. falciparum* também não houve diferença significativa com nenhuma destas características (tabela 6).

Tabela 5 – Características demográficas dos participantes do corte sem parasitemia patente, segundo o resultado da PCR para *P. falciparum* (*P.f.*). Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

Características Demográficas		PCR <i>P.f.</i> positiva		PCR <i>P.f.</i> negativa		Valor de p <sup>†</sup>
		n	%*	n	%*	
Localidade	Panelão	91	29,8	214	70,2	0,436
			<b>59,9</b>		<b>56,2</b>	
	Castanho Sítio	61	26,8	167	73,2	
			<b>40,1</b>		<b>43,8</b>	
Sexo	Feminino	73	30,4	167	69,6	0,380
			<b>48,0</b>		<b>43,8</b>	
	Masculino	79	27,0	214	73,0	
			<b>52,0</b>		<b>56,2</b>	
Faixa etária	≤ 5	28	37,3	47	62,7	0,166
			<b>18,4</b>		<b>12,3</b>	
	6 – 10	25	39,1	39	60,9	
			<b>16,4</b>		<b>10,2</b>	
	11 – 15	21	23,1	70	76,9	
			<b>13,8</b>		<b>18,4</b>	
	16 – 30	23	25,6	67	74,4	
			<b>15,1</b>		<b>17,6</b>	
	31 – 45	22	23,9	70	76,1	
		<b>14,5</b>		<b>18,4</b>		
46 – 60	20	27,8	52	72,2		
			<b>13,2</b>		<b>13,6</b>	
	> 60	13	26,5	36	73,5	
		<b>8,6</b>		<b>9,4</b>		
Tipo de morador	Originário	24	37,5	40	62,5	0,090
			<b>15,8</b>		<b>10,5</b>	
	Imigrante	128	27,3	341	72,7	
			<b>84,2</b>		<b>89,5</b>	

\* proporção por categorias e entre categorias (em negrita); † teste de Qui-quadrado de Pearson

Tabela 6 – Características epidemiológicas e clínicas dos participantes do corte sem parasitemia patente, segundo o resultado da PCR para *P. falciparum* (*P.f.*). Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

Características Epidemiológicas e Clínicas		PCR <i>P.f.</i> positiva		PCR <i>P.f.</i> negativa		Valor de p <sup>†</sup>
		n	%*	n	%*	
Uso de mosquiteiro	Sim	72	28,1 <b>47,4</b>	184	71,9 <b>48,5</b>	0,806
	Não	80	29,1 <b>52,6</b>	195	70,9 <b>51,5</b>	
Casa borrifada nos 6 meses prévios	Sim	130	28,3 <b>85,5</b>	330	71,7 <b>87,1</b>	0,636
	Não	22	31,0 <b>14,5</b>	49	69,0 <b>12,9</b>	
Antimaláricos nos 30 dias prévios	Sim	19	21,6 <b>12,5</b>	69	78,4 <b>18,2</b>	0,110
	Não	133	30,0 <b>87,5</b>	310	70,0 <b>81,8</b>	
Febre nas últimas 48 horas	Sim	9	23,7 <b>5,9</b>	29	76,3 <b>7,7</b>	0,484
	Não	143	29,0 <b>94,1</b>	350	71,0 <b>92,3</b>	
Baço palpável (n=631)	Sim	13	32,5 <b>8,6</b>	27	67,5 <b>7,1</b>	0,573
	Não	139	28,3 <b>91,4</b>	352	71,7 <b>92,9</b>	
Anemia	Sim	48	30,8 <b>31,6</b>	108	69,2 <b>28,5</b>	0,481
	Não	104	27,7 <b>68,4</b>	271	72,3 <b>71,5</b>	

\* proporção por categorias e entre categorias (em negrita); † teste de Qui-quadrado de Pearson

Embora não tenha sido observada diferença na proporção de anemia segundo o resultado da PCR para *P. falciparum*, a média da taxa de hemoglobina foi significativamente menor na presença de infecção subpatente por esta espécie ( $12,5 \pm 1,92$  mg/dL vs.  $12,9 \pm 1,68$  mg/dL;  $p=0,038$ ). (Figura 20).

Ao comparar os resultados de aferição de hemoglobina com os resultados da PCR para *P. falciparum*, mas excluindo aqueles que manifestaram ter usado antimaláricos nos 30 dias prévios à data do corte, a média manteve-se menor no grupo com

resultado positivo ( $12,5 \pm 1,94$  vs.  $12,9 \pm 1,67$ ), sendo a diferença estatisticamente significativa ( $p=0,017$ ) (Figura 20).

Ao analisar por localidade, esta diferença manteve-se somente no Castanho Sítio ( $12,6$  vs.  $13,1$  mg/dL;  $p=0,037$ ) e, não, no Panelão ao ( $12,4$  vs.  $12,7$  mg/dL;  $p=0,322$ ). Ainda no Castanho Sítio, a relação da infecção subpatente com menor taxa de hemoglobina ocorreu apenas no sexo masculino. (Figura 21).

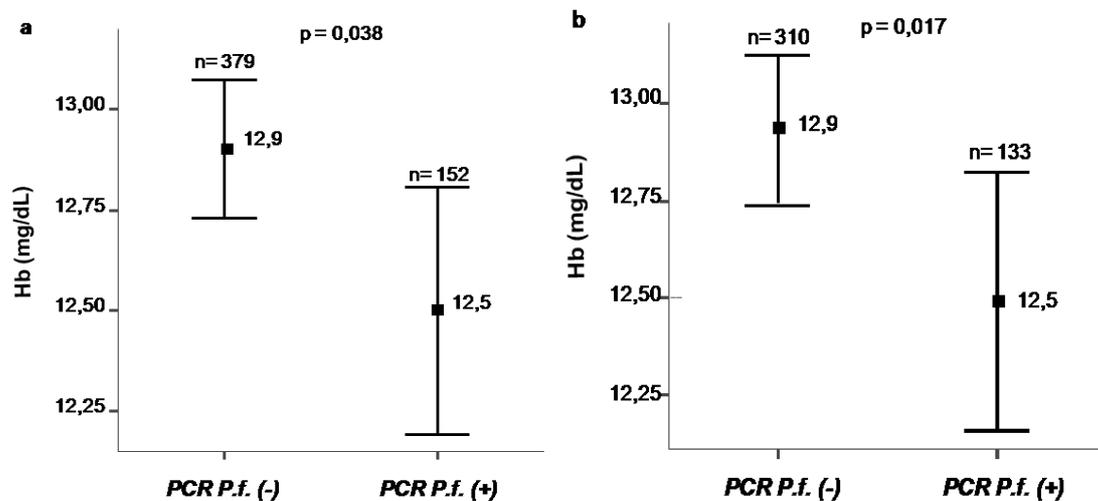


Figura 20 – Taxa de hemoglobina (Hb) segundo presença de infecção subpatente por *P. falciparum* (PCR *P.f.*) em área rural do Município do Careiro-AM, Brasil, 2008. Pessoas com gota espessa negativa (a) e, além disso, sem uso de antimaláricos nos 30 dias prévios à coleta de amostra (b). Na figura representa-se a média e intervalos de confiança da Hb.

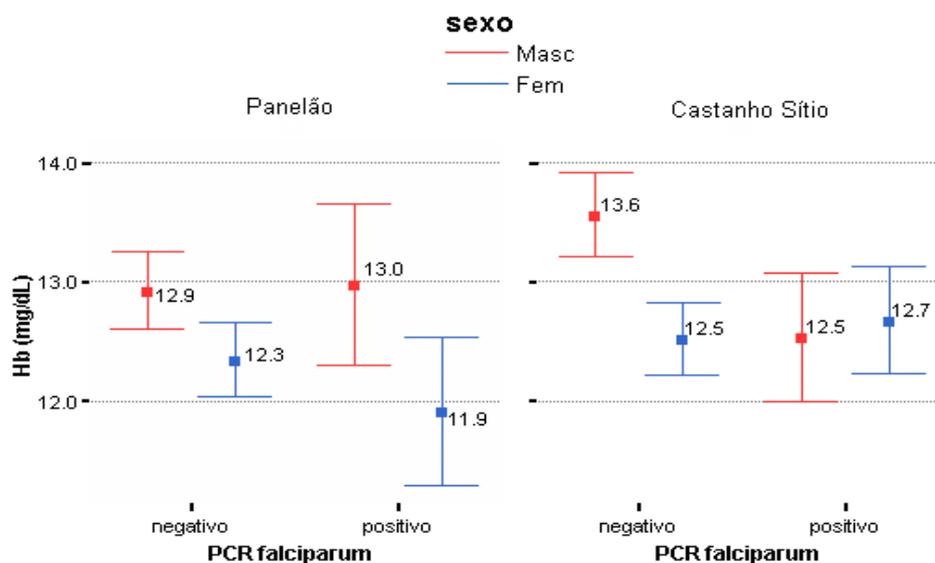


Figura 21 – Taxa de hemoglobina (Hb) segundo presença de infecção subpatente por *P. falciparum*, por localidade e sexo, em área rural do Município do Careiro-AM, Brasil, 2008. Na figura representa-se a média e intervalos de confiança da Hb.

#### **4.5 Segunda etapa da análise do estudo: análise do seguimento dos participantes por um período de até 30 dias.**

Inicialmente a coorte elegível foi formada por 141 participantes sem parasitos na leitura de lâminas de GE e com resultado positivo da PCR exclusivamente para *P. falciparum*. Destes, foram excluídos 49 indivíduos pelos seguintes motivos investigados, nesta ordem:

- a) menores de 6 anos (25)
- b) diagnóstico de malária nos 30 dias prévios (16)
- c) relato de febre nas últimas 48hs antes da data do corte transversal (5)
- d) relato de antecedente de doença sintomática (1 cardiopatia, 1 hematúria macroscópica)
- e) gravidez (1)

Em 15 dos 92 indivíduos incluídos para o seguimento, o resultado da PCR foi conhecido pelo pesquisador depois de 30 dias da data do corte transversal. Assim, esses 15 indivíduos não tiveram visita programada e foram considerados como perdas. As características clínico-epidemiológicas deste grupo foram:

- a) sexo: masculino 12, feminino 3
- b) idade: de 20 a 70 anos, com mediana de 37,8 anos
- c) localidade de residência: Panelão 10, Castanho Sítio 5
- d) ocupação: agricultura/piscicultura 11, outras atividades 4
- e) procedência: Careiro 9, Manaus 5, Estado do Pará 1
- f) permanência na área: de 0 a 43 anos, com mediana de 6 anos
- g) tiveram algum episódio de malária no último ano: 4
- h) baço palpável: 1
- i) nível de Hb: de 11,8 a 16,0 mg/dL, com mediana de 14,2 mg/dL.
- j) anemia: 2

Ao final, 77 indivíduos foram acompanhados por um período de até 30 dias. Destes, 28 (36,4%) mantiveram-se assintomáticos até o dia 30 de seguimento e 49 (63,6%) desenvolveram pelo menos um sintoma nesse período.

#### **4.5.1 Características clínico-epidemiológicas segundo o desenvolvimento de sintomas.**

A tabela 7 compara as características epidemiológicas e clínicas dos indivíduos, avaliadas no corte transversal, em relação ao desenvolvimento de sintomas no seguimento em até 30 dias (grupo sintomático e grupo assintomático).

Quanto ao local de moradia, no Panelão 11/39 (28,0%) pessoas permaneceram assintomáticas até o dia 30, enquanto que no Castanho Sítio, foram 17/38 (44,7%), porém, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,132$ ).

Comparando os resultados segundo o sexo, 12/45 (26,7%) pessoas do sexo feminino mantiveram-se assintomáticas frente à 16/32 (50,0%) do sexo masculino, com diferença significativa ( $p=0,036$ ).

Em relação à ocupação, 8 (25%) homens e 17 (37,8%) mulheres dedicavam-se à agricultura/piscicultura, sem diferença significativa entre os grupos ( $p=0,238$ ).

Observando presença de sintomas, nos menores de 15 anos 16 (50,0%) foram assintomáticos, e nos maiores foram 12 (26,7%), com diferença significativa ( $p=0,036$ ). O grupo assintomático foi mais jovem do que o sintomático (medianas de 15 e 33 anos, respectivamente), mas sem significância estatística ( $p=0,154$ ).

Não houve associação entre o desenvolvimento de sintomatologia e tipo de morador, uso de mosquiteiro, casa borrifada ou anemia. A média do nível de hemoglobina entre os grupos sintomático ( $12,9 \pm 1,50$ ) e assintomático ( $12,8 \pm 1,57$ ) foi similar.

No grupo de assintomáticos, um indivíduo que, no exame clínico feito no inquérito inicial do corte transversal apresentava baço palpável, mostrou regressão esplênica

ao final de 30 dias. Outro indivíduo desenvolveu baço palpável ao final do seguimento de 30 dias.

No grupo de sintomáticos, o exame clínico no decorrer do primeiro episódio de sintomas foi possível somente em 23 indivíduos. Em dois, observou-se regressão de esplenomegalia e, em outro, aparecimento de aumento esplênico em relação aos achados durante o exame inicial do corte transversal.

Tabela 7 – Características epidemiológicas e clínicas de pessoas com infecção basal subpatente por *P. falciparum* segundo desenvolvimento de sintomas em 30 dias. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

Características epidemiológicas e clínicas		Sintomático		Assintomático		Valor de p **
		n	%*	n	%*	
Localidade	Panelão	28	71,8	11	28,0	0,132
			<b>57,1</b>		<b>39,3</b>	
	Castanho Sítio	21	55,3	17	44,7	
			<b>42,9</b>		<b>60,7</b>	
Sexo	Feminino	33	73,3	12	26,7	0,036
			<b>67,3</b>		<b>42,9</b>	
	Masculino	16	50,0	16	50,0	
			<b>32,7</b>		<b>57,1</b>	
Faixa etária	6 – 15 anos	16	50,0	16	50,0	0,036
			<b>32,7</b>		<b>57,1</b>	
	> 15 anos	33	73,3	12	26,7	
			<b>67,3</b>		<b>42,9</b>	
Morador Originário		6	75,0	2	25,0	0,703 †
			<b>12,2</b>		<b>7,1</b>	
Uso de mosquiteiro		21	63,6	12	36,4	1,000
			<b>42,9</b>		<b>42,9</b>	
Casa borrifada nos 6 meses prévios		43	67,2	21	32,8	0,207
			<b>87,8</b>		<b>85,7</b>	
Anemia		12	60,0	8	40,0	0,733
			<b>24,5</b>		<b>28,6</b>	

\* proporção por categorias e entre categorias (em negrita); \*\* Teste de Qui-quadrado de Pearson. † Teste exato de Fisher

#### 4.5.2 Coorte sem desenvolvimento de sintomatologia.

Dos 28 indivíduos assintomáticos, a leitura de lâminas de GE detectou 2 (7,1%) com *P. vivax* e 26 (92,9%) casos negativos no 30<sup>o</sup> dia (D30).

No D30, os dois casos de *P. vivax* na GE tiveram a PCR positiva para a mesma espécie. Dos 26 casos com GE negativa, a PCR positivou em 9 (34,6%), assim distribuídos: 7 para *P. vivax*, 1 para *P. falciparum* e 1 para ambas as espécies (malária mista). (Figura 22).

Continuaram sendo acompanhados 25 indivíduos que não mostraram parasitos detectáveis na GE. Uma pessoa com resultado negativo na revisão de lâminas tinha recebido antimaláricos, em função do diagnóstico positivo ao exame local de GE, e não foi mais acompanhado; a PCR deste caso resultou negativa.

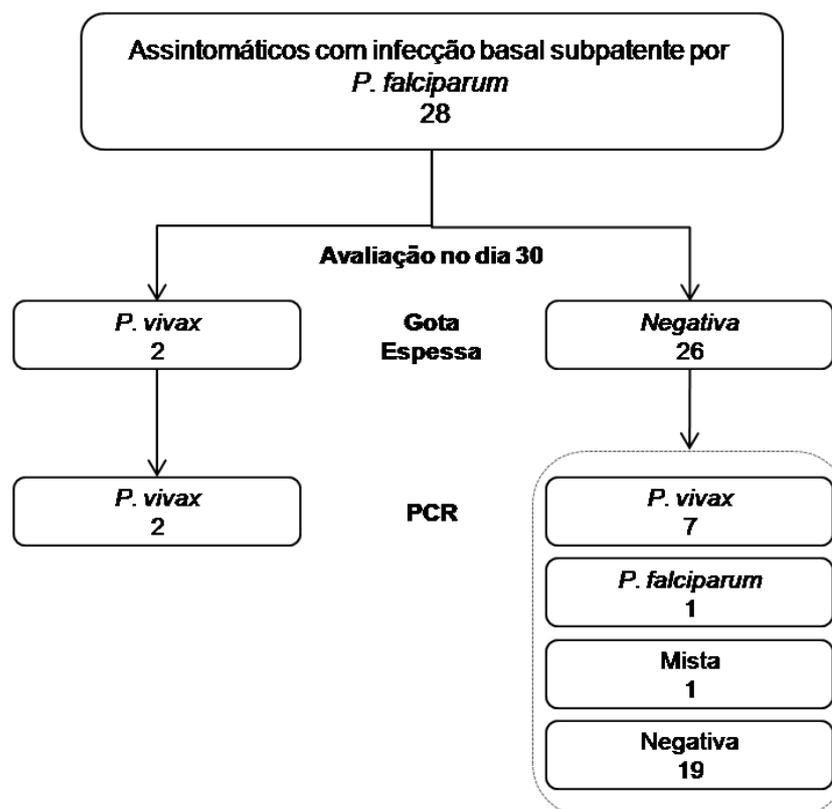


Figura 22 – Exames diagnósticos de malária no dia 30 de seguimento de uma coorte assintomática com infecção basal subpatente por *P. falciparum*. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

#### 4.5.3 Coorte com desenvolvimento de sintomatologia

Considerou-se o primeiro episódio de sintomas nos primeiros 30 dias de seguimento para a avaliação dos exames laboratoriais.

A leitura de lâminas de GE no primeiro episódio de sintomas foi positiva em 11 de 49 casos (22,4%): 6 *P. vivax* e 5 *P. falciparum*.

A PCR foi positiva em 16 de 42 casos disponíveis (38,1%): 9 *P. vivax*, 4 *P. falciparum* e 3 mistas. A PCR identificou 8 (24,2%) infecções subpatentes em 33 lâminas consideradas negativas, fazendo um total de 19/49 (38,8%) infecções por plasmódio no primeiro episódio de sintomas.

Com as lâminas positivas, houve concordância de espécie em 7 de 9 casos. Além disso, a PCR detectou 3 infecções mistas consideradas como infecção por uma espécie, pela hemoscopia. (Figura 23).

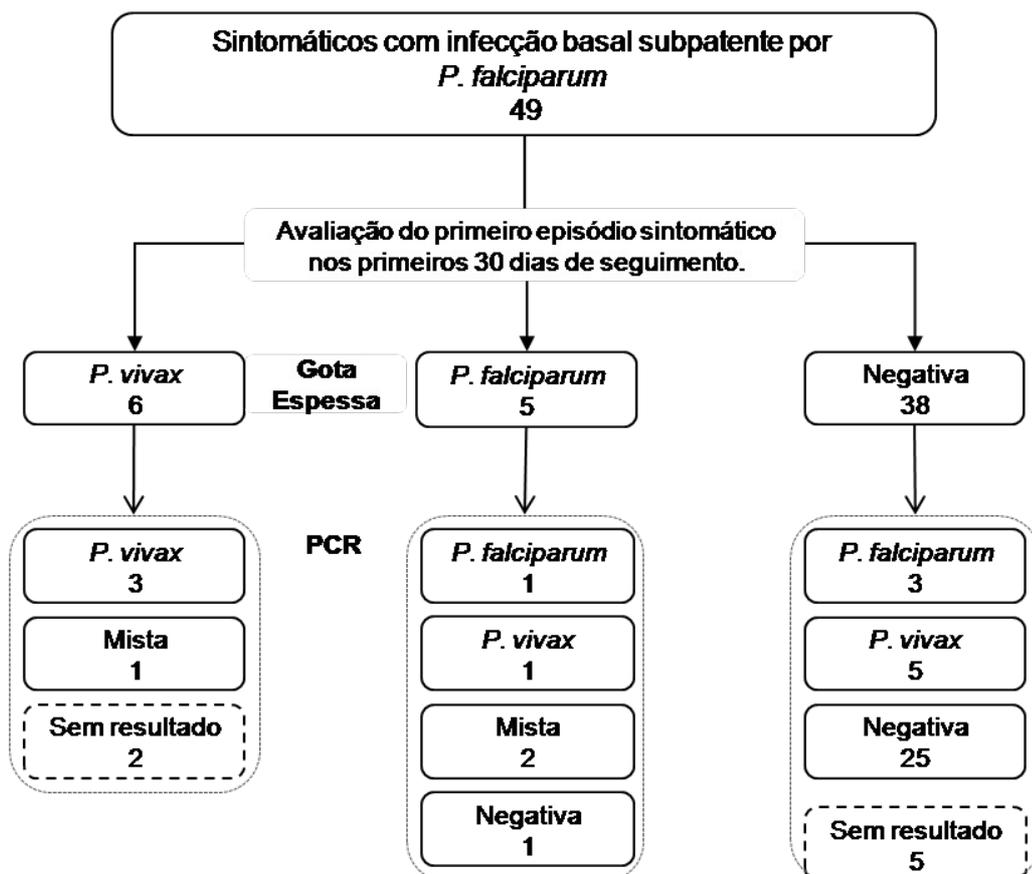


Figura 23 – Exames diagnósticos de malária no primeiro episódio sintomático nos primeiros 30 dias de uma coorte sintomática com infecção basal subpatente por *P. falciparum*. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

As informações clínicas no primeiro episódio sintomático foram obtidas em 47 casos; duas pessoas foram atendidas fora do município.

Em 8 (17,0%) casos, o episódio consistiu de um tipo de sintoma, em 12 (25,5%) de dois, em 13 (27,7%) de três a cinco, e em 14 (29,8%) de seis a onze tipos de sintomas.

Os episódios de um tipo de sintoma foram devidos à cefaléia (6), calafrios (1) ou à dor abdominal (1). Os sintomas mais freqüentes em geral foram: cefaléia 41 (87,2%), calafrios 23 (48,9%) e febre 20 (42,6%).

Na análise bivariada não houve associação significativa entre cada sintoma e a detecção de parasitos de qualquer espécie na GE (Tabela 8).

Tabela 8 – Freqüência dos sintomas no primeiro episódio segundo resultado da gota espessa (GE) dos indivíduos componentes da coorte sintomática no período de até 30 dias. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008

Sintomas	GE -		GE +		Total	
	n = 37	%	n = 10	%	n = 47	%
Cefaléia	33	89,2	8	80,0	41	87,2
Calafrios	16	43,2	7	70,0	23	48,9
Febre	14	37,8	6	60,0	20	42,6
Mal-estar	13	35,1	4	40,0	17	36,2
Fraqueza	12	32,4	5	50,0	17	36,2
Lombalgia	10	27,0	6	60,0	16	34,0
Mialgia	10	27,0	5	50,0	15	31,9
Artralgia	8	21,6	5	50,0	13	27,7
Sudorese	6	16,2	4	40,0	10	21,3
Dor abdominal	6	16,2	3	30,0	9	19,1
Hiporexia	4	10,8	4	40,0	8	17,0
Náusea-vômito	5	13,5	3	30,0	8	17,0

Os achados ao exame clínico foram infreqüentes no grupo assintomático. Houve 3 indivíduos com palidez, 1 com icterícia e 1 com hepato-esplenomegalia; em todos estes casos não foram detectados parasitos na GE.

No grupo de sintomáticos, as informações do exame clínico foram obtidas em 23 casos. Houve 5 pacientes com palidez, 1 com palidez e icterícia, e 1 com hepatoesplenomegalia, sendo a leitura das lâminas de GE negativa em todos estes casos.

O tempo livre de sintomas nos primeiros 30 dias de acompanhamento foi avaliado segundo o método de Kaplan-Meier. Os casos de *censura* na análise corresponderam a indivíduos assintomáticos cuja visita programada foi realizada entre o D25 e D29 do seguimento; do ponto de vista prático, já que continuariam sendo acompanhados, estes casos foram analisados como “assintomáticos no D30”. A curva de sobrevivência mostrou que a viragem para o estado sintomático foi constante neste período. Até o D10, 67 (87,0%) indivíduos mantiveram-se assintomáticos e, até o D20, 50 (64,9%). A metade da coorte desenvolveu sintomas até o D25, correspondendo a 77,4% do total de sintomáticos ao fim do de 30 dias de seguimento (Figura 24).

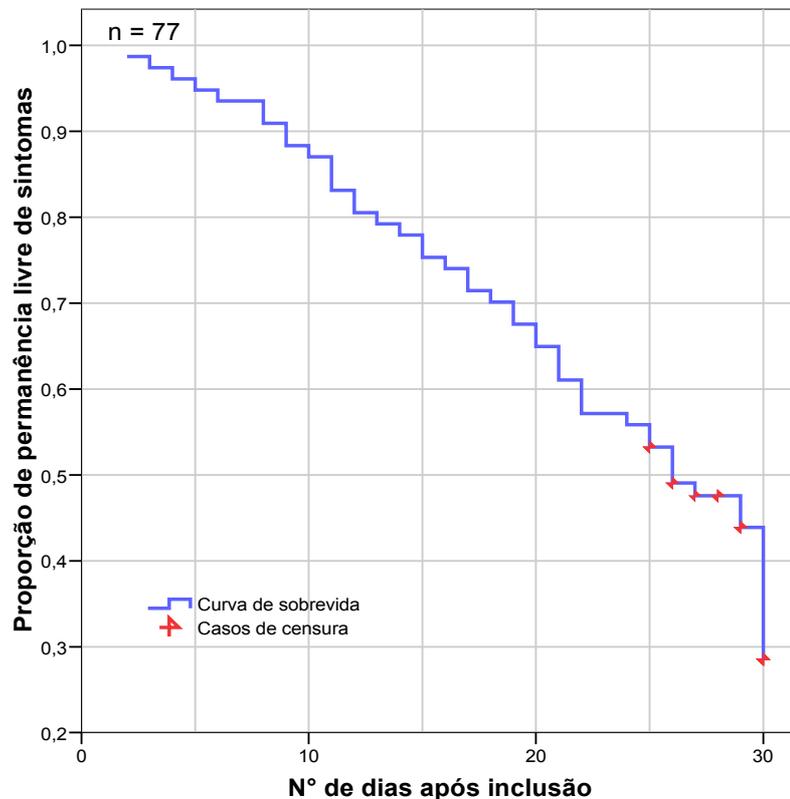


Figura 24 – Probabilidade de permanecer livre de sintomas segundo o método de Kaplan-Meier, em 30 dias de seguimento de uma coorte com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*. Município do Careiro-AM, Brasil, 2008.

## **4.6 Terceira etapa da análise do estudo: análise do seguimento dos participantes por um período de até 90 dias.**

### **4.6.1 Tempo livre de sintomas**

Foi elaborada uma tábua de vida para estimar a proporção de pessoas que permanecia livre de sintomas, no período de 90 dias de seguimento, a intervalos de 10 dias, para fins práticos. Também foi incluída a frequência de resultados positivos da GE para cada intervalo, tanto dos que desenvolveram sintomas quanto dos que se mantiveram assintomáticos. As perdas corresponderam a indivíduos que foram tratados com antimaláricos tendo resultado negativo na revisão da lâmina de GE, ou, a indivíduos assintomáticos sem visitas posteriores (Tabela 9).

Foram acompanhadas 77 pessoas, das quais 28 (36,4%) permaneceram assintomáticas até o D30. Considerando as perdas em cada intervalo de tempo, a proporção de assintomáticos no D60 seria 31,6% (24/76) e no D90, 27,4% (20/73).

O desenvolvimento de sintomatologia foi mais freqüente nos primeiros 30 dias de seguimento: 49/57 (85,9%) indivíduos apresentaram o primeiro episódio de sintomas nesse período, porém, o aparecimento de sintomatologia aconteceu até o dia 80.

Das 8 pessoas que apresentaram o primeiro episódio de sintomas depois do D30, em 2 o episódio consistiu de um sintoma, em 2 de dois, em 3 de três e em 1 de sete; os sintomas mais freqüentes foram cefaléia (5), febre (4) e calafrios (3).

Comparando os tempos de permanência livre de sintomas por faixa etária, as medianas foram de 30 para a faixa de 6 a 15 anos e de 25 para maiores de 15 anos, sem diferença estatisticamente significativa (valor de qui quadrado do teste do Log Rank = 1,307, gl=1, p=0,213). (Figura 25)

Tabela 9– Tábua de tempo de permanência livre de sintomas e frequência de positividade da gota espessa (GE) nos episódios sintomáticos, de uma coorte de indivíduos com exame positivo de PCR para *P. falciparum* e sem parasitos detectados na GE, acompanhada por até 90 dias. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008

Intervalo (dias)	Entraram no intervalo	Desenvolveram o 1º episódio de sintomas no intervalo	Perdas no intervalo	Proporção que permaneceu assintomática no intervalo	Proporção acumulada que permaneceu assintomática	Nº de GE (+) no 1º episódio sintomático	Nº de GE (+) no episódio seguinte
0 – 10	77	10	0	0,870	0,870	0	0
11 – 20	67	17	0	0,746	0,649	2 <i>P.f.</i> , 3 <i>P.v.</i>	0
21 – 30	50	22	4	0,560	0,363	3 <i>P.f.</i> , 3 <i>P.v.</i>	2 <i>P.f.</i>
31 – 40	24	2	0	0,917	0,333	0	0
41 – 50	22	2	1	0,909	0,303	1 <i>P.v.</i>	0
51 – 60	19	0	0	1,000	0,303	0	0
61 – 70	19	1	1	0,947	0,287	0	1 <i>P.f.</i>
71 – 80	17	3	2	0,824	0,236	0	1 <i>P.f.</i>
81 – 90	12	0	0	1,000	0,236	0	0
Total	-	57	8	-	-	12	4

*P.f.*, *P. falciparum*; *P.v.*, *P. vivax*

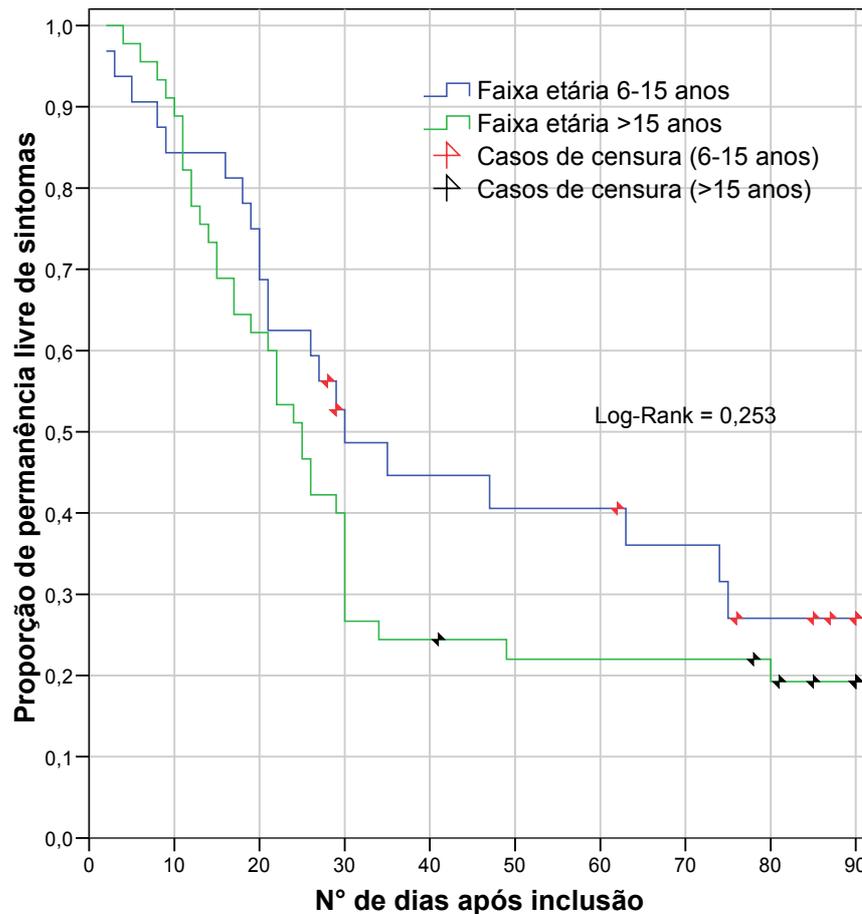


Figura 25 – Tempo de permanência livre de sintomas por faixa etária segundo o método de Kaplan-Meier, em 90 dias de seguimento de uma coorte com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008

Em síntese, em uma população maior de 5 anos de idade sem parasitos de plasmódio detectáveis pela microscopia, houve 27,1% (124/458) de infecções subpatentes por *P. falciparum*, e, segundo a definição padronizada, em pelo menos 6,1% (28) esta infecção seria assintomática.

#### 4.6.2 Resultados da GE

Entre as 20 pessoas que se mantiveram assintomáticas no período de seguimento de 90 dias, a leitura da GE detectou 4 (20,0%) casos de *P. vivax*.

Das 57 pessoas sintomáticas no período de 90 dias de seguimento, 12 (21,1%) tiveram parasitos detectados na GE (5 *P. falciparum* e 7 *P. vivax*) no primeiro episódio de sintomas. Destas, 11 (91,7%) foram obtidos nos primeiros 30 dias.

Outras 12 pessoas tiveram a GE positiva em algum momento posterior ao primeiro episódio sintomático (8 infecções por *P. vivax*, 2 por *P. falciparum* e 2 por ambas as espécies), sendo que 2 com infecção por *P. vivax* tinham permanecido assintomáticas nos primeiros 30 dias.

Dos 77 indivíduos com PCR positiva para *P. falciparum* seguidos por 90 dias, a presença de parasitos circulantes da mesma espécie foi detectada pela GE somente em 9 (11,7%) indivíduos sintomáticos; e a presença de *P. vivax* circulantes, em 17 (22,1%) sintomáticos e 4 (5,2%) assintomáticos.

#### 4.6.2.1 Avaliação da Parasitemia

A figura 26 mostra as densidades parasitárias no período de seguimento, tanto no grupo sintomático quanto no assintomático. A parasitemia no grupo sintomático variou de 60 a 15.600 parasitos/ $\mu$ L; enquanto que no grupo assintomático, não ultrapassou 220 parasitos/ $\mu$ L. Gametócitos de *P. falciparum* foram detectados apenas em um indivíduo sintomático com infecção mista, e parasitemia sexuada de 80 parasitos/ $\mu$ L.

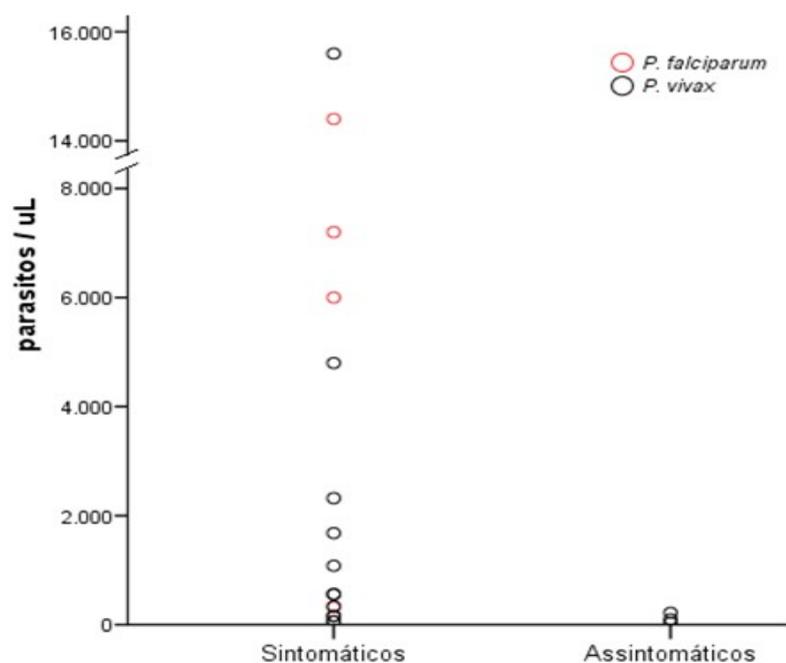


Figura 26 – Densidade parasitária em gota espessa para *Plasmodium spp.*, segundo o desfecho clínico de uma coorte com parasitemia subpatente de *P. falciparum*, em 90 dias de seguimento. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008

### 4.6.3 Resultados da PCR em tempo real

#### 4.6.3.1 Resultados da coorte assintomática

A figura 27 mostra os resultados da PCR em tempo real nos indivíduos que não apresentaram sintomas durante o período de seguimento. Dos 20 indivíduos acompanhados, 4 apresentaram parasitos de *P. vivax* na GE (barras cinzentas) e nenhum apresentou parasitos de *P. falciparum*.

Do total, 6 pessoas (nº 5, nº 8, nº 9, nº 12, nº 15 e nº 19) não apresentaram novo resultado positivo na PCR em tempo real.

Somente 2 pessoas (nº 4 e nº 6) tiveram um resultado positivo na PCR para *P. falciparum*, o que ocorreu após 30 e 60 dias de seguimento. Em ambos os casos, a PCR também resultou positiva para *P. vivax*. O padrão intermitente de parasitemia subpatente de *P. falciparum* foi observado em um destes casos (nº 4).

Quanto a *P. vivax*, em geral, 14 pessoas tiveram pelo menos 1 resultado positivo de PCR em tempo real, evidenciando-se na GE em 4 (nº 1, nº 2, nº 3 e nº 4), e confirmando-se, ademais, um padrão intermitente em 2 casos (nº 13 e nº 18).

O tempo para a PCR detectar *P. vivax* variou de 15 a 90 dias.

Ressalta-se que 4 pessoas (nº 11, nº 13, nº 18 e nº 20) permaneceram assintomáticas por 30 dias antes e depois de ter um resultado positivo de PCR para *P. vivax*.

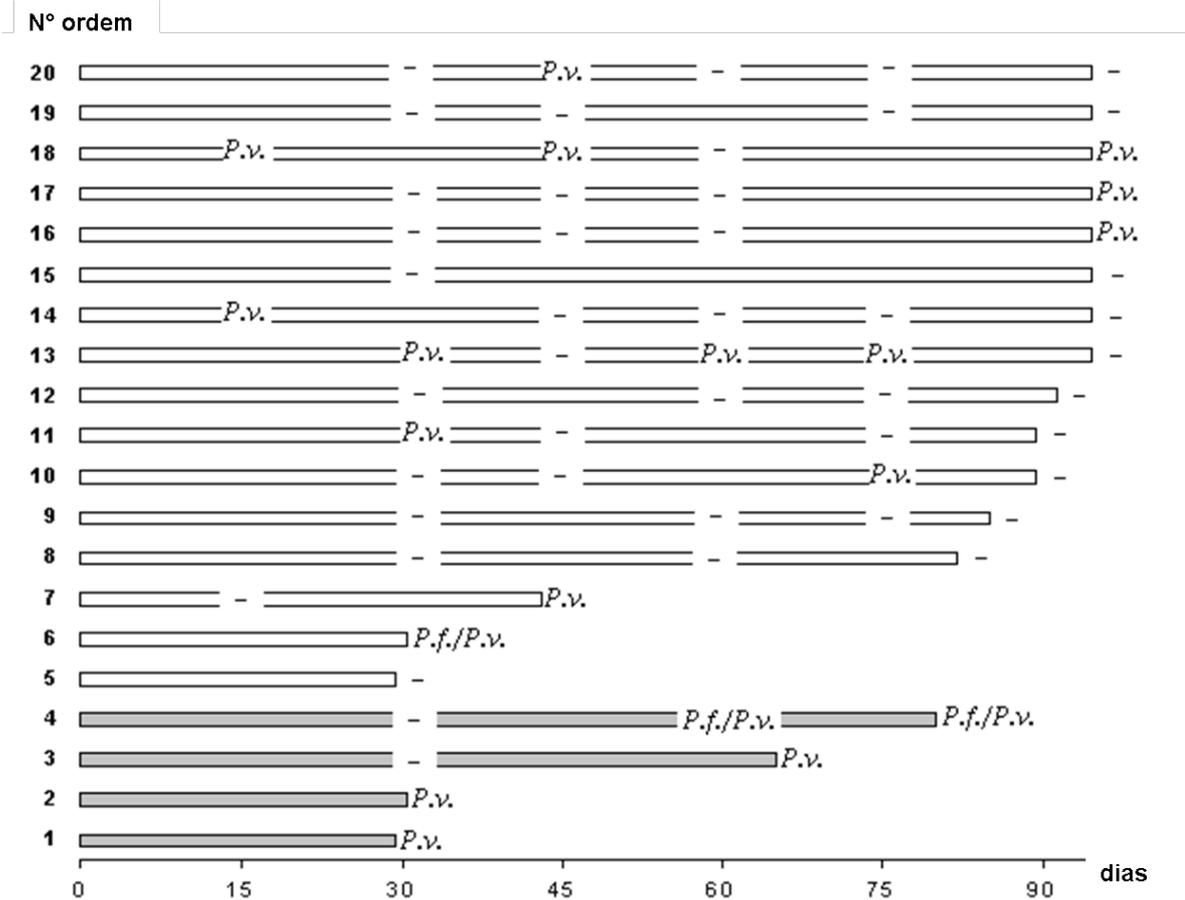


Figura 27 – Coorte de indivíduos maiores de 5 anos de idade, com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*, assintomáticos durante o seguimento: evolução da PCR em tempo real. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008

As barras indicam o tempo de acompanhamento. A cor cinza indica presença de parasitos de *P. vivax* na gota espessa no último dia avaliado. *P.f.*, *P. falciparum*; *P.v.*, *P. vivax*; (-), resultado negativo.

#### 4.6.1.1 Resultados da coorte sintomática

A figura 28 mostra o comportamento dos resultados da PCR em tempo real nos indivíduos que desenvolveram sintomas durante o período de seguimento. Das 57 pessoas sintomáticas, foram excluídas 11 cujo primeiro episódio antes do D30 teve GE positiva e 3 perdas de seguimento. Nos 43 casos representados, 8 correspondem a pacientes que se mantiveram assintomáticos até o D30 (nº 10, nº 13, nº 15, nº 19, nº 26, nº 28, nº 32 e nº 33). O caso nº 10 teve GE positiva para *P. vivax* no primeiro episódio de sintomas.

Como mencionado anteriormente, 12 pessoas tiveram parasitos detectáveis na GE depois do primeiro episódio de sintomas. O resultado da PCR concordou com a GE

em 9 casos (7 *P. vivax*, 1 *P. falciparum* e 1 infecção mista) e discordou parcialmente em 1 (infecção mista na PCR e infecção por *P. vivax* na GE). Em dois casos, um de *P. vivax* e 1 de infecção mista, não se obteve as informações da PCR (“?” na figura).

Quanto a *P. falciparum*, a PCR em tempo real foi positiva em 7 pessoas: em 2 delas com parasitemia patente concordante (nº 4 e nº 25), e nas outras, a GE detectou *P. vivax* em um caso (nº 8) e foi negativa em 4 (nº 2, nº 7, nº 10 e nº 12).

Por outro lado, nas 28 pessoas que não tiveram parasitemia patente até o D75, a PCR em tempo real foi positiva para *P. vivax*, pelo menos uma vez, em 15 pessoas e foi negativa em outras 13.

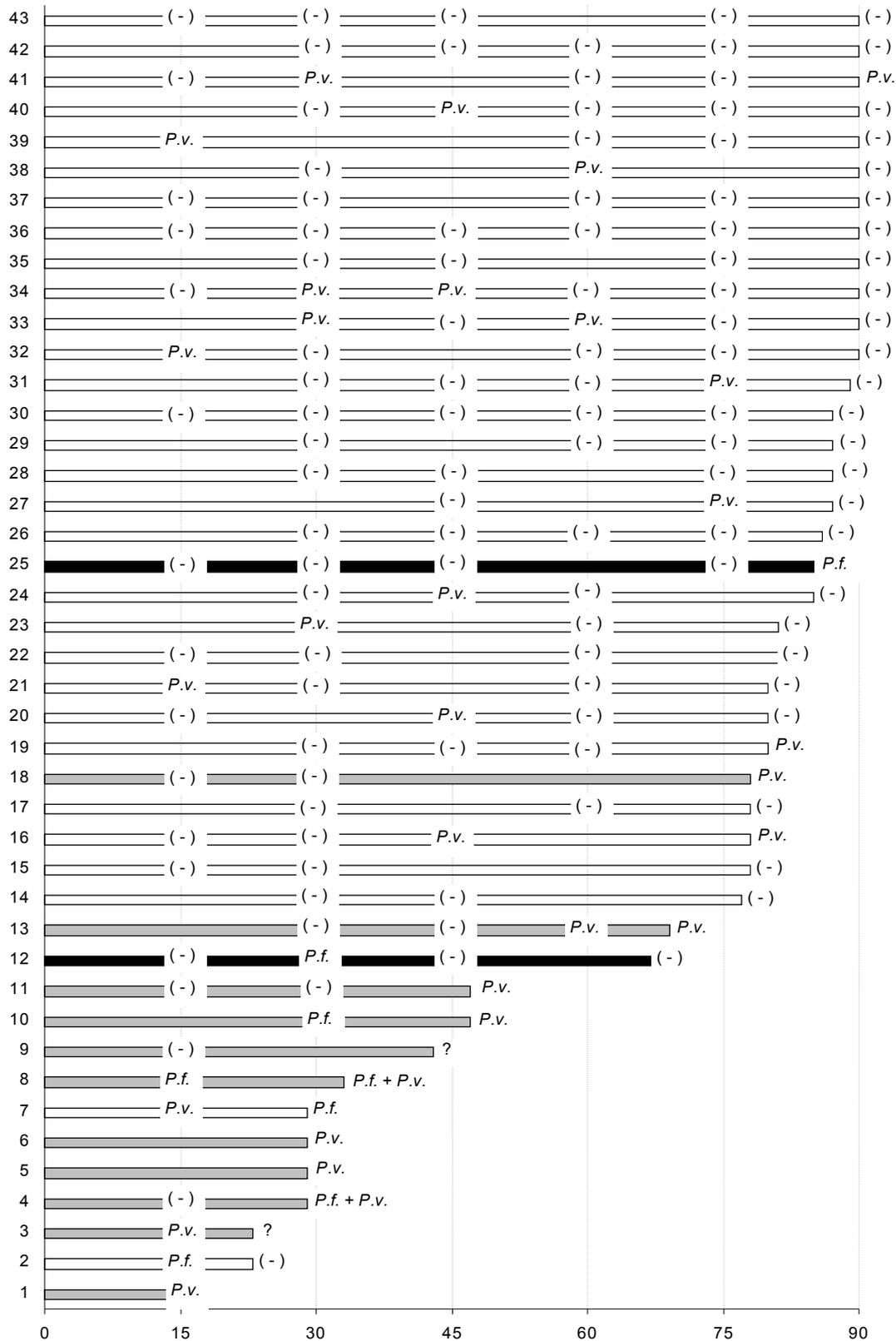


Figura 28 – Coorte de indivíduos maiores de 5 anos de idade, com parasitemia basal subpatente de *P. falciparum*, que desenvolveram sintomas no seguimento: evolução da PCR em tempo real. Município de Careiro-AM, Brasil, 2008

As barras indicam o tempo de acompanhamento. As barras de cor cinza indicam presença de parasitos de *P. vivax* (*P.v.*) na gota espessa no último dia avaliado; as de cor preta, de *P. falciparum* (*P.f.*); e as de linhas diagonais, de infecção mista (*P.f. + P.v.*). (-), resultado negativo.

## **5 DISCUSSÃO**

### **5.1 Corte transversal**

#### **5.1.1 Características epidemiológicas**

A distribuição por idade da população estudada mostrou predomínio do grupo etário menor de 15 anos em relação às outras faixas etárias. Considerando que a maioria (~90%) não tinha nascido no local, é possível inferir que a ocupação da área ocorreu por famílias já constituídas. Com efeito, isto se reflete em que 75% da população teve 7 anos de permanência na área, e na distribuição homogênea de gênero, similar à tendência do estado do Amazonas.

No corte transversal, a avaliação esplênica das crianças entre 2 e 9 anos de idade permitiu identificar a área de estudo como hipoendêmica para malária. A sazonalidade e o alto risco para malária na região já foram relatados em outros estudos, embora relacionadas a populações ribeirinhas (Alecrim, 1979; Alves, F. e cols., 2002; Ladeia-Andrade, 2005; Marcano e cols., 2004; Tada e cols., 2007). A hipoendemicidade de uma área pode ser consequência da sazonalidade da transmissão.

Embora não tenha sido avaliada a percepção que os participantes têm da doença, pelo menos a prática de uma medida preventiva foi referida pela metade da população. O uso de mosquiteiro para dormir é importante devido às características das moradias sem portas nem janelas teladas em sua maioria. Este hábito releva-se de importância para o sucesso de uma campanha de mosquiteiros impregnados com inseticidas nas localidades, que se pretende implementar em futuro próximo.

#### **5.1.2 Avaliação da malária segundo os resultados da GE**

O período de estudo correspondeu à época de alta transmissão, porém, seguindo a tendência na Região Amazônica, a incidência de malária foi a mais baixa dos últimos 5 anos. O fato de menos de 20% dos participantes haver afirmado tratamento antimalárico no mês anterior à pesquisa, confirma que a incidência na doença na região foi baixa mesmo em período de alta transmissão. As causas desta notória queda na incidência global da malária ainda não estão devidamente esclarecidas.

A prevalência de 7% de positividade da GE encontra-se dentro da variação registrada na Amazônia, tanto na época de alta transmissão (Roshanravan e cols., 2003) quanto na de baixa transmissão (Alves, F. e cols., 2002; Ladeia-Andrade e cols., 2009).

A preponderância 4 vezes maior para *P. vivax* (86) do que para *P. falciparum* (21), concorda com a tendência atual em toda a Amazônia, decorrente da intensidade das campanhas de controle. A infecção por *P. malariae* parece continuar em baixa prevalência, apesar de que os microscopistas, mesmo experientes, possam confundir-na com *P. vivax* (Scopel e cols., 2004).

A maior proporção de parasitos detectados pela microscopia nas crianças com 5 a 10 anos de idade poderia ser explicada pela falta de imunidade contra a malária. Similarmente, em pessoas com pouca permanência na área seria explicada pela ausência de imunidade a cepas locais contra as quais ainda não houve uma resposta imune adequada (Bruce e cols., 2000; da Silva-Nunes e cols., 2008; Ladeia-Andrade e cols., 2009; Suarez-Mutis e cols., 2007; Vinetz & Gilman, 2002).

A ausência de associação de detecção de parasitos na GE em pessoas que sempre moraram na área poderia ser explicada por um estado de semi-imunidade que favorece baixas parasitemias a nível submicroscópico.

A associação da positividade da GE com febre e esplenomegalia constitui características reconhecidas do quadro clínico clássico da doença.

A baixa proporção de anemia encontrada (26%) contrasta com outros locais da Região Amazônica, onde há variação desde 17% em populações ribeirinhas

(Ladeia-Andrade e cols., 2009) até 45% em áreas rurais não ribeirinhas (Roshanravan e cols., 2003). A diminuição da prevalência de anemia com o incremento da idade indica maior efeito patogênico sobre as hemácias em crianças além do que fatores de ordem nutricional e parasitária possam também influenciá-la.

### **5.1.3 Infecção por *P. falciparum* segundo a PCR em tempo real**

Os trabalhos publicados sobre inquérito parasitológico de malária na região amazônica têm empregado a técnica de PCR *nested*, amplamente utilizada. A técnica mais recente denominada PCR em tempo real é de execução mais rápida, permite que sejam feitos grande número de exames, evita melhor a contaminação e tem mostrado manter a sensibilidade e a especificidade da antecessora na detecção do DNA parasitário. Desta forma, torna-se possível comparar os resultados deste trabalho com os resultados de outros estudos feitos na região amazônica.

No cenário de baixa incidência de episódios clínicos de malária dos últimos anos, resulta notória a elevada prevalência encontrada de infecção subpatente por *P. falciparum* (29%). A prevalência específica de infecção subpatente, isto é, PCR positiva com GE negativa, não tem sido uniforme na região amazônica, variando de 2% na Amazônia Peruana (Roshanravan e cols., 2003), de 3 a 7% em Jaú, no Estado do Amazonas (Ladeia-Andrade e cols., 2009), de 1% a 15% em populações ribeirinhas de Rondônia (Alves, F. e cols., 2002), e de 19,5% em garimpos no Estado de Mato Grosso (Scopel e cols., 2004).

A elevada prevalência de infecção subpatente de *P. falciparum* aqui encontrada pode ter sido favorecida pela época de alta transmissão em que foi realizado o estudo e a semi-imunidade adquirida da população procedente do próprio município e de outras áreas endêmicas do estado. Ressalta-se que a positividade à PCR 30 vezes superior à da hemoscopia demonstra claramente a maior sensibilidade da PCR. Contudo, especula-se se outros fatores desconhecidos poderiam estar interferindo nesta magnitude que precisariam ser melhor esclarecidos.

A distribuição da infecção subpatente de *P. falciparum* por faixa etária, mostra uma tendência decrescente com o aumento da idade, a qual pode ser um reflexo do comportamento da infecção patente. Considerando que apenas 30% das pessoas com infecção subpatente dedicam-se a atividades extra-domiciliares, o maior acometimento em idades menores ressalta o caráter intra ou peridomiciliar da transmissão (Ladeia-Andrade e cols., 2009).

A não associação entre infecção subpatente por *P. falciparum* e idade, tempo de permanência, febre, esplenomegalia ou anemia, variáveis que se mostraram associadas à detecção de parasitos pela GE, indica uma exposição homogênea da população, independente da idade, do tempo de permanência no local, e que não se manifesta clinicamente. Por outro lado, estes sinais clínicos poderiam ser manifestações de comorbidade existentes na região a serem investigadas.

Na região amazônica, a infecção malárica subpatente tem sido considerada fator de risco para anemia (Ladeia-Andrade e cols., 2009), sendo que a infecção subpatente sintomática pode elevar a prevalência de anemia (Roshanravan e cols., 2003).

Nesta investigação, a ausência de associação entre infecção subpatente por *P. falciparum* e anemia pode ter ocorrido devido a uma infecção subpatente por *P. vivax*, espécie de maior frequência na área, a qual poderia estar contribuindo com a frequência de anemia (Cardoso e cols., 1992; Fernandes e cols., 2008).

Mesmo assim, é importante salientar que infecção subpatente por *P. falciparum* de qualquer forma afetou a taxa de hemoglobina, uma vez que ainda excluindo as pessoas com malária no último mês, a menor taxa de hemoglobina foi verificada independente da possível presença da infecção subpatente por *P. vivax*.

## **5.2 Seguimento da coorte.**

### **5.2.1 Infecção assintomática segundo a definição padronizada.**

Considerando a definição padronizada, 36,4% das pessoas com PCR positiva e GE negativa para *P. falciparum* estariam dentro do critério padronizado de malária assintomática. Esta infecção subpatente assintomática por *P. falciparum* representaria 6,1% da população maior de 5 anos de idade sem parasitos detectáveis pela GE. A ocorrência de infecção assintomática esteve associada com o sexo masculino e com os menores de 15 anos de idade, independente da atividade de risco (agricultura/piscicultura) e do uso de mosquiteiro. Para ambos os sexos, não houve influência do tempo de permanência na área.

A maioria das pessoas que desenvolveram sintomas foram mulheres. No Brasil, embora tenha sido relatado a não associação entre sexo e infecção assintomática em populações peri-urbanas (Tada e cols., 2007), o sexo feminino tem sido considerado fator de risco para infecção por *P. falciparum* em populações ribeirinhas (Ladeia-Andrade e cols., 2009), sem uma explicação plausível. Portadores de deficiência enzimática de G6PD, considerada fator protetor contra malária, especialmente no sexo masculino, poderia ter favorecido o menor adoecimento das pessoas de sexo masculino.

Diferente do que tem sido relatado para a região, o grupo assintomático foi mais jovem do que o sintomático, embora a permanência na área tenha sido semelhante nos dois grupos. A semi-imunidade adquirida em poucos anos em áreas hipo ou meso-endêmicas de malária favoreceria a maior prevalência de infecções assintomáticas com o aumento da idade (Alves, F. e cols., 2002; Ladeia-Andrade e cols., 2009). No entanto, a frequência de indivíduos nativos na área estudada foi mínima, diferente de outros estudos, o que explicaria a falta de desenvolvimento de imunidade clínica na população estudada.

O presente estudo não permitiu avaliar se a infecção assintomática por *P. falciparum* aumenta a ocorrência de anemia em comparação aos não infectados, e mostrou que uma única aferição da taxa de hemoglobina não seria suficiente para diferenciar a malária assintomática da sintomática.

A relação existente entre intensidade de parasitemia no episódio agudo e presença de anemia tem sido reconhecida (Bouyou-Akotet e cols., 2009; Ghosh & Ghosh,

2007), (Kahigwa e cols., 2002). Tem sido objeto freqüente da literatura, determinar se existe uma real associação entre infecção assintomática e parasitemia, uma vez que a parasitemia na infecção assintomática é extremamente baixa.

Estudos transversais realizados na Ásia e na África indicam que a anemia é mais freqüente na presença de parasitemia assintomática, quando comparadas crianças infectadas e não infectadas por plasmódio, tanto em parasitemia patente (Bin Mohanna e cols., 2007; Kimbi e cols., 2005) quanto em parasitemia subpatente (May e cols., 2000). Em Gana, um acompanhamento anual de uma coorte entre 5 e 15 anos de idade revelou que a hemoglobina ao final do acompanhamento de crianças com infecção patente assintomática foi menor do que em crianças não infectadas, sugerindo que a infecção poderia ter algum efeito inibitório na eritropoiese (Casals-Pascual & Roberts, 2006; Kurtzhals e cols., 1999).

Na Amazônia, dois estudos têm abordado esse assunto, ambos utilizando um tempo de 15 dias para definir o estado assintomático. O primeiro encontrou alta ocorrência de anemia entre pessoas com infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*, sugerindo que esta infecção poderia contribuir com a alta prevalência de anemia (Roshanravan e cols., 2003); o segundo concluiu que a infecção subpatente era um fator de risco para a anemia quando controladas outras variáveis (Ladeia-Andrade e cols., 2009). No entanto, nos estudos realizados em Gana, o valor da hemoglobina foi conhecido ao final do acompanhamento, enquanto que nos estudos amazônicos os valores hematimétricos foram aferidos antes de se conhecer o estado assintomático. A discordância de resultados entre as escassas informações sobre o assunto na região sugere a necessidade de mais estudos para maiores esclarecimentos.

Embora a detecção do DNA de *P. falciparum* tenha mostrado relação com uma menor taxa basal de hemoglobina, esta última não permitiu a distinção das pessoas que desenvolveriam sintomas nos primeiros 30 dias. Isto pode ser decorrência da similaridade das parasitemias basais (as quais poderiam ser quantificadas na PCR em tempo real), ou da não relação dos episódios sintomáticos com a malária. A aferição da taxa de hemoglobina no momento da manifestação sintomática permitiria determinar se há diminuição da mesma, o que poderia ser considerado um sinal pré-

clínico de malária, inclusive antes de alcançar o patamar da anemia ou da detecção parasitária pela GE.

No seguimento dos pacientes assintomáticos, a maioria não teve confirmada a infecção subpatente por *P. falciparum*. Pelo contrario, houve numerosos ataques da doença por *P. vivax*, a maioria subpatentes, e em mais da metade dos examinados não houve parasitos detectados. Apenas duas pessoas assintomáticas apresentaram nova PCR positiva para *P. falciparum*. Mesmo considerando-se o carácter intermitente da parasitemia na infecção assintomática, a detecção de parasitemia subpatente da mesma espécie de plasmódio resultou baixa. A parasitemia patente assintomática pode no decorrer do tempo, e sem tratamento, negativar-se por completo ao exame da GE, então estas pessoas não seriam mais consideradas infectadas (Camargo, L. M. e cols., 1999; Njama-Meya e cols., 2004). Se a baixa frequência de positividade na PCR para a mesma espécie deve-se a uma ação do sistema imune capaz de clarear a infecção, a pessoa deixaria de ser portadora assintomática de plasmódio; se este clareamento acontecera precocemente talvez houvesse necessidade de redefinir o conceito de infecção assintomática.

Embora freqüentemente descritos, os sintomas relatados no primeiro episódio não foram determinantes para diferenciar se um episódio sintomático tinha relação com desenvolvimento de parasitemia detectável na GE. A febre referida, ou a temperatura maior de 37,5°C em forma isolada, não foi um bom indicador de infecção malárica, uma vez que em áreas endêmicas, onde as pessoas desenvolvem semi-imunidade após experimentar vários episódios da doença, os ataques palustres subseqüentes podem apresentar-se afebris ou subfebris (Baudon e cols., 1988; Cox e cols., 1994; Schwetz, 1949; Smith e cols., 1995).

A evolução esplênica da coorte também não favoreceu o esclarecimento dos verdadeiros episódios clínicos por plasmódio, tanto pela baixa frequência de baços palpáveis quanto pela regressão e/ou progressão observados. A escassa reatividade esplênica em malária é característica de áreas com transmissão cíclica de baixa endemicidade, onde a infecção assintomática por plasmódio é infreqüente (Marcano e cols., 2004).

### 5.2.2 Complexidade na avaliação de infecção assintomática.

Os primeiros episódios sintomáticos em infecção subpatente por *P. falciparum*, ocorreram com maior frequência, e de forma homogênea, nos primeiros trinta dias. Posteriormente, a frequência de sintomas diminuiu até o final do seguimento, passando a ter 28 pessoas assintomáticas no 30º dia; 24 no 60º dia e 20 no 90º dia. A diminuição da proporção de assintomáticos com a ampliação do tempo de seguimento e maior frequência de ocorrência de sintomas nas primeiras semanas foi relatada em populações ribeirinhas (Alves, F. e cols., 2002; Ladeia-Andrade e cols., 2009). Contudo, outros trabalhos com coortes menores e período de seguimento semelhante não mostraram essa tendência (Camargo, E. P. e cols., 1999; da Silva-Nunes & Ferreira, 2007; Fontes, 2001). No presente estudo, comprovou-se que um seguimento de 30 dias resulta aceitável para detectar a maioria dos primeiros episódios sintomáticos e, portanto, de detectar as infecções assintomáticas, de acordo com a definição padrão.

O episódio sintomático em uma infecção assintomática surge quando é rompido o equilíbrio entre hospedeiro e parasito. As parasitemias foram maiores na coorte que desenvolveu sintomas durante o seguimento. Geralmente, os episódios sintomáticos apresentam-se com aumento da parasitemia, fazendo-a detectável na GE (Babiker e cols., 1998; Contamin e cols., 1996; Kun e cols., 2002; Njama-Meya e cols., 2004). No entanto, a ocorrência de sintomas poderia não ser decorrente da infecção por plasmódio em alguns casos, uma vez que:

- dos 57 primeiros episódios sintomáticos, somente 12 tiveram parasitos detectáveis na GE. Por outro lado,
- das 57 pessoas que desenvolveram sintomas, 13 tiveram exames diagnósticos negativos durante o período de seguimento.

Como em vários estudos de infecção assintomática subpatente em áreas endêmicas do Brasil, o desenvolvimento de sintomas durante o seguimento tem sido considerado em consequência da infecção diagnosticada pelo exame inicial, sem realização de uma nova PCR confirmatória (Alves, F. e cols., 2002; da Silva-Nunes

& Ferreira, 2007; Ladeia-Andrade, 2005; Tada e cols., 2007), o uso de exames confirmatórios altamente sensíveis na detecção de plasmódio resultaria necessário no seguimento destes pacientes para o discernimento etiológico do episódio clínico.

Quanto às vinte pessoas que permaneceram assintomáticas durante todo o período de seguimento, a detecção de *P. falciparum* ocorreu apenas em duas. Isto mostra a dificuldade para discernir se a permanência da condição assintomática ainda tem relação com a infecção diagnosticada inicialmente ou se se trata de infecções com cura espontânea ou autolimitadas (Andrade, 2001; Andrade & Tania, 2001; Camargo, E. P. e cols., 1999; Njama-Meya e cols., 2004).

A maior frequência de resultados positivos para *P. vivax* durante o seguimento, possivelmente pelo predomínio da espécie na região e pela época de alta transmissão em que foi feito o estudo, tornou complexa a compreensão do comportamento da infecção subpatente por *P. falciparum*. Nas infecções assintomáticas, a parasitemia comporta-se de forma oscilante, incluindo predomínio de determinadas cepas de uma mesma espécie ou de espécies diferentes (infecções mistas), dificultando a detecção das cepas não dominantes (Contamin e cols., 1996; Daubersies e cols., 1994; Farnert e cols., 2008; Kun e cols., 2002; Maitland e cols., 1996; Mayxay e cols., 2004; Nsobya e cols., 2004; Wunderlich e cols., 2005). A possível ocorrência de infecções mistas, resultado de associação com espécie a dominante de *P. vivax*, poderia ter mascarado a detecção de *P. falciparum* (Mayxay e cols., 2004). Nos casos sem detecção parasitária para nenhuma espécie durante o seguimento, ora por GE ora por PCR, haveria dificuldade de serem considerados ainda como infectados.

Com a aplicação da definição padronizada foi possível detectar pelo menos 4 pessoas com infecção assintomática por *P. vivax* durante o seguimento. Diante do predomínio desta espécie na região e da época de alta transmissão, estes casos poderiam corresponder a novas infecções ou a recaídas. Recaídas assintomáticas por *P. vivax* foram descritas com até 80 dias posteriores ao último tratamento antimalárico (Jones & Ferreira, 1971), o que concorda com o tempo de detecção parasitária pela PCR neste estudo.

A baixa frequência de infecções mistas detectadas concorda com outras pesquisas na região (Alves, F. e cols., 2002; Ladeia-Andrade e cols., 2009; Suarez-Mutis e cols., 2007). Considerando o aparecimento de nova espécie em menos de 28 dias como critério diagnóstico de infecção mista anteriormente utilizada (da Silva-Nunes & Ferreira, 2007), 8 novos casos de infecção mista seriam reconhecidos pela PCR. Assim, ressalta-se novamente a utilidade da PCR na descrição epidemiológica das infecções mistas em relação à hemoscopia, que detectou apenas 2 casos. Por outro lado, acredita-se que as infecções mistas podem ser vantajosas para o hospedeiro desde que se produz uma supressão mútua entre as espécies, com tendência dominante de *P. falciparum*, mas com *P. vivax* atenuando a severidade do *P. falciparum* (Mayxay e cols., 2004). A baixa frequência de infecção mista e sua similar distribuição entre sintomáticos e assintomáticos não permitiram evidenciar este possível efeito.

Quando se pretende estimar a magnitude da infecção assintomática por plasmódio, especialmente quando a ela se atribui a manutenção da endemia em uma área (Alves, F. e cols., 2002; Alves, F. P. e cols., 2005; Branch e cols., 2005; Jones & Ferreira, 1971; Tada e cols., 2007), resulta importante reconhecer a duração tanto da condição assintomática quanto da condição de infectado. O uso de métodos altamente sensíveis de detecção do parasito no período de seguimento deste estudo mostrou apreciável melhoria na identificação de assintomáticos que se mantêm infectados, e demonstrou que o desenvolvimento de sintomas nos infectados assintomáticos seria insuficiente para ser considerado como episódio de malária, evitando assim tratamentos desnecessários.

### **5.3 Limitações do trabalho.**

O trabalho sofreu algumas limitações metodológicas:

- Perdas iniciais de integrantes da coorte devido aos resultados de PCR conhecidos somente após o período padronizado para definir a condição de assintomático.
  
- A estratégia de tratar as pessoas que tivessem parasitos na leitura de lâminas de GE trouxe duas dificuldades:
  - a) exclusão de pessoas sem parasitos na revisão de lâminas de GE, mas que haviam recebido tratamento em função de uma leitura inicial errônea.
  - b) incerteza se, de fato, as pessoas assintomáticas com parasitos na GE iriam desenvolver posteriormente manifestações clínicas.
  
- Ausência de grupo controle que permitisse avaliar se a presença dos sintomas no seguimento seria ou não causada pela infecção por plasmódio.
  
- A utilização do papel de filtro, como meio de coleta e armazenamento de amostras de sangue, tem mostrado menor sensibilidade do que as amostras de sangue coletadas em tubo, na detecção do DNA parasitário, especialmente quando as parasitemias são baixas.
  
- A eficácia na detecção do DNA parasitário pela PCR em tempo real, usando o método de SYBR Green, pode ser alterada pela presença de algumas substâncias ou inibidores, quando comparada com o método de sondas (Veron e cols., 2009), que mostram melhor sensibilidade (Perandin e cols., 2004; Rougemont e cols., 2004; Swan e cols., 2005).
  
- Discordâncias entre a pesquisa de plasmódio pela GE e a PCR em tempo real, trazendo dificuldades de interpretação principalmente quando a hemoscopia era positiva e a PCR era negativa.
  
- A técnica *nested* de PCR teria mais vantagem do que a técnica em tempo real porque ofereceria maiores chances de detecção de DNA parasitário por meio de suas duas etapas de amplificação.

- Desconhecimento da semelhança genética das cepas de plasmódio encontradas no início e durante o seguimento, porque este conhecimento poderia favorecer o reconhecimento da manutenção de uma infecção assintomática causada por uma mesma cepa.

## 6 CONCLUSÕES

1. Em área hipoendêmica da Amazônia Brasileira, durante época de alta transmissão, 36,4% de pessoas com infecção subpatente por *P. falciparum* foram reconhecidas como portadoras de infecções assintomáticas, segundo a definição padronizada. Neste trabalho, a infecção subpatente assintomática por *P. falciparum* representaria pelo menos 6,1% da população estudada.

2. A infecção assintomática subpatente por *P. falciparum*, segundo a definição padronizada, foi mais freqüente em homens e em crianças menores de 15 anos.

3. Nos primeiros episódios sintomáticos nos primeiros 30 dias, os diversos sintomas relacionados à malária não foram associados com a presença de parasitos ao exame da GE. A avaliação clínica e laboratorial completa diante de um indivíduo sintomático é necessária a fim de afastar a possibilidade diagnóstica de outras doenças em uma região onde prevalecem várias entidades patológicas tropicais.

4. O seguimento dos participantes durante 90 dias mostrou que a freqüência de confirmação das infecções assintomáticas subpatentes por *P. falciparum* foi baixa.

5. Diante da grande quantidade de participantes com pesquisa de hematozoários na GE negativa e PCR positiva, há necessidade do exame da PCR para caracterização da infecção assintomática por *P. falciparum*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

APÉNDICE